

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Testung neuer Proteasominhibitoren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Moritz Eric Wigand

aus Mönchengladbach

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. P.-M. Kloetzel
2. Prof. Dr. med. O. Sezer
3. Prof. Dr. J. Kienast

Datum der Promotion: 29. Januar 2010

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
1.1	FUNKTION UND AUFBAU DES PROTEASOMS	5
1.1.1	VORKOMMEN UND AKTIVITÄT DES PROTEASOMS IN DER ZELLE	5
1.1.2	AUFBAU DES PROTEASOMS	5
1.1.3	DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM	6
1.1.4	DAS IMMUNOPROTEASOM	7
1.2	PROTEASOMINHIBITOREN	8
1.2.1	PROTEASOMINHIBITOREN ALS ANTINEOPLASTISCHE THERAPEUTIKA	8
1.2.2	ANDERE POTENTIELLE EINSATZGEBIETE FÜR PROTEASOMINHIBITOREN	10
1.2.3	AUFBAU UND WIRKUNGSWEISE VON PROTEASOMINHIBITOREN	11
1.2.4	NEUE SUBSTANZEN ALS POTENTIELLE INHIBITOREN	13
1.3	ZIELSETZUNG	14
2	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	15
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
3.1	MATERIALIEN	16
3.1.1	CHEMIKALIEN UND GEBRAUCHSLÖSUNGEN	16
3.1.2	KITS	17
3.1.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	17
3.1.4	ANTIKÖRPER	18
3.1.5	GERÄTE	18
3.1.6	ZU TESTENDE SUBSTANZEN	19
3.2	METHODEN	20
3.2.1	ABBAU FLUOROGENER SUBSTRATE DURCH ISOLIERTES PROTEASOM	20
3.2.2	VERDAU EINES SYNTHETISCHEN 25MER PEPTIDS IN ANWESENHEIT VON PROTEASOMINHIBITOREN	21
3.2.3	PROTEASOMPRÄPARATION AUS ERYTHROZYTENKONZENTRAT	22
3.2.4	SDS-PAGE MODIFIZIERT NACH LAEMMLI (LAEMMLI 1970) UND WESTERN-BLOT	23
3.2.5	ZELLKULTUR	25
3.2.6	UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION VON FARBSTOFF GEKOPPELTEM INHIBITOR (KLOE455AL) MIT PROTEASOM	27
3.2.7	VERTEILUNG VON KLOE455AL IN ZELLEN UND MORPHOLOGISCHE KORRELATE DER INHIBITION	27
4	<u>ERGEBNISSE</u>	29

4.1	IN-VITRO-TESTUNG DER POTENTIELLEN INHIBITOREN.....	29
4.1.1	HEMMUNG DES PROTEASOMS DURCH BSC2118	29
4.1.2	IN-VITRO-CHARAKTERISIERUNG DER INHIBITORISCHEN EIGENSCHAFTEN VON BSC2118	32
4.1.3	DEGRADATION LÄNGERER PEPTIDSUBSTRATE	34
4.2	TESTUNG AUSGEWÄHLTER INHIBITOREN IN ZELLEN	37
4.2.1	REDUKTION DER AKTIVITÄT ZELLULÄRER PROTEASOMEN	37
4.2.2	AKKUMULATION PROTEASOMALER SUBSTRATE	38
4.2.3	BESTIMMUNG DER VITALITÄT VON TUMORZELLEN UNTER PROTEASOMINHIBITION	39
4.3	BINDUNGSVERHALTEN EINES FARBSTOFF-GEKOPPELTEN BSC2118 (KLOE455AL).....	41
4.4	ZELLVERTEILUNG VON KLOE455AL UND NACHWEIS DER AGGRESOMENBILDUNG.....	43
4.5	WASSERLÖSLICHKEIT: DER INHIBITOR BSC3635	47
5	<u>DISKUSSION</u>	49
5.1	IN-VITRO-TESTUNG POTENTIELLER INHIBITOREN – PRO UND KONTRA	50
5.1.1	INHIBITION DES IMMUNOPROTEASOMS – CHRONISCH ENTZÜNDLICHE ERKRANKUNGEN	52
5.1.2	CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER INHIBITOREN	54
5.2	WIRKUNG DER INHIBITOREN AUF ZELLEN.....	56
5.3	AUSBLICK UND FAZIT	59
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	60
7	<u>SCHRIFTENVERZEICHNIS</u>	61
8	<u>PUBLIKATION</u>	70
9	<u>DANKSAGUNGEN.....</u>	71
10	<u>LEBENS LAUF</u>	72
11	<u>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</u>	75

1 Einleitung

1.1 Funktion und Aufbau des Proteasoms

1.1.1 Vorkommen und Aktivität des Proteasoms in der Zelle

Im Rahmen der zellulären Homöostase zwischen Proteinbiosynthese und -degradation spielt das Proteasom, eine etwa 2000 kDa große zytoplasmatisch und nukleär lokalisierte Protease, eine zentrale Rolle beim Abbau intrazellulärer Proteine (Yoshimura et al. 1993, Peters et al. 1994, Rock et al. 1994). Zu den zelleigenen Proteinen, die proteasomal degradiert werden, gehören Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusfaktoren, Enzyme und fehlgefaltete Proteine (Coux et al. 1996). Daneben werden auch zellfremde Proteine, die in der Regel von in die Zelle eingedrungenen viralen Erregern stammen, proteasomal degradiert. Die entstehenden Peptide von zelleigenen und fremden Proteinen werden zumeist durch cytoplasmatische Exo- und Endopeptidasen weiter abgebaut, können aber auch über MHC Klasse I-Moleküle als antigene Epitope auf der Zelloberfläche präsentiert werden, wenn sie die Bindungskriterien erfüllen (Kloetzel 2001).

Die proteolytische Aktivität des Proteasoms weist drei verschiedene Schnittpräferenzen auf. Peptidbindungen werden nach Aminosäuren mit basischen, hydrophoben und sauren Seitenketten gespalten (Wilk et al. 1983). Analog zu gut charakterisierten Enzymen werden diese unterschiedlichen Mechanismen als Trypsin-ähnliche, Chymotrypsin-ähnliche und Caspase-Ähnliche Aktivität bezeichnet (Wilk et al. 1983, Dahlmann 2005).

1.1.2 Aufbau des Proteasoms

Der katalytisch aktive Anteil des Proteasoms sedimentiert bei etwa 20S. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass es sich bei diesem Kernstück des Proteasom-Komplexes um eine zylindrisch geformte Protease handelt (Kloetzel et al. 1987, Baumeister et al. 1988). Diese Protease, das 20S-Proteasom, besteht aus 28 Untereinheiten, die in vier Ringen spiegelsymmetrisch angeordnet sind. Die äußeren Ringe werden von den so genannten alpha-Untereinheiten gebildet, die inneren Ringe von den beta-Untereinheiten (Löwe et al. 1995). Die proteasomalen Untereinheiten $\beta 1$,

$\beta 2$ und $\beta 5$ besitzen bei eukaryonten Zellen ins Innere des Zylinders gerichtete katalytisch aktive Zentren, wie man aus der Kristall-Strukturanalyse weiß (Groll et al. 1997). Mutationversuche bestätigen, dass die unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten des Proteasoms auf drei unterschiedliche Untereinheiten zurückgehen (Heinemeyer et al. 1997). Dabei erfolgt die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung durch einen nucleophilen Angriff mittels eines N-terminalen Threonins, das in die Bindungstasche hineinreicht (Seemuller et al. 1995).

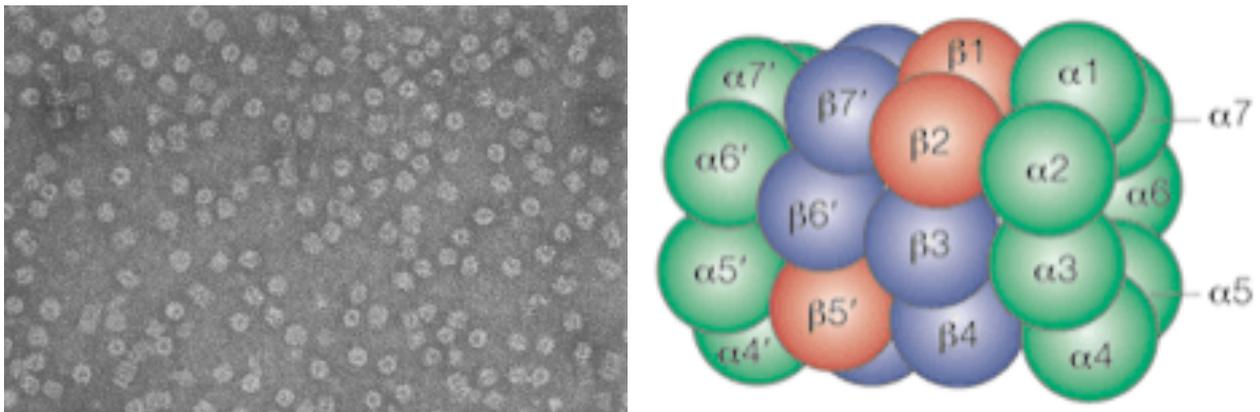


Abb. 1. **Darstellung des Proteasoms.** Elektronenmikroskopische Aufnahme aufgereinigter Proteasomen (Kloetzel et al. 1987), einige stehend, andere auf der Seite liegend, sowie rechts die schematische Darstellung eines 20S-Proteasoms mit Beschriftung der Untereinheiten (nach Kloetzel 2001).

1.1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Der Proteolyse eines Proteins durch das Proteasom geht in der Regel eine ATP-abhängige Ubiquitinierung voraus, das heißt die Beladung des Substrats mit einer Ubiquitin-Kette durch die Ligasen E1 bis E3 (Ciechanover 1994), wobei Ubiquitin für ein evolutionär hoch konserviertes hitzestabiles Polypeptid von 76 Aminosäuren steht (Vierstra et al. 1985). Durch diesen kaskadenartigen Prozess werden bestimmte Proteine spezifisch für den proteasomalen Abbau markiert. Am Anfang steht die Ligase E1, die Ubiquitin aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird von einer Ligase aus der Familie der E2-Ligasen an eine E3-Ligase gekoppelt, die substratspezifisch ist und eine kovalente Bindung zwischen Substrat und Ubiquitin katalysiert. Durch Anhängen weiterer aktivierter Ubiquitin-Moleküle an das erste substratgebundene Ubiquitin entsteht die Ubiquitin-Kette, die eine Erkennungsmarke zum Abbau durch das Proteasom darstellt (Ciechanover et al. 1998).

Die Lage der Bindungstaschen im Inneren des Zylinders sowie regulatorische Einheiten an den Öffnungen des Zylinders schützen die Zelle vor einer unkontrollierten Proteindegradation durch das Proteasom. Der bereits beschriebene 20S Kernkomplex des Proteasoms liegt in vivo in der Regel als Komplex mit ein bis zwei an den alpha-Ringen gebundenen regulatorischen 19S-Einheiten vor, wodurch die Komplexe bei 26S respektive 30S sedimentieren (Yoshimura et al. 1993). Die 19S Regulatoren erkennen ubiquitinierte Substrate (Deveraux et al. 1994), binden diese präferentiell in ihrer entfalteten Form (Braun et al. 1999) und führen zu einer Öffnung des alpha-Rings. Dadurch wird größeren Proteinen erst die Passage ins Innere des 20S-Proteasoms möglich (da Fonseca et al. 2008). Eng mit dieser Translokation des Substrats in das 20S-Proteasom verknüpft ist seine Deubiquitinierung (Zhu et al. 2005).

1.1.4 Das Immunoproteasom

Neben den in allen eukaryoten Zellen vorkommenden regulären oder auch konstitutiven Proteasomen gibt es eine IFN- γ -induzierte Variante, die vor allem im entzündlichen Kontext eine Rolle spielt. Dieses als Immunoproteasom bezeichnete Enzym enthält statt der aktiven Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ drei so genannten Immununtereinheiten, nach heutiger Nomenklatur $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$ (Brown et al. 1991, Früh et al. 1992, Groettrup et al. 1996a). Durch leichte Strukturveränderungen gegenüber dem konstitutiven Proteasom können bei der Proteolyse durch das Immunoproteasom veränderte antigene Epitope entstehen (Dahlmann 2000, Chapiro et al. 2006).

Eine weitere IFN- γ -induzierte Veränderung des Proteasom-Komplexes besteht in dem Austausch einer oder beider 19S-Komplexe gegen den Regulator PA28. Auch PA28 verändert die Antigenproduktion (Groettrup et al. 1996b). Der diskutierte Mechanismus dieser veränderten Antigenproduktion besteht in einer weiteren Öffnung des alpha-Rings durch PA28 (Stohwasser et al. 2000), die möglicherweise zu einer kürzeren Verweildauer von Proteinen in der proteolytischen Kammer führt, was die Entstehung größerer Fragmente fördert (Kloetzel 2001).

Diese Veränderungen stellen Vorteile bei der Generierung gewisser immunogener Epitope dar (Kloetzel 2001), scheinen jedoch auch eine Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen zu spielen (Szalay et al. 2006, Egerer et al. 2006), worauf in Abschnitt 1.2.2 eingegangen wird.

1.2 *Proteasominhibitoren*

Inhibitoren des Proteasoms wurden zunächst in der Grundlagenforschung eingesetzt, um die katalytischen Zentren zu charakterisieren und um Erkenntnisse über das Ubiquitin-Proteasom-System zu gewinnen (Rivett et al. 1989, Kisselev et al. 2001). Inzwischen haben Proteasominhibitoren als Pharmaka ihren Einzug in die Klinik begonnen, wie im Folgenden kurz dargestellt werden soll. Eine Einteilung bisher bekannter Proteasominhibitoren nach ihren physikochemischen Eigenschaften erfolgt in Abschnitt 1.2.3, beim klinisch verwendeten Bortezomib handelt es sich um ein Peptidboronat, das einen reversiblen Proteasominhibitor darstellt (Adams et al. 1999).

1.2.1 Proteasominhibitoren als antineoplastische Therapeutika

Die zentrale Rolle des Proteasoms in jeder gesunden Zelle ließe den Schluss zu, dass Proteasominhibitoren Auswirkungen auf den Organismus haben, die den Einsatz dieser Substanzklasse als Pharmaka unmöglich machen. Jedoch zeigt sich in der Praxis, dass vor allem entartete Zellen empfindlich auf Proteasominhibition reagieren, während der Organismus die Wirkung auf alle übrigen Zellen tolerieren kann (Orlowski et al. 1998). Dieses besondere Ansprechen von Tumorzellen auf Proteasominhibition wird durch die Tatsache erklärt, dass das Ubiquitin-Proteasom-System am Abbau vieler für die Tumorbio­logie relevanter Proteine beteiligt ist. Die Entstehung einer Tumorzelle ist immer ein mehrschrittiger Prozess, in dem Überlebenssignale hochreguliert, wachstumshemmende und apoptotische Signale herunterreguliert und kapilläre Blutgefäße rekrutiert werden (Hanahan et al. 2000). Proteasominhibitoren setzen an verschiedenen Punkten dieser Kaskade an und verschieben dabei das Gleichgewicht zwischen intrazellulären pro- und antiapoptotischen Faktoren zugunsten der Apoptose. Ein Beispiel ist der Transkriptionsfaktor Nuclear factor- κ B (NF κ B), dessen Aktivierung in der Zelle vom Ubiquitin-Proteasom-Systems abhängig ist. In ruhenden Zellen liegt ein Großteil der NF κ B-Komplexe an NF κ B-Inhibitoren (I κ B) gebunden vor und ist somit inaktiv (Tergaonkar et al. 2006). Entzündungsmediatoren wie TNF α oder Interleukin-1 führen zu einer Phosphorylierung, Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation von I κ B, ebenso können DNA-schädigende Agenzen wie UV-Strahlung und Doxorubicin I κ B inaktivieren. Insgesamt sind über hundert Mechanismen bekannt, die NF κ B aktivieren, und ebenso viele Zielgene des aktivierten Transkriptionsfaktors (Pahl et al. 1999). Auf

diesen Zielgenen werden unter anderen antiapoptotische Faktoren und Wachstumsfaktoren kodiert (Pahl et al. 1999), was die Bedeutung von NFκB in der Krebsentstehung plausibel macht und eine Verbindung zwischen chronischer Entzündung und Onkogenese darstellt (Karin et al. 2004).

Am Beispiel von Zellen des multiplen Myeloms konnte gezeigt werden, dass Proteasominhibition die Aktivierung von NFκB über eine IκB-Akkumulation verhindert (Hideshima et al. 2001). Weiterhin scheint gerade bei dieser Art von Zellen auch die hohe Produktionsrate an Immunglobulinen eine Rolle zu spielen: die Last falsch gefalteter Proteine, so genannter *defect ribosomal products* (DRiPs), die im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Zytoplasma akkumulieren, kann unter Proteasominhibition nicht mehr proteasomal degradiert werden, was zu ER-Stress und als Folge zu Apoptose führt (Meister et al. 2007).

Ebenso wird die Rekrutierung von Blutgefäßen dosisabhängig inhibiert. Unter Bortezomib sinkt die Transkription von Genen für die angiogenetischen Faktoren VEGF, IL-6, IGF-I und Ang2 in Multiplen Myelom-Endothelzellen. Chemotaxis und Kapillarproliferation sind dosisabhängig gestört, das Expressionsprofil von Adhäsionsmolekülen ist verändert (Roccaro et al. 2006). Von einigen dieser Gene weiß man, dass ihre Transkription NFκB-aktiviert ist (Pahl et al. 1999). Diese Tatsache stellt eine mögliche Erklärung für die antiangiogenetischen Effekte von Proteasominhibitoren dar.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass untersuchte Krebszellen sensibler auf Proteasominhibition reagierten als nicht entartete Kontrollzellen:

Während selbst ruhende Melanomzellen unter Proteasominhibition apoptotisch werden, sind die Auswirkungen auf reguläre Melanozyten relativ milde (Qin et al. 2005). Dabei sind für Melanomzellen verschiedene Apoptosewege unter Proteasominhibition untersucht. Qin und Mitarbeiter fanden bei der Behandlung kultivierter Melanomzellen mit drei verschiedenen Proteasominhibitoren konstant eine Akkumulation des proapoptotischen BH3-only-Proteins NOXA (Qin et al. 2005), das mit dem mitochondrialen Apoptosemechanismus assoziiert ist, indem es antiapoptotische Proteine wie bcl-2 antagonisiert (Fletcher et al. 2006). Lesinki und Mitarbeiter stimulierten Melanomzellen unter Proteasominhibition mit Tumor necrosis factor-α (TNFα) und aktivierten so die extrinsische Apoptosekaskade, die ihren Ausgang im

Fas-Rezeptor und der FADD-abhängigen Stimulation von Caspasen nimmt (Lesinski et al. 2006).

Auch bei Ovarialkarzinomzellen wurde beobachtet, dass sie unter Proteasominhibition eher sterben als nicht neoplastische Vergleichszellen (Bazzaro et al. 2006). CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Probanden reagieren weniger sensibel auf Proteasominhibition als solche von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (Soligo et al. 2000). Neben der direkten Induktion von Apoptose wird auch beobachtet, dass Tumorzellen bei Kombinationstherapien mit Proteasominhibitoren für andere antineoplastische Therapien sensibilisiert werden (Mitsiades et al. 2005).

Trotz eines sicherlich noch lückenhaften Verständnisses der zellulären Mechanismen führten viel versprechende Labordaten zur klinischen Testungen des Borsäure-haltigen Proteasominhibitors Bortezomib, der bei Patienten mit anbehandeltem fortgeschrittenen multiplen Myelom eine so eindeutige Verbesserung gegenüber einer Dexamethason-Therapie bezüglich Krankheitsprogression, Therapieerfolg und Überleben darstellte, dass eine Phase III-Studie vorzeitig von der Studienaufsicht abgebrochen wurde und der neue Wirkstoff in einem Eilverfahren von der U.S. Food and Drug Administration zugelassen wurde (Kane et al. 2006). In Deutschland ist Bortezomib zur Behandlung des multiplen Myeloms nach mindestens einer vorangegangenen Therapie zugelassen. Studien zeigen, dass es als alleinige Therapie weniger wirksam ist als in Kombinationstherapien mit Dexamethason oder auch pegyliertem liposomalen Doxorubicin (Richardson et al. 2007). Unerwünschte Wirkungen treten unter anderem in Form peripherer Neuropathien, gastrointestinaler Beschwerden und Blutbildveränderungen auf (Kane et al. 2006, Richardson et al. 2007). Inzwischen wird beobachtet, dass Myelom-Zellen Resistenzen gegen Bortezomib entwickeln können, was die Wichtigkeit der Entwicklung von Alternativpräparaten zur Behandlung dieser Erkrankung unterstreicht (Oerlemans et al. 2008).

Eine Erweiterung des Spektrums klinisch einsetzbarer Proteasominhibitoren für Modifikationen im Wirk- und Nebenwirkungsprofil ist wünschenswert.

1.2.2 Andere potentielle Einsatzgebiete für Proteasominhibitoren

Neben ihrem Einsatz in der Grundlagenforschung und der Zulassung von Bortezomib gegen das Multiple Myelom sind weitere Einsatzgebiete für Proteasominhibitoren denkbar. Die Forschung mit Proteasominhibitoren beschränkt sich nicht nur auf

hämatologische Krebserkrankungen, es gibt ebenso viel versprechende Resultate gegenüber soliden Tumoren wie malignen Melanomen (z.B. Sorolla et al. 2008).

Weiterhin werden Tierstudien durchgeführt zur Evaluation von Proteasominhibition als mögliches Mittel gegen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Psoriasis und allergisches Asthma, wobei Transkriptionsfaktoren wie NFκB und die MHC-gekoppelte Antigenpräsentation eine Rolle zu spielen scheinen (Wang et al. 2006). Speziell im Fall der rheumatoiden Arthritis scheint ein Ungleichgewicht zu bestehen zwischen Proliferation und Apoptose der Typ B Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten, Zellen der Synovialmembran. Da die als Standard gegebenen immunmodulierenden Therapien dieses Ungleichgewicht nicht beheben, könnte die Induktion der Apoptose dieser Zellen durch Proteasominhibition eine neue Therapieoption darstellen (Brun et al. 2008).

Beim systemischen Lupus erythematoses (SLE), einer generalisierten Autoimmunerkrankung, spielen Antikörper gegen Doppelstrang-DNA und andere zelluläre Strukturen eine pathogenetische Rolle. Diese Antikörper werden von langlebigen Plasmazellen produziert, auf die bisherige Therapien wie Dexamethason oder Cyclophosphamid kaum einen Einfluss haben. In einem SLE-Mausmodell verringerte eine Bortezomib-Behandlung signifikant kurz- und langlebige Plasmazellen. Es trat weniger Lupus-assoziierte Nephritis auf und das Überleben wurde verbessert (Neubert et al. 2008).

Im Kontext entzündlicher Erkrankungen wäre es besonders wünschenswert, das Immunoproteasom spezifisch zu inhibieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die als Inhibitoren zu testende Substanzen sowohl gegen konstitutives als auch gegen Immunoproteasom getestet, um mögliche Unterschiede in der Affinität zu detektieren.

1.2.3 Aufbau und Wirkungsweise von Proteasominhibitoren

Um die Wirkungsweise von Proteasominhibitoren zu verstehen und neue potentiell klinisch einsetzbare Substanzen generieren zu können, bietet sich ein kurzer Überblick über bereits vorhandene Inhibitoren an. Die logische Zuordnung erfolgt dabei sinnvoller Weise nach folgenden Kriterien (nach Groll et al. 2004 & Kisselev et al. 2001):

1. Dem *strukturchemischen Aufbau*; grob lässt sich hier in die Gruppe der Inhibitoren mit Peptidgerüst und die Gruppe der restlichen Inhibitoren einteilen
2. Der *Bindungsform* am katalytischen Zentrum; kovalent oder nicht- kovalent (zum Beispiel mittels Wasserstoffbrücken)
3. Der *Reversibilität*
4. Der *Spezifität* für das Proteasom sowie der *Affinität* zu einzelnen katalytischen Untereinheiten
5. Dem *Vorkommen*: natürlich oder synthetisch

Anhand dieser Kriterien lassen sich beispielhaft die Eigenschaften einiger Proteasominhibitoren durchspielen, selbst wenn noch nicht jeder Inhibitor bezüglich aller Kriterien eingeordnet werden kann. So ist das bereits erwähnte *Bortezomib* ein synthetisch hergestellter Inhibitor mit einem Peptid-Gerüst, der das Proteasom spezifisch, langsam reversibel und mit einer Affinität hauptsächlich zu $\beta 5$ inhibiert. Chemisch wird von einer kovalenten Bindung ausgegangen (Kisselev et al. 2001, Williamson et al. 2006). *Salinosporamid A* ist hingegen ein natürlich vorkommendes Produkt obligat mariner Aktinomyzeten, das die Proteasomaktivität irreversibel inhibiert, sich jedoch in Assays von längerer Dauer als instabil erwiesen hat (Williamson et al. 2006). Der in der Forschung häufig verwendete Inhibitor *Epoxomicin* ist ein natürliches Produkt ohne Peptidgerüst, das kovalent an die proteasomalen $\beta 2$ - und $\beta 5$ -Untereinheiten bindet und sie irreversibel blockiert. Bei einer Inhibitorkonzentration von 2 μM ist die chymotrypsin-ähnliche Aktivität um 96 %, die trypsin-ähnliche um 83 % verringert. Trotz einer großen Spezifität für das Proteasom vermittelt diese starke irreversible Hemmung eine Zytotoxizität, die den klinischen Einsatz unwahrscheinlich macht (Groll et al. 2004, Kisselev et al. 2006). *PR-171* ist ein Abkömmling von Epoxomicin und inhibiert vor allem die $\beta 5$ -Untereinheit. Zwar sahen Demo und Mitarbeiter in der Zellkultur eine größere Zytotoxizität als Bortezomib gegenüber verschiedenen Zelllinien, die Substanz war jedoch im Tierversuch für Nagetiere gut verträglich und limitierte das Tumorwachstum eingepflanzter menschlicher Tumore (kolorektales Karzinom, Burkitt-Lymphom und B-Zell-Lymphom) signifikant besser als Bortezomib (Demo et al. 2007). *Lactacystin* (PS-519 oder Omuralid) ist ein ebenfalls natürlich vorkommendes Produkt aus einer Streptomyces Art, das vor allem die $\beta 5$ -

Untereinheit mittels einer kovalenten Bindung irreversibel inhibiert, schwächer $\beta 2$ und $\beta 1$ (Fenteany et al. 1995). *NPI-0052* ist ein kürzlich gefundener natürlich vorkommender nicht-Peptid Inhibitor, der das Proteasom mittels kovalenter Bindung irreversibel bindet. In vitro zeigte sich ein gutes Ansprechen von multiplen Myelom-Zellen auf diesen Inhibitor bei relativ geringer Zytotoxizität für normale Lymphozyten; ein klinischer Einsatz ist somit denkbar (Chauhan et al. 2006). Syringolin A (*SyrA*) ist ein Peptidderivat pflanzenpathogener Bakterien, das als irreversibler Proteasominhibitor vor allem der chymotrypsin-ähnlichen Aktivität ($\beta 5$) fungiert. Es bindet kovalent an das aktive Threonin des Proteasoms und inhibiert andere Proteasen wie Papain und Trypsin selbst in höheren Konzentrationen nicht, anders als zum Beispiel das schon lange bekannte und in der Forschung viel verwendete Peptid *MG132*, ein reversibler und unspezifischer Proteasominhibitor (Groll et al. 2008).

Allgemein sollte ein Inhibitor so beschaffen sein, dass er eine chemisch reaktive Gruppe, beispielsweise ein Aldehyd enthält, das mit dem aktiven Threonin des proteolytischen Zentrums der proteasomalen Untereinheit reagiert und so die eigentliche Inhibition vornimmt. Die Art dieser Bindung entscheidet mit darüber, ob die Inhibition reversibel oder irreversibel ist. Diese chemisch reaktive Gruppe ist Teil eines Moleküls, das sich durch seine dreidimensionale sowie seine elektrostatische Struktur möglichst nach einem Schlüssel-Schloss-Prinzip in die proteasomalen Bindungstaschen einpasst, um Spezifität zu garantieren. Einen Schritt weiter gedacht könnte diese Struktur so aussehen, dass sie ausschließlich in die Bindungstaschen einzelner, eventuell sogar immunoproteasomaler Untereinheiten passt.

1.2.4 Neue Substanzen als potentielle Inhibitoren

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 28 neue Verbindungen bezüglich ihrer inhibitorischen Eigenschaften überprüft. Diese Substanzen wurden von H. A. Braun und S. Umbreen der Arbeitsgruppe B. Schmidt der TU Darmstadt synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Als Ausgangssubstanz für die Synthese diente der bekannte und gut charakterisierte Proteasominhibitor *MG132*. An seinem Tripeptidgerüst wurden in einem strukturierten Ansatz jeweils zwei Seitenketten verändert, wie in *Abbildung 2* des *Material und Methoden* Teils nachvollzogen werden kann (Abschnitt 3.1.6). Ziel dieser

Modifikationen war die Schaffung von Substanzen, die mit ihren chemisch reaktiven Gruppen direkt mit dem N-terminalen Threonin der proteolytischen Untereinheiten des Proteasoms interagieren und die sich mit ihrer dreidimensionalen Struktur optimal in die proteasomalen Bindungstaschen einfügen.

1.3 Zielsetzung

Durch Modifizierung des Proteasominhibitors MG132 wurde eine Reihe neuer, potentiell inhibitorischer Substanzen generiert.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der zur Verfügung gestellten Substanzen hinsichtlich der Proteasominhibition. Dabei wurde ihre Affinität zu den einzelnen proteolytischen Proteasomuntereinheiten des konstitutiven und des Immunoproteasoms, ihre Membrangängigkeit und Verteilung innerhalb der Zelle sowie ihre Wirkung auf vier Tumorzelllinien in der Zellkultur getestet.

2 Abkürzungsverzeichnis

AMC (auch: amc)	7-amino-4-methylcoumarin
BODIPY	Dipyrrromethene boron difluoride
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FU	Fluorescence Units
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MHC	Major Histocompatibility Complex
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TFA	Trifluoressigsäure

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Gebrauchslösungen

(Markennamen sind nicht eigens als solche gekennzeichnet)

SUBSTANZ	HERSTELLER
Acrylamid	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Bortezomib	Millenium
Protein-Assay Frabstoffkonzentrat	Bio-Rad
beta-Mercaptoethanol	ROTH
Bromphenolblau	ROTH
Coomassie	SERVA
Coumarinsäure	Merck
4',6-Diamidino-2-phenylindol (Dapi)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ROTH
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
fluorogene Substrate	BACHEM
Gelatine	Difco
H ₂ O ₂	AppliChem
Ham's F-12-Medium	Biochrom AG
Hepes	ROTH
Immu-Mount	Thermo Electron Corporation
KCl	Merck
Kristallviolett	Feinchemie K.H. Kallies KG
Luminol	Fluka
Methanol	Merck
MG132	CALBIOCHEM

Magnesium-Acetat (MgAc ₂)	ROTH
MgCl ₂	ROTH
NH ₄ Cl	ROTH
Nonidet P40 (NP 40)	AppliChem
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin & Streptomycin	Biochrom AG
Peptid Kloe1 RLMYDMYPHFMPPTNLGPSEKRVWMS- CONH ₂	synthetisiert von Dr. P. Henklein, Charité
Proteaseinhibitor Complete	Roche Diagnostics GmbH
Proteinmarker	Fermentas Life Sciences
Rotiblock	ROTH
RPMI-Medium	Biochrom AG
Saponin	BioChemika
Tetramethyldiamin (TEMED)	AppliChem
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka
TrisHCl	AppliChem
Trypsin-Medium	PAA
Tween 20	AppliChem

3.1.2 Kits

Cytotoxicity Detection Kit	Roche
----------------------------	-------

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

MATERIALIEN	HERSTELLER
96-well-Mikrotiterplatten	Greiner
Kulturschalen und -platten	Greiner
PVDF-Membran	MILLIPORE
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell

3.1.4 Antikörper

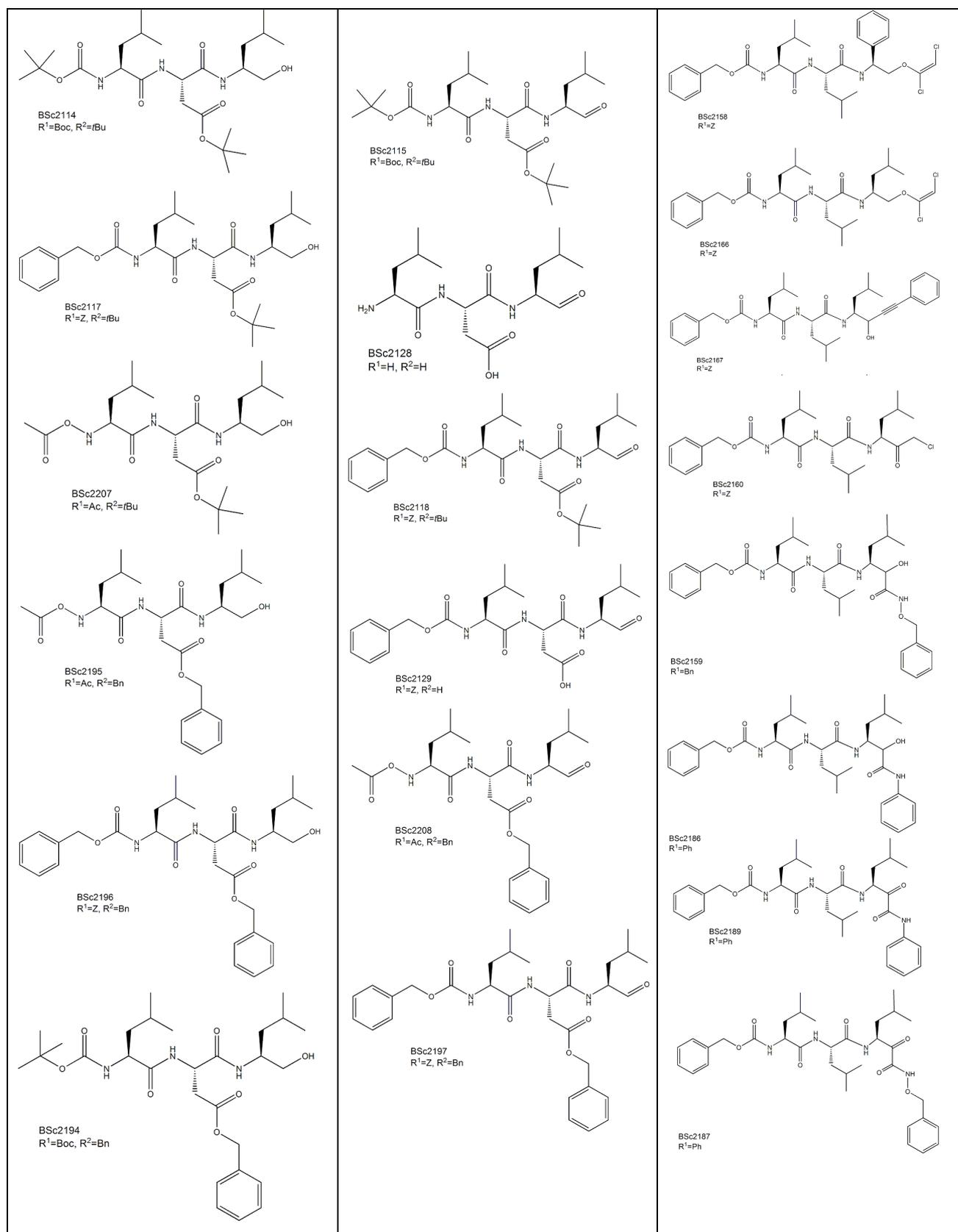
ANTIKÖRPER	HERSTELLER
GAPDH-Antikörper	SantaCruz
Ubiquitin-Antikörper	FK2 (Biomol)
Proteasom-Antikörper	HP903 monoklonal gegen natives humanes Proteasom mouse (Biogenes)
Proteasom-Antikörper	polyklonal rabbit (Dako)

PROTEASOM	
	Aufreinigung siehe Methodenteil 3.2.3
konstitutives 20S-Proteasom	aus Erythrozyten oder T2-Zellen
20S-Immunoproteasom	aus T2.27-Zellen (mit Immuno- Untereinheiten transfizierte T2-Zellen)

3.1.5 Geräte

GERÄTENAME	HERSTELLER
Plattenreader Synergy-HAT	Bio-Tek
Phospho-Imager FLA-3000	Fujifilm
FPLC Äkta mit MonoQ-Säule HR 5/5	Amersham Pharmacia GE
HPLC Gold	Beckman & Coulter
HPLC-Säule Micra NPS RP18 1.5µm	MICRA
Ultrazentrifuge L7; SW40	Beckman & Coulter
Gelsystem GE 250	Hoefler

3.1.6 Zu testende Substanzen



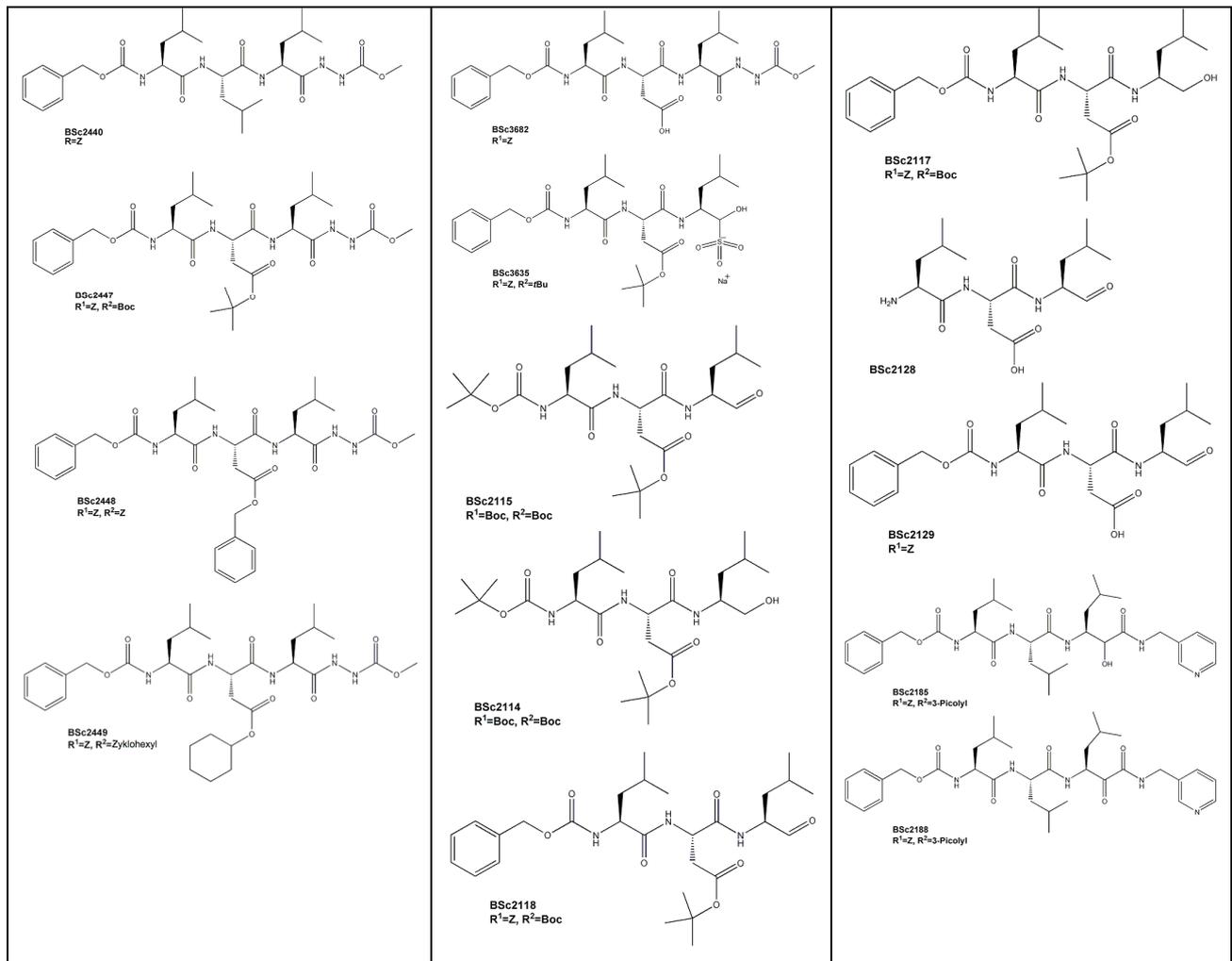


Abb. 2 Alle zu testenden Substanzen als chemische Strukturformel mit Benennung der Seitenketten

3.2 Methoden

3.2.1 Abbau fluorogener Substrate durch isoliertes Proteasom

Puffer: TEAD: 20 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT; pH 7,2

Substrate

- Suc-LLVY-amc (für Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, β 5-Untereinheit)
- Z-VGR-amc (für Trypsin-ähnliche Aktivität, β 2-Untereinheit)
- LLE-amc (für Caspase-ähnliche Aktivität, β 1-Untereinheit)

Proteasom

- konstitutives Proteasom aus humanen Erythrozyten
- Immunoproteasom aus T2.Triple-Zellen (mit Immununtereinheiten transfizierte T2-Zellen)

Testansätze

Enzymkinetik in Abhängigkeit der InhibitorKonzentration:

Pro Testansatz wurden 100ng Proteasom mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (Endkonzentration 0,1-10 μM) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (schwarze 96-well-Platte). Als positive Kontrolle wurde MG132 verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Substratlösung (50 μM Endkonzentration) gestartet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurde die Mikrotiterplatte im Plattenreader bei einer Anregung von 360 nm Wellenlänge mit einem Emissionsfilter für 460 nm gemessen. Die gemessene Emission ist direkt proportional zur freien AMC Menge in der Kavität und somit ein Maß der Peptiddegradation pro Zeiteinheit.

Enzymkinetik in Abhängigkeit der Substratkonzentration

Pro Testansatz wurden 100 ng Proteasom mit 0,1 μM Inhibitor (Endkonzentration) vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Substratlösung (Endkonzentration 50-200 μM) gestartet. Die Messung erfolgte nach einer Stunde wie oben beschrieben.

Enzymkinetik in Abhängigkeit der Inkubationszeit

Auswertung der Testansätze nach 1, 2, 4 und 24 Stunden.

Verdünnungsreihe zur Testung der Reversibilität der Hemmung

In 50 μl Testansätzen wurden 200 ng Proteasom mit 1 μM Inhibitor 1 h bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Testansätze wurden mit Puffer auf verschiedene Endvolumina verdünnt (50; 100; 150; 200 μl) und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Suc-LLVY-amc-Substrat wurde so zugegeben, dass die Konzentration in allen Ansätzen einheitlich 50 μM betrug. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde wie oben beschrieben gemessen.

Alle Inhibitoren wurden in mindestens zwei Versuchen mit jeweils Vierfachwerten getestet.

3.2.2 Verdau eines synthetischen 25mer Peptids in Anwesenheit von Proteasominhibitoren

3.2.2.1 Verdau-Ansätze

Puffer: 20 mM Tris, 2 mM MgAc₂, 2 mM DTT, pH 7,8

Zu 150 µl Puffer wurden 2 µg Proteasom sowie Inhibitoren in einer Endkonzentration von 1 µM gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7,7 µg Kloe1-Peptid gestartet. Die Probe wurde in drei Teile von 50 µl aufgeteilt für jeweils einen Kontrollwert (0 Stunden), einen 4 Stunden Inkubationswert und einen 20 Stunden Inkubationswert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1vol 3% TFA gestoppt.

3.2.2.2 Auswertung mittels HPLC

Die generierten Peptide wurden über eine C18-HPLC-Säule mit einem Acetonitril-Gradienten getrennt. Die generierten Fragmente wurden bei 220 nm Wellenlänge detektiert.

Die Trennung an der HPLC wurde von Fr. Dr. Ulrike Kuckelkorn, die anschließende Massenspektrometrie von Frau Katrin Textoris-Taube durchgeführt (beide Institut für Biochemie, Charité Campus Mitte, Berlin).

3.2.3 Proteasompräparation aus Erythrozytenkonzentrat

Puffer:

TEAD: s.o.

PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,3

Puffer für Ionenaustausch:

100 mM NaCl in TEAD

500 mM NaCl in TEAD

Puffer für Saccharosegradient:

10% Saccharose, 50 mM NaCl in TEAD

40% Saccharose, 50 mM NaCl in TEAD

Materialien:

DEAE-Sephacel 17-0500-01 (Amersham Pharmacia GE)

Durchführung:

Die Proteasominsolation erfolgt bei 4°C.

Nach dreimaligem Waschen der Erythrozyten mit PBS wurden sie mittels 1 mM DTT aufgeschlossen, zentrifugiert (1,5h; 10.000 rpm) und der Überstand über Nacht mit der DEAE-Sepharose inkubiert. Die auf eine Säule gegebene Gel-Suspension wurde mit 100 mM NaCl gewaschen, bis keine Proteine mehr im Eluat nachzuweisen waren, dann erfolgte die Elution mit 500 mM NaCl, von der Fraktionen gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden wie oben beschrieben durch Verdau des fluorogenen Substrats Suc-LLVY-amc auf ihre Aktivität getestet und die Fraktionen hoher Aktivität vereinigt. Nach einer Proteinfällung mit 35% Ammoniumsulfat und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet verworfen, der Überstand weiter bis 75% mit Ammoniumsulfat aufgesättigt, um das Proteasom zu fällen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in TEAD 50mM NaCl aufgenommen und auf einen Saccharosegradienten (10-40%) gegeben. Eine Ultrazentrifugation (16h, 40.000 rpm) führte zu einer dichteabhängigen Sedimentation der Proteine, Fraktionen wurden gesammelt und wiederum auf Aktivität getestet. Die zusammengeführten aktiven Fraktionen wurden einer über Nacht Dialyse gegen TEAD 100 mM NaCl unterzogen und in selbiger Lösung verdünnt. Die filtrierte Probe (0,2 µm Porengröße) wurde in der FPLC auf eine MonoQ-Säule aufgetragen und ein linearer NaCl-Gradient von 200 bis 350 mM NaCl gefahren. Bei etwa 270 mM NaCl wird das Proteasom von der Säule eluiert. Fraktionen wurden gesammelt und wiederum auf ihre Aktivität getestet. Der Proteingehalt wurde mittels einer Messung der optischen Dichte bei 280 nm bestimmt, hierbei entspricht 1 OD einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Die Reinheit des Proteasoms wurde mithilfe einer SDS-Page ermittelt.

Ein Großteil des verwendeten Proteasoms wurde von Fr. Ilse Drung und Fr. Dr. Ulrike Kuckelkorn zur Verfügung gestellt. Immunoproteasom wurde analog isoliert.

3.2.4 SDS-Page modifiziert nach Laemmli (Laemmli 1970) und Western-Blot

Puffer & Gele

4x SDS-Probenpuffer

250 mM TrisHCl pH 7; 40% (w/v) Glycerol; 16,7% β-Mercaptoethanol; 9% (w/v) SDS; 0,1% Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

Blotpuffer

800 ml SDS-Laufpuffer + 200 ml Methanol

Sammelgel 5%

167 mM TrisHCl pH 8,8; 5% (v/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,07% (w/v) APS;
0,05% (v/v) TEMED

Trenngel 15%

375 mM TrisHCl pH 8,8; 15% (v/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,07% (w/v) APS;
0,075% (v/v) TEMED

PBS (s.o.)

PBST

PBS mit 0,1% Tween

ECL-Lösung

20 ml TrisHCl (100 mM) pH 8,5; 100 µl Luminol (250 mM); 44 µl Coumarinsäure
(90 mM); 6 µl H₂O₂ (30%)

Durchführung

Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, für 1,5 min auf 95°C oder schonender 5 min auf 60°C erhitzt und auf 15%ige Acrylamid-Gele aufgetragen. Eine Spannung von 80 V wurde angelegt, bis die blaue Bromphenol-Lauffront das Trenngel erreicht hatte, dann wurde weiter mit maximal 130 V aufgetrennt, bis die Lauffront aus dem Gel lief. Für die Fluoreszenzversuche wurde das nicht angefärbte Gel direkt im Phospho-Imager ausgewertet, später dann mit Coomassie gegengefärbt.

Zum Blotten wurde das Gel auf eine mit Methanol aktivierte und in destilliertem Wasser gespülte PVDF-Membran gelegt. Zwischen jeweils drei in Blotpuffer getränkten Whatman-Papieren wurden Gel und Membran in eine Blotkammer eingespannt, die Membran zur Anode weisend. Die Proteine wurden 1 h mit 400 mA vom Gel auf die Membran transferiert.

Die Membran wurde 1 h unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur mit Rotiblock, dann mindestens 1,5 h mit dem ersten Antikörper in der angegebenen Verdünnung (siehe Tabelle) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (10-15 min) wurde der zweite Antikörper zugegeben. Als erste Antikörper kamen in aller Regel Kaninchenantikörper zum Einsatz, der zweite, POD-markierte Antikörper richtete sich

gegen deren Fc-Teil, Verdünnung 1:5000, Inkubationszeit 1 h. Nach nochmaligem Waschen wie oben beschrieben wurde die Membran 1 min in ECL-Lösung getaucht. Die Chemielumineszenz wurde durch Auflegen von Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

3.2.5 Zellkultur

Zellen & Medien

HeLa-Zellen wurden in RPMI-Medium, DU 145- und A549-Zellen in F12-Medium kultiviert. Alle Medien wurden mit 10% FCS, 100 U/l Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und Glutamin (2 mM Endkonzentration) versetzt.

Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in Kulturschalen von 10 cm Durchmesser bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

Zum Ablösen der Zellen kamen Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-freies Medium oder Trypsin-Medium zum Einsatz.

Für Inhibitorenversuche wurden die Zellen in 96-well-Platten überführt, für Fluoreszenzmikroskopie auf Objektträgern in Kulturschalen oder Deckgläschen in 6-well-Platten kultiviert.

3.2.5.1 Abbau fluorogener Substrate durch zelluläre Proteasen

Lysepuffer: 100 mM Hepes, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, DTT 5 mM, 0,5% NP40, 2x Complete

Auf 96-well-Platten ausgelegte Zellen wurden mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen für 2 Stunden inkubiert. Nach Dekantieren des Mediums, Waschen mit 200 µl PBS pro Kavität und Zugabe von 100 µl Lysepuffer wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis geschüttelt. 20 µl des Lysats wurden mit 100 µM fluorogenem Substrat (Endkonzentration) in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und wie oben beschrieben im Plattenreader gemessen.

Um den Proteingehalt zu bestimmen, wurde mit einem Teil des Lysats eine Proteinbestimmung nach Bradford vorgenommen. In einer durchsichtigen 96-well-Platte wurden 10 µl Lysat pro Kavität mit 100 µl Protein-Assay (Bradford-Reagenz), 1:5 verdünnt, versetzt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm.

3.2.5.2 Intrazellulärer Nachweis proteasomaler Substrate unter Proteasominhibition

Auf eine 6-well-Platte ausgelegte HeLa-Zellen wurden 2 Stunden mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors BSc2118 inkubiert. Danach erfolgte die Lyse wie oben beschrieben. Nach Abzentrifugation (14.000 rpm, 4°C, 10 min) wurde eine durch Bradford-Assay auf den Proteingehalt normierte Menge des Überstands auf ein 15%iges Acrylamidgel aufgetragen und SDS-Page sowie Western-Blot durchgeführt (s.o.).

Die Inkubation der Membran erfolgte mit dem Ubiquitin-Antikörper FK2 sowie in einem zweiten Schritt zur Ladekontrolle mit GAPDH Antikörper.

3.2.5.3 Messung des zytotoxischen Effekts von Proteasominhibitoren

Puffer:

- PBS: s.o.
- Kristallviolett, gelöst in PBS

Nach 48-stündiger Vorinkubation der Zellen auf durchsichtigen 96-well-Platten mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100 µl Puffer gewaschen. Somit waren die toten, nicht mehr adhärenen Zellen aus dem Überstand entfernt. Der verbliebene Rest der Zellen wurde mit einer Färbelösung von 0,1% Kristallviolett versetzt und bei Raumtemperatur 30 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Färbelösung wurde durch Untertauchen der Platte in destilliertem Wasser entfernt und die angefärbten Zellen durch Zugabe von 200 µl einer 0,2%igen NP40-Lösung in PBS unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur für eine Stunde lysiert.

Durch eine Absorptionsmessung bei 550 nm konnte die relative Menge der verbliebenen blauen Farbe bestimmt und somit Rückschlüsse auf die Menge

überlebender Zellen gezogen werden, prozentual bezogen auf ein Lysat von Kontrollzellen ohne Inhibitor.

3.2.5.4 Messung der Laktatdehydrogenase im Überstand

HCT116 und DU145 Zellen wurden 48 h mit Inhibitoren inkubiert. 100 µl des zellfreien Überstands wurden mit dem gleichen Volumen des Reaktionsgemischs (nach Herstellerangaben) des Cytotoxicity Detection Kit versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine duale Absorptionsmessung bei 490 nm mit einer Referenz von 595 nm.

3.2.6 Untersuchung der Interaktion von Farbstoff gekoppeltem Inhibitor (Kloe455al) mit Proteasom

Kloe455al: BSc2118+BodipyFL (Fluoreszenzeigenschaften: Ex 475 nm, Em 525 nm)

3.2.6.1 SDS-Page und Auswertung im Phospho-Imager

Jeweils 2 µg Proteasom wurden mit Kloe455al (1-25 µM) für 15 min auf Eis vorinkubiert. Die Testansätze wurden mit SDS-Probenpuffer 1,5 min auf 60°C erhitzt und auf ein 15%iges Polyacrylamid-Gel im Dunkeln bei 100 V getrennt. Das Polyacrylamid-Gel wurde im Phospho-Imager ausgewertet, danach erfolgte eine Kontrollfärbung mit Coomassie.

3.2.7 Verteilung von Kloe455al in Zellen und morphologische Korrelate der Inhibition

3.2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Puffer: PBS (s. o.)

Waschlösung: 0,01% Saponin, 0,25% Gelatine in PBS

1. Antikörper: siehe jeweilige Abbildungsbeschriftung

2. Antikörper: je nach 1. Ak: goat-anti-rabbit oder goat-anti-mouse, farbstoffgekoppelt mit Alexa488 (grün) oder Alexa568 (rot)

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern oder Objektträgern kultiviert. Proteasominhibitoren in der Konzentration von 1 μ M wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 10 min in 4% Paraformaldehyd fixiert, dreimal 5 min mit 50 mM NH_4Cl sensibilisiert, 30 min mit 0,1% NP40 in Waschlösung permeabilisiert, 20 sec in Waschlösung gewaschen und 15 min mit 1% Serum in Waschlösung blockiert.

Der erste Antikörper wurde für 30 min bei Raumtemperatur zugegeben, es schlossen sich vier fünfminütige Waschschrte in Waschlösung und zwei kurze Waschschrte mit PBS an.

Nach einer 45-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper wurde nach selbem Schema nochmals gewaschen. Die Kerne wurden wenige Sekunden mit Dapi angefärbt und die Zellen kurz mit PBS gewaschen. Abschließend erfolgte die Einbettung in Immu-Mount; jeweils ein Tropfen Immu-Mount wurde benutzt, um die Zellen zwischen Deckglas und Objektträger einzubetten. Nach dem Trocknen des Immu-Mount über Nacht konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden, die Wellenlängen wurden entsprechend der Farbkoppelung des zweiten Antikörpers gewählt.

Am Fluoreszenzmikroskop angefertigte Fotoaufnahmen, die in dieser Arbeit im direkten Vergleich zueinander stehen, wurden mit den gleichen Einstellungen des Mikroskops und Computers erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 In-vitro-Testung der potentiellen Inhibitoren

Die Messung der Enzymaktivität des aufgereinigten 20S-Proteasoms über den Verdau fluorogener Peptide stammt aus einer Zeit, bevor das Proteasom seinen Namen erhielt (Wilk et al. 1983), ist gut etabliert und bietet sich zu einer ersten orientierenden Testung des inhibitorischen Potentials neu generierter Substanzen an.

Es wurden sowohl konstitutives Proteasom als auch Immunoproteasom eingesetzt, um mögliche Unterschiede in der Spezifität der Inhibitoren zu detektieren. Die Menge des Enzyms sowie die Konzentration der Substrate wurde in allen Versuchen konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Die Auswertung erfolgte grafisch und die IC_{50} Werte wurden ermittelt (*Tabelle 1*). Der IC_{50} -Wert gibt die Konzentration des Inhibitors an, bei der 50% der enzymatischen Aktivität gehemmt sind.

4.1.1 Hemmung des Proteasoms durch BSc2118

Die *Abbildungen 4 a-f* zeigen exemplarisch die Grafen zu den Versuchen mit dem Inhibitor BSc2118 (Strukturformel in *Abbildung 3*).

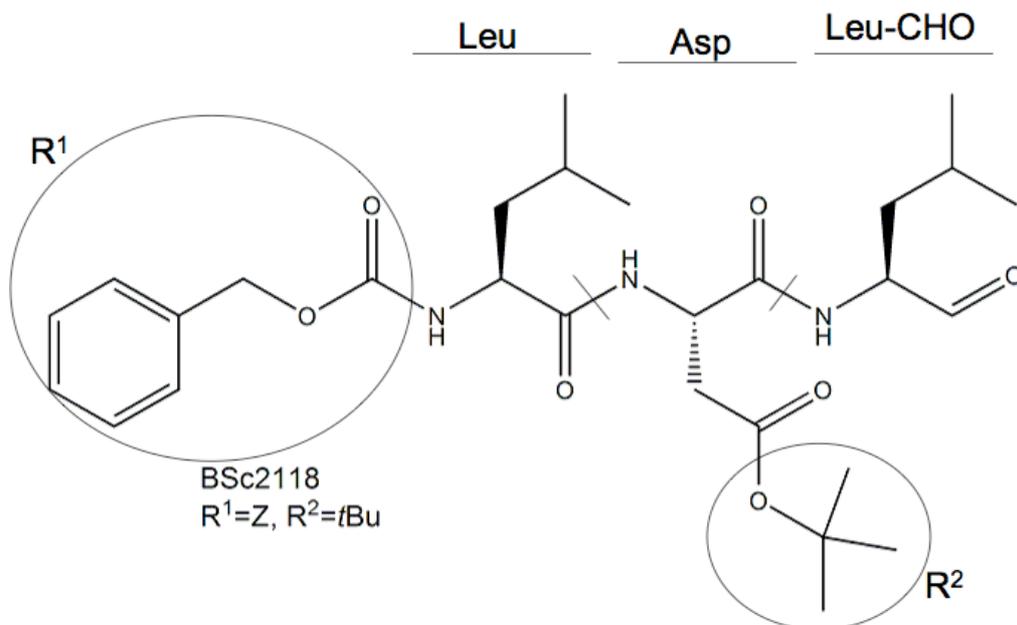


Abb. 3 Strukturformel des Aldehyd-Inhibitors BSc2118

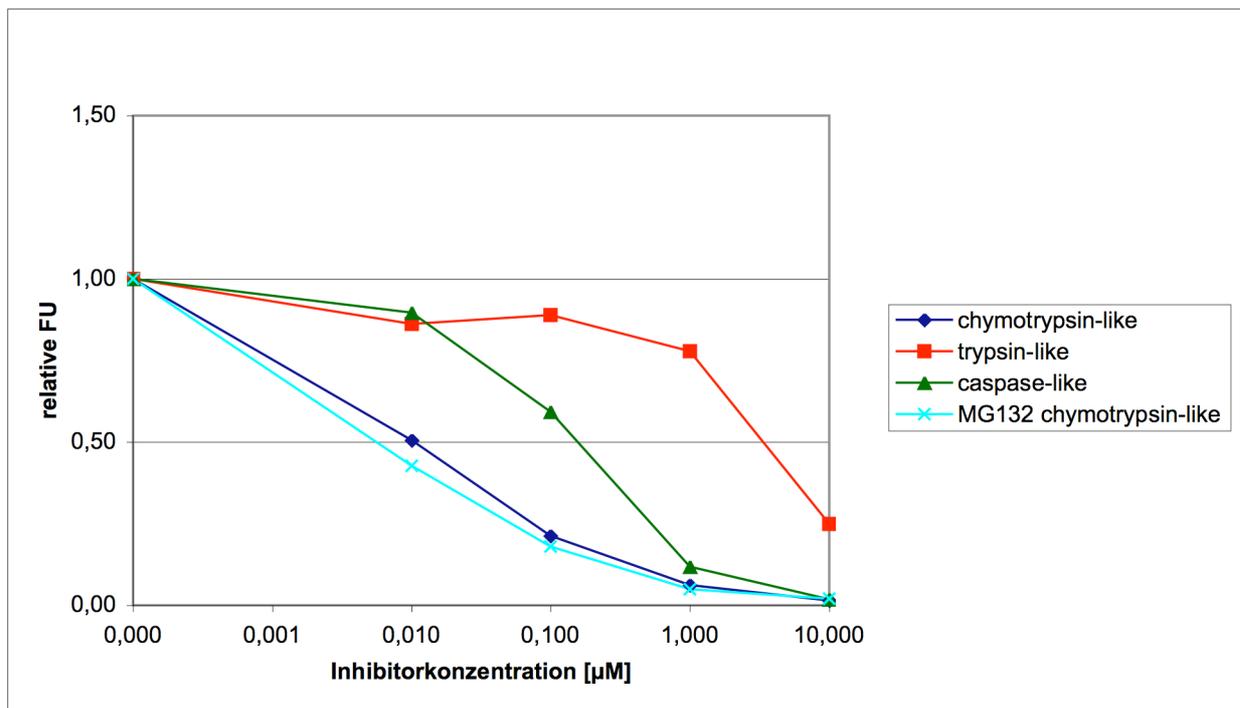


Abb. 4 **Inhibition des Proteasoms durch BSc2118**. Darstellung der proteasomalen Aktivität in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration des Aldehyd-Inhibitors BSc2118 (MG132 als Kontrolle). Die Testung erfolgte an isoliertem Proteasom mittels fluorogener Peptide. Es wurden die drei verschiedenen enzymatischen Aktivitäten des konstitutiven Proteasoms bestimmt (Darstellung in relativen Fluoreszenz-Units).

Die Inhibitorkonzentration ist auf der logarithmisch skalierten X-Achse aufgetragen. Die Y-Achse gibt die gemessene Fluoreszenz wieder, die direkt proportional zum freigesetzten AMC ist. Das in einer Stunde Inkubationszeit abgespaltene AMC ist Maß der Degradationsgeschwindigkeit des Substrats und somit der proteasomalen Enzymaktivität. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgt die Darstellung der Enzymaktivität relativ, bezogen auf den Kontrollwert ohne Inhibitor.

Man erkennt eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität mit steigenden Inhibitorkonzentrationen. Vor allem die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der β 5-Untereinheit des Proteasoms wird schon durch 100 nM des Inhibitors deutlich gehemmt, 1 μ M BSc2118 hemmt die Aktivität nahezu vollständig. Die Ergebnisse der Inhibitor-Testungen gegen Immunproteasom entsprachen den hier gezeigten Daten des konstitutiven Proteasoms, eine besondere Affinität zu den proteasomalen Immununtereinheiten konnte für keine der getesteten Substanzen gezeigt werden.

Darstellung der IC₅₀-Werte

katalytische Untereinheit	IC ₅₀ [µM]		
	β5	β2	β1
Inhibitor			
BSc2114	>10	0,053	>10
BSc2117	>10	5,481	>10
BSc2207	>10	-	-
BSc2195	>10	-	-
BSc2196	>10	-	-
BSc2194	>10	-	-
BSc2115	0,382	0,495	0,098
BSc2128	>10	>10	>10
BSc2118	0,058	0,155	1,791
BSc2129	7,26	>10	>10
BSc2208	-	-	-
BSc2197	1,731	-	3,122
BSc2158	-	-	-
BSc2166	>10	>10	>10
BSc2167	1,303	-	-
BSc2160	2,196	-	-
BSc2159	-	-	-
BSc2185	-	-	-
BSc2186	0,981	-	-
BSc2187	0,441	-	1,720
BSc2188	0,350	-	7,966
BSc2189	0,072	-	>10
BSc2440	-	-	-
BSc2447	-	-	-
BSc2448	-	-	9
BSc2449	3,8	-	-
BSc3682	-	-	-
YVEL-VE	-	5	-

Strich (-): keine Inhibition

Tab. 1. Tabelle der in vitro ermittelten IC₅₀-Werte der zu testenden Substanzen modifiziert und ergänzt nach Braun (Braun 2005)

Wie in *Tabelle 1* dargestellt, zeigten viele der getesteten Substanzen keine inhibitorischen Eigenschaften oder inhibierten das Proteasom erst bei hohen Konzentrationen. Die niedrigsten IC₅₀-Werte wies der Aldehyd-Inhibitor BSc2118 auf, so dass dieser Inhibitor weiter charakterisiert wurde und Ausgangssubstanz für chemische Modifikationen war.

Zu beachten ist auch die erfolgreiche Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität (β5-Untereinheit) durch die Substanz BSc2189 (IC₅₀ 0,072 µM). BSc2114 zeigte eine besondere Affinität zur β2-Untereinheit, erwies sich jedoch als chemisch instabil und stand für weitere Versuche nicht zur Verfügung.

Auf der Suche nach einem spezifischen Inhibitor der β 2-Untereinheit synthetisierte Dr. Peter Henklein aus dem Institut für Biochemie der Charité den von Marastoni und Mitarbeitern publizierten Vinylester YVEL-VE (Marastoni et al. 2006) und stellte ihn für Testungen zur Verfügung. Eine Inhibition der β 2-Untereinheit konnte beobachtet werden, jedoch erst im mikromolaren Bereich.

4.1.2 In-vitro-Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften von BSc2118

4.1.2.1 Nicht-kompetitive Hemmung durch BSc2118

Um die inhibitorischen Eigenschaften der Substanz BSc2118 eingehender zu charakterisieren, wurde getestet, ob die proteasomale Hemmung durch BSc2118 kompetitiver Natur ist. Ein kompetitiver Inhibitor konkurriert mit dem Substrat um die Bindungstasche, ein nicht-kompetitiver Inhibitor wird auch durch hohe Substratkonzentrationen nicht von der Bindungstasche verdrängt. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine konstante Menge Proteasom (100 ng) mit steigenden Substratkonzentrationen inkubiert (*Abbildung 5*).

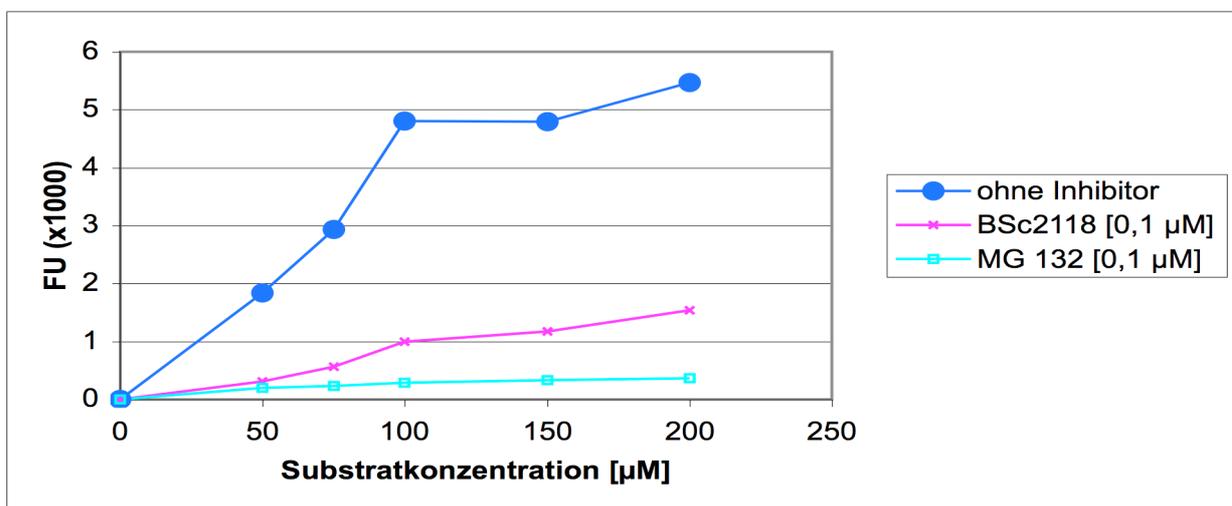


Abb. 5 **Untersuchung der Substratabhängigkeit proteasomaler Aktivität unter dem Einfluss von BSc2118 und MG132.** 100 ng Proteasom mit und ohne 100 nM BSc2118 (rot) und MG132 (grün) wurden mit steigenden Substratmengen inkubiert. Der Verlauf der proteasomalen Aktivität unter Inhibition mit BSc2118 deutet auf eine nicht-kompetitive Hemmung hin.

Die proteasomale Aktivität ohne Inhibitor hat bei 100 μM Substrat das Sättigungsniveau erreicht (blaue Kurve). Die proteasomale Aktivität unter Inhibition mit dem Inhibitor MG132 (grüne Kurve) und dem Inhibitor BSc2118 (rote Kurve) nähert sich auch bei einem deutlichen Substratüberschuss von 200 μM nicht dem Aktivitätsniveau des ungehemmten Proteasoms an. Es kann von einer nicht-kompetitiven Hemmung des Proteasoms durch diese beiden Substanzen ausgegangen werden.

4.1.2.2 Stabile Bindung von BSc2118 in der Zeitabhängigkeit

In weiteren Versuchen zeigte sich, dass der Inhibitor BSc2118 über die Zeit hinweg stabil gebunden ist (*Abbildung 6*).

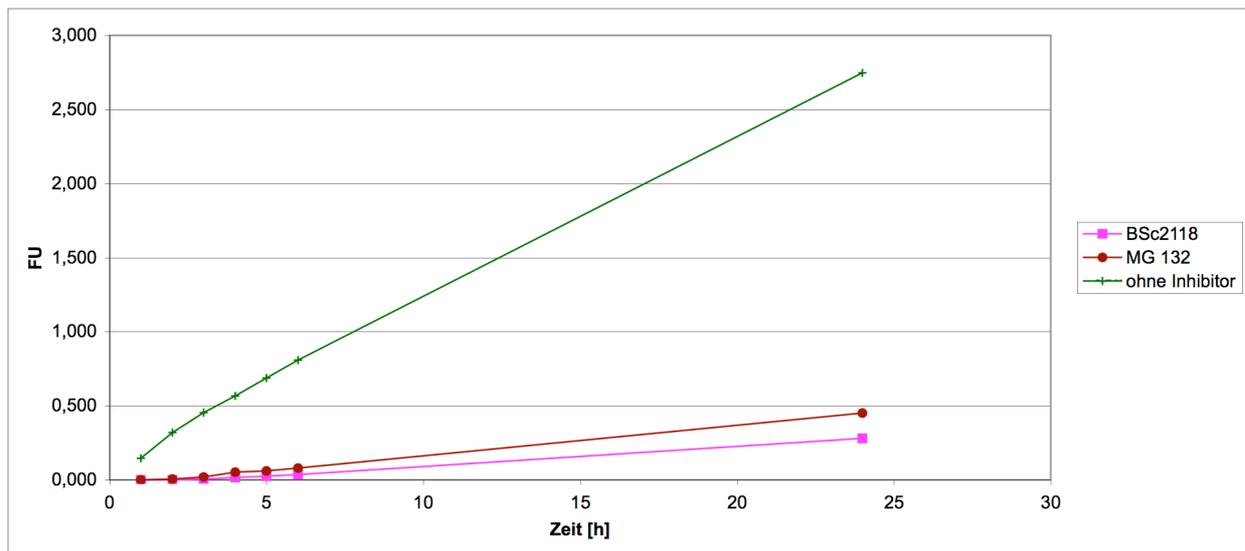


Abb. 6 **Untersuchung proteasomalen Aktivität unter Einfluss von Inhibitoren in der Zeitabhängigkeit.** Messung des Proteasom-Assays zu verschiedenen Zeitpunkten. Die flache Linearität der Inhibitorkurven lässt auf eine über die Zeit stabile Bindung zwischen Enzym und Inhibitor schließen.

4.1.2.3 Reversible Bindung von BSc2118 und BSc2189 an das Proteasom

Um die Frage nach der Reversibilität der Bindung zu beantworten, wurde ein Verdünnungsexperiment durchgeführt. Nach einstündiger Vorinkubation von 200 ng Proteasom mit Inhibitor (1 μM) wurden die Versuchsansätze verdünnt. Es entstanden Verdünnungen von 1:2, 1:3 und 1:4, die eine weitere Stunde inkubiert wurden.

Ein irreversibler Inhibitor bleibt unabhängig von der Verdünnungsstufe fest an die aktiven proteasomalen Untereinheiten gebunden, ein reversibel gebundener Inhibitor dissoziiert bei hohen Verdünnungsstufen vermehrt ab, was eine steigende Enzymaktivität zur Folge hat.

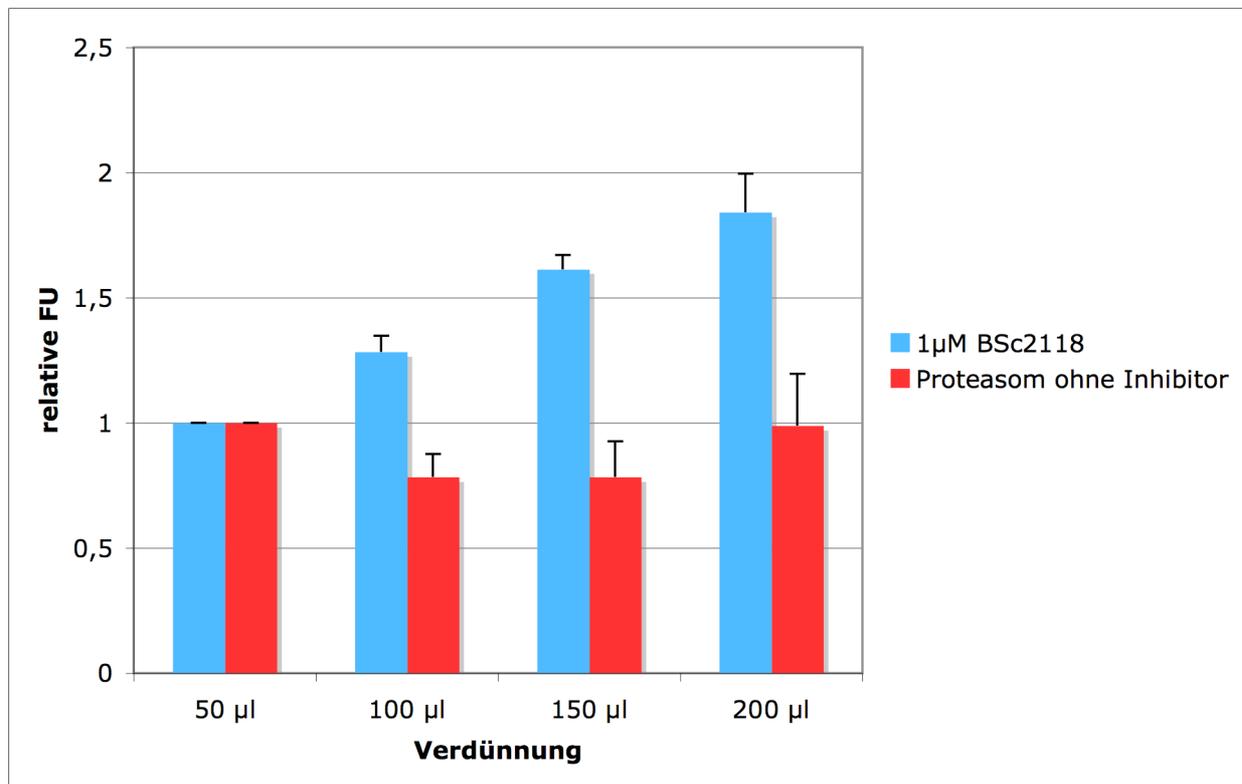


Abb. 7 **Untersuchung zur Reversibilität der BSc2118-Bindung an Proteasom.** Pro Testansatz wurden in 50 µl Puffer 200 ng Proteasom mit 1 µM Inhibitor vorinkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf 1:2, 1:3 und 1:4 verdünnt. Die Substratkonzentration war in allen Ansätzen mit 50 µM konstant. Die Werte sind relativ auf die Ausgangsaktivität bezogen, die Aktivität des inhibierten Proteasoms steigt im Vergleich zur Kontrolle mit zunehmender Verdünnung deutlich an.

Die steigende proteasomale Aktivität mit zunehmender Verdünnung (*Abbildung 7*) lässt darauf schließen, dass es sich bei den Substanzen BSc2118 und BSc2189 um reversible Proteasominhibitoren handelt, eine Eigenschaft, die für Aldehyd-Inhibitoren aus der Literatur bekannt ist (Kisselev 2001).

4.1.3 Degradation längerer Peptidsubstrate

Die Degradation fluorogener Peptide, die aus drei bis vier Aminosäuren bestehen, ist als Modell der proteasomalen Aktivität geeignet, entspricht jedoch kaum der Situation in

vivo. Aus diesem Grund wurde in einem zweiten Schritt die proteasomale Degradation des 25 Aminosäuren langen synthetischen Peptids Kloe1, das einem Abschnitt des murinen CMV-Peptids pp89 entspricht, in Anwesenheit und Abwesenheit von Inhibitoren sowie nach verschiedenen Inkubationszeiten mittels HPLC untersucht.

4.1.3.1 Entstehung veränderter Peptidfragmente unter Proteasominhibition

In *Abbildung 7* sind exemplarisch die chromatografischen Profile der HPLC-Auftrennung dargestellt. Als Kontrolle wurde das Peptid ohne Proteasom und ohne Inhibitor aufgetragen, für die Positivkontrolle wurde die proteasomale Degradation ohne Inhibitor geprüft. In den übrigen Ansätzen wurde konstitutives Proteasom für eine Stunde mit Inhibitoren vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des Peptids Kloe1 bei 37 °C gestartet wurde.

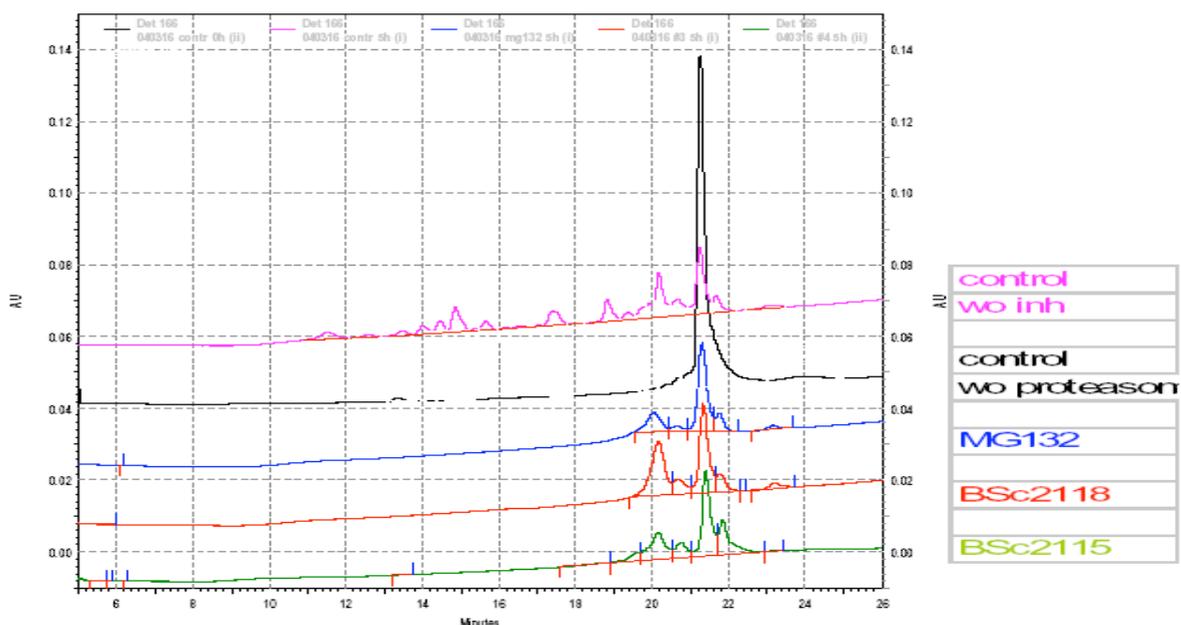


Abb. 7 **Proteasomale Degradation des Peptids Kloe1.** HPLC-Trennung der Degradationsprodukte des 25mers Kloe1: Elution des vollständigen Peptids bei Inkubation ohne Proteasom (schwarz). Elution mehrerer Fragmente unterschiedlicher Menge bei vierstündiger Inkubation mit Proteasom ohne Inhibitor (Kontrolle, rosa). Bei Inkubation in Gegenwart der Inhibitoren BSc2118 (rot), MG132 (blau) und BSc2115 (grün) in der Konzentration von 1 μ M werden weniger Fragmente generiert.

Bei einer Vorinkubation ohne Proteasom wird nur das intakte 25mer eluiert. Das 20S-Proteasom degradiert das Peptid innerhalb von 4 h in Fragmente unterschiedlicher Größe und Menge, die zu unterschiedlichen Zeiten im Acetonitril-Gradienten eluiert werden und sich als verschieden große Peaks zeigen. Durch Hemmung des Proteasoms mit den Inhibitoren BSc2118, MG132 und BSc2115 wird die Degradation des Peptids nicht vollständig verhindert, es entstehen jedoch weniger und größere Fragmente und ein größerer Anteil des ursprünglichen Peptids bleibt erhalten.

4.1.3.2 Reduktion der Peptiddegradation durch Proteasominhibition

Zur weiteren Analyse und Quantifizierung wurden die Fragmente von Fr. Kathrin Textoris-Taube massenspektrometrisch untersucht. Hier zeigte sich, dass der Abbau des ursprünglichen Peptids in erster Linie durch BSc2189 verhindert wird. Nach 4 h ungehinderter proteasomaler Degradation sind 98,5% des Peptids degradiert; nach Inhibition mit MG132 und BSc2118 sind es 89,2 respektive 69,7%. Die Inhibition mit BSc2189 verringert die Degradation auf 29,7%.

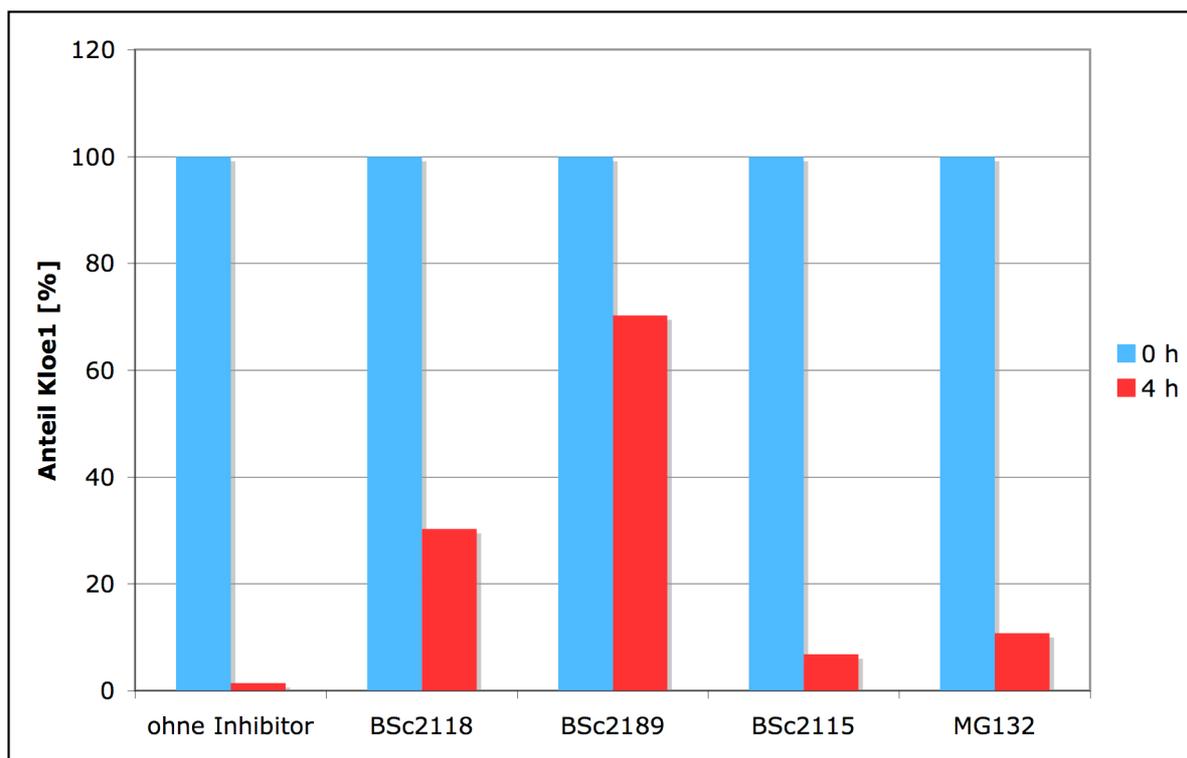


Abb. 8 **Massenspektrometrische Untersuchung des Abbaus von Kloe1.** Inkubation des 25mers Kloe1 mit Proteasom ohne Inhibitor (Kontrolle) und unter Anwesenheit von BSc2118, BSc2189, BSc2115 und MG132 (siehe auch Abb. 7). Die Menge (Ion Current) des Substrats zum Zeitpunkt 0 h (Referenzwert 100%) wurde in Relation zum Abbau nach 4 h gesetzt. Nahezu komplette Degradation nach 4 Stunden durch das Proteasom, stärkste Inhibition der Degradation durch Inhibitor BSc2189.

4.2 Testung ausgewählter Inhibitoren in Zellen

Die Versuche mit aufgereinigtem Proteasom zeigten, dass BSc2118 die Degradation fluorogener Tripeptide durch die proteasomalen Untereinheiten $\beta 5$ (IC_{50} : 0,058 μM), $\beta 2$ (IC_{50} : 0,155 μM) und $\beta 1$ (IC_{50} : 1,791 μM) verhindert. Ebenso beeinflusst BSc2118 die proteasomale Degradation eines synthetischen 25mer Peptids. BSc2118 zeigte sich in weiteren Versuchen als stabiler, reversibler und nicht-kompetitiver Inhibitor des Proteasoms. Die Substanz BSc2189 inhibiert die $\beta 5$ -Untereinheit des Proteasoms mit einem IC_{50} -Wert von 0,072 μM und verhindert die proteasomale Degradation des synthetischen 25mer Peptids Kloe1. Nach zusammenfassender Beurteilung dieser Daten wurde entschieden, die Substanzen BSc2118 und BSc2189 auf Zellen zu testen.

In den Zellversuchen sollten die Aufnahme des Inhibitors in die Zelle, die Hemmung des Proteasoms im zellulären Milieu und die damit verbundene Akkumulation proteasomaler Substrate sowie die Vitalität der Zellen unter Proteasominhibition geklärt werden. Es wurden exemplarisch vier verschiedene Tumorzelllinien verwendet, DU145 (Prostata-Karzinom), HCT116 (Kolonkarzinom), A459 (Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom) und HeLa (Cervixkarzinom).

4.2.1 Reduktion der Aktivität zellulärer Proteasomen

Zur Messung der intrazellulären Proteasominhibition wurden Zellen für 2 h mit Inhibitorkonzentrationen von 10 bis 1000 nM inkubiert. Nach Entfernung des Inhibitors in einem Waschschrift wurden die Zellen lysiert und die proteasomale Aktivität im Lysat gemessen.

Abbildung 9 zeigt eine solche Messung exemplarisch an der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145. Gemessen wurde die Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit.

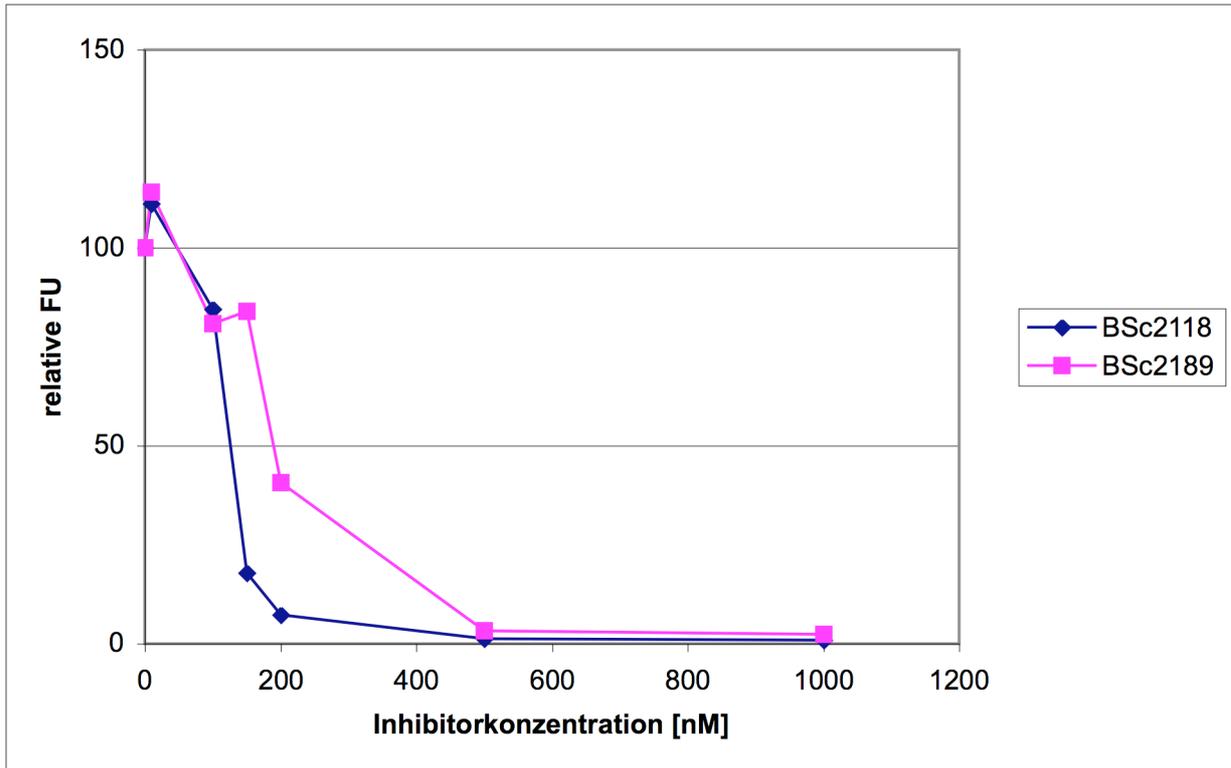


Abb. 9 **Proteasominhibitoren hemmen intrazelluläres Proteasom.** Messung der proteasomalen Aktivität in Zelllysaten von DU145-Zellen nach zweistündiger Inkubation mit Inhibitoren. Beide getesteten Inhibitoren hemmen die Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit bei einer Konzentration von 500 nM nahezu vollständig.

Die intrazelluläre IC_{50} von BSc2189 gegen die $\beta 5$ -Untereinheit beträgt 189 nM, für BSc 2118 liegt sie bei 126 nM. Bei einer Inkubation der Zellen mit 500 nM Inhibitor ist die Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit nahezu vollständig inhibiert (*Abbildung 9*).

4.2.2 Akkumulation proteasomaler Substrate

Ein intrazelluläres Korrelat inhibierter Proteasomen ist die Akkumulation proteasomaler Substrate. Zum Nachweis dieser Akkumulation wurden im Zelllysate polyubiquitinierte und damit für die proteasomale Degradation gekennzeichnete Proteine untersucht.

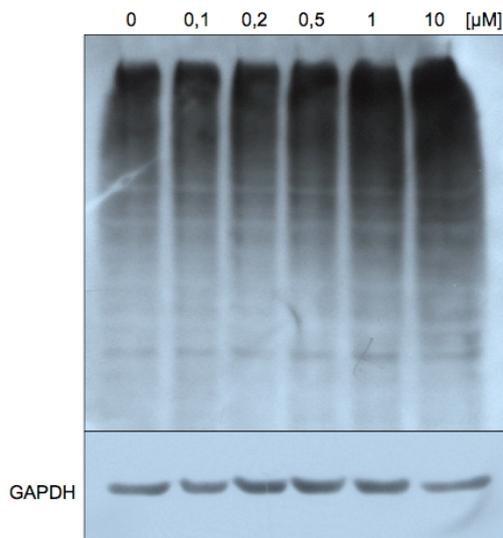


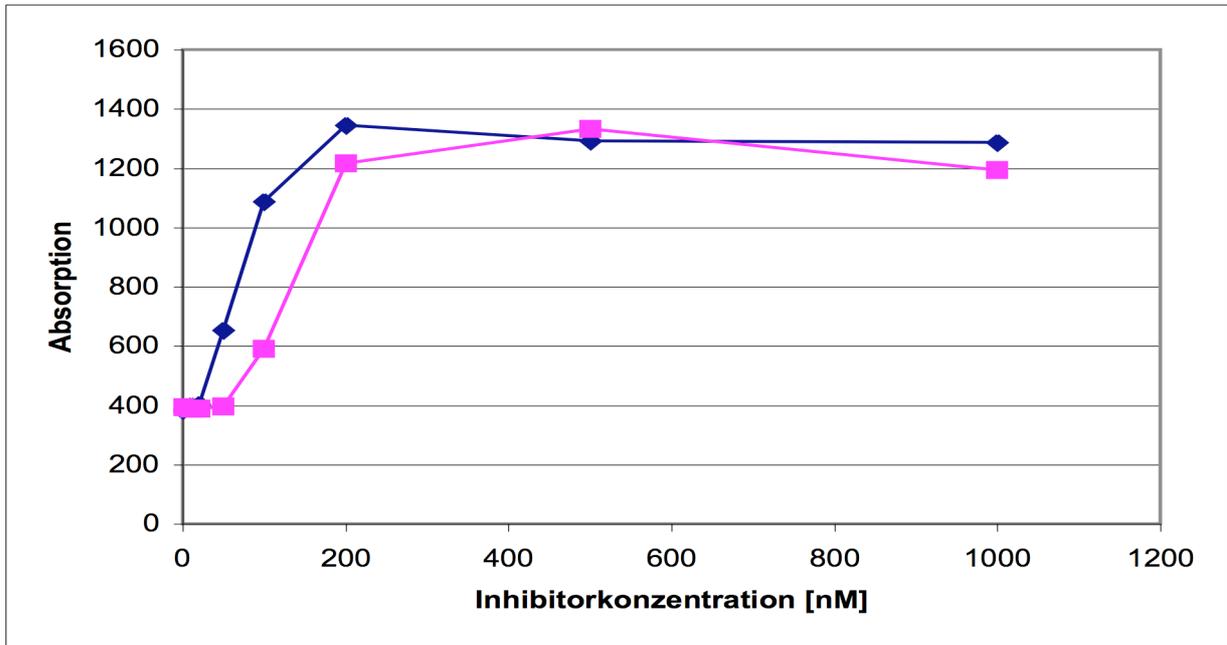
Abb. 10 **Akkumulation ubiquitinerter Substrate in HeLa-Zellen unter dem Einfluss von BSc2118.** Inkubation (2h) von HeLa Zellen mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors BSc2118. Western Blot des Lysats auf ubiquitinierte Substrate (Antikörper FK2, Biomol), GAPDH als Ladekontrolle. Deutlich zu sehen ist eine Akkumulation der zur proteasomalen Degradation markierten Proteine bei steigender Inhibitorkonzentration.

Die Zunahme ubiquitinerter Substrate in der Zelle unter Proteasominhibition macht deutlich, dass der in die Zelle aufgenommene Inhibitor das Proteasom hemmt und damit dessen reguläre intrazelluläre Funktion stört.

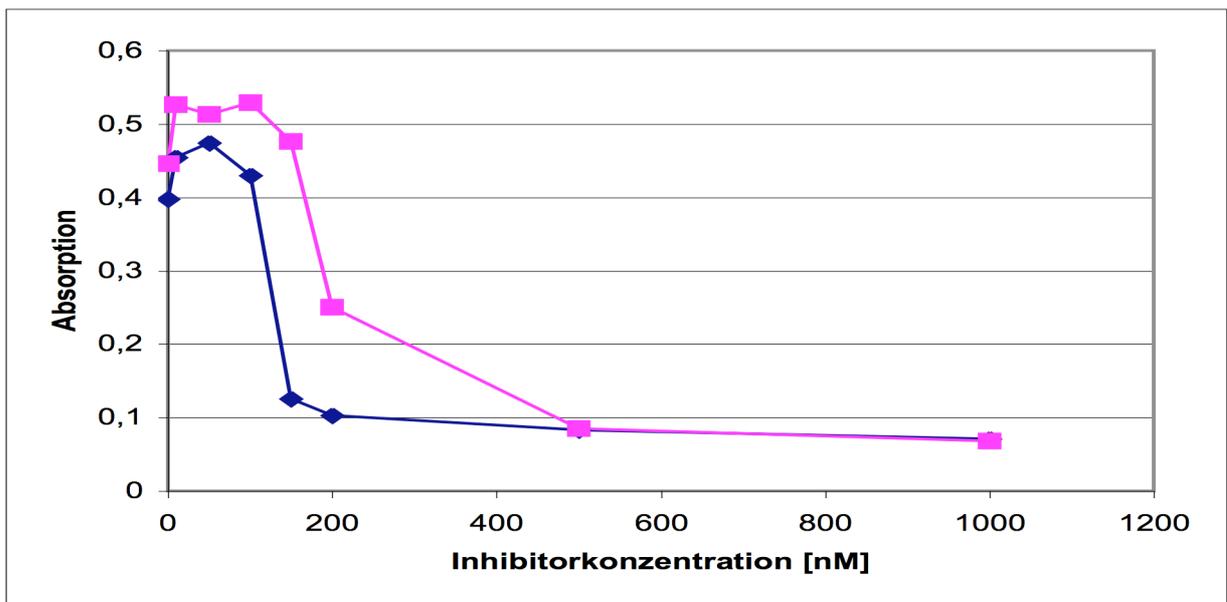
4.2.3 Bestimmung der Vitalität von Tumorzellen unter Proteasominhibition

4.2.3.1 Vermehrter Zelluntergang unter Proteasominhibition

Die intrazelluläre Proteasominhibition wurde nach einer zweistündigen Inhibitorbehandlung gemessen, zu welchem Zeitpunkt die Zellen in ihrer Vitalität noch nicht eingeschränkt sind. In einem nächsten Schritt wurden die Tumorzelllinien DU145 und HCT116 über 48 Stunden mit BSc2118 und BSc2189 behandelt, um die zelltoxische Konzentration dieser Substanzen bei längerer Inkubation zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde die Freisetzung der Laktatdehydrogenase als Marker des Zelluntergangs im Kulturmedium der Zellen gemessen sowie die relative Zahl überlebender Zellen mittels einer Kristallviolett-Färbung bestimmt.



a)



b)

Abb. 11 **Untersuchung der Lebensfähigkeit von Zellen unter Proteasominhibition.** Tumorzelllinien (HCT116, DU145) wurden 48 h mit den Substanzen BSc2118 (blau) und BSc2189 (rosa) inkubiert. Laktatdehydrogenase im Kulturüberstand wurde als Zeichen des Zelluntergangs gemessen (a). Die relative Anzahl lebender Zellen wurde mittels einer Kristallviolett-Färbung ermittelt (b). Die Inhibitoren verursachen bereits im nanomolaren Bereich einen messbaren Zelluntergang.

Mit diesen Versuchen ist gezeigt, dass die getesteten Inhibitoren in ausreichender Konzentration in die Zellen gelangen, dort das Proteasom inhibieren und bei ausreichend langer Inkubation toxische Effekte auf verschiedene Tumorzellen haben.

4.3 Bindungsverhalten eines Farbstoff-gekoppelten BSc2118 (Kloe455al)

Um die Wirkung des viel versprechenden Inhibitors BSc2118 auf Zellen besser untersuchen zu können, wurde er mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy FL gekoppelt. Die entstandene Substanz wird im Weiteren als Kloe455al bezeichnet.

In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass die Kopplung an Bodipy weder die inhibitorischen Eigenschaften noch die Zellgängigkeit des Inhibitors beeinträchtigt.

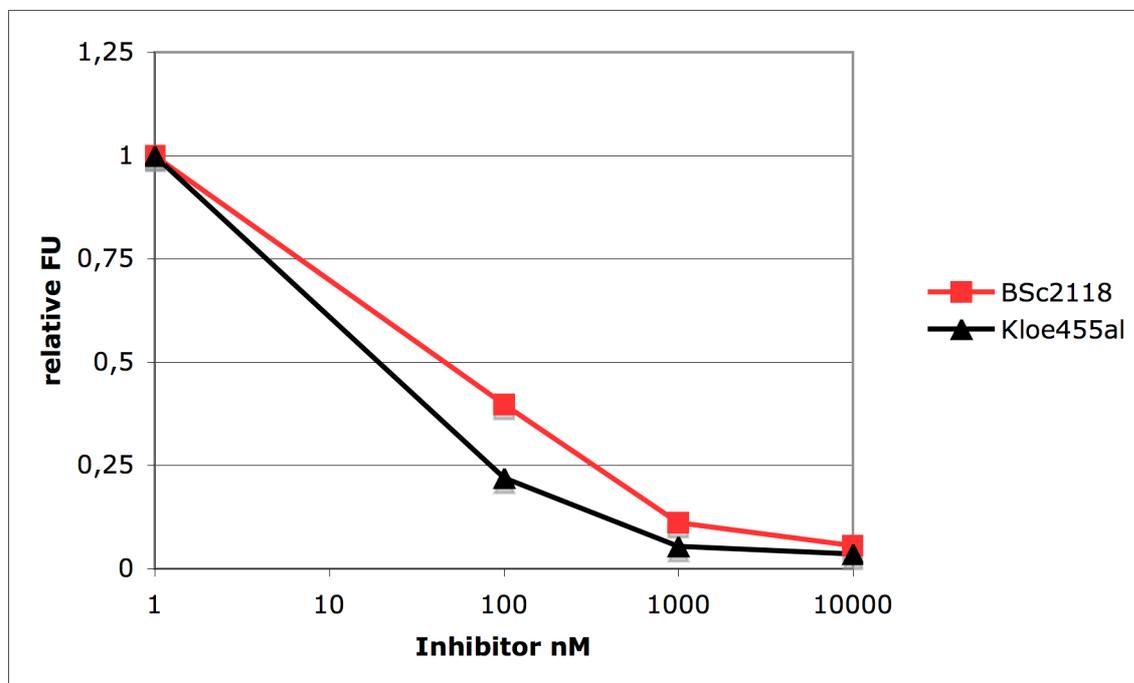


Abb.12 **In-vitro** Testung der inhibitorischen Eigenschaften von Kloe455al. BSc2118 und die Farbstoff-gekoppelte Variante Kloe455al wurden auf aufgereinigtem Proteasom getestet. Die Farbstoff-Gruppe schwächt die Inhibition nicht ab.

Um eine stabile Bindung des Inhibitors an proteasomale Untereinheiten in der elektrophoretischen Proteinauftrennung nachweisen und besser charakterisieren zu können, wurde isoliertes Proteasom mit verschiedenen Konzentrationen Kloe455al vorinkubiert, in der SDS-Page aufgetrennt und das Gel mittels Phosphor Imager abgebildet.

Erst ab Inhibitorkonzentrationen von 10 μM konnten fluoreszierende proteasomale Banden detektiert werden (*Abbildung 13*), die jedoch eher auf eine unspezifische Bindung des im Überschuss hinzugegebenen Inhibitors an verschiedenste Untereinheiten schließen lassen. Eine präzise Aussage darüber, ob und in welchem Ausmaß die Bindung der aktiven Aldehyd-Gruppe des Inhibitors an das N-terminale Threonin der katalytischen Untereinheiten die gegebenen Versuchsbedingungen einer SDS-Page übersteht, kann nicht getroffen werden.

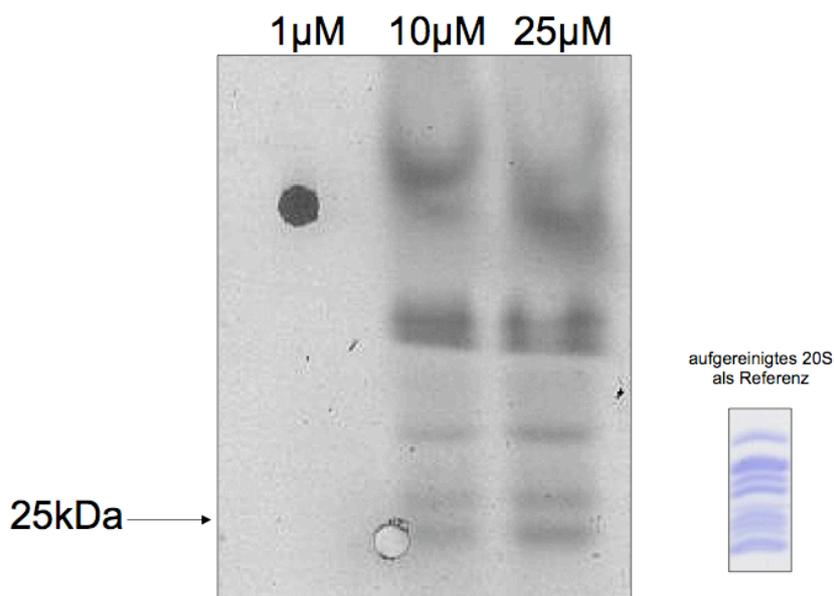


Abb. 13 **Bindung von Kloe455al an Proteasom.** Aufgereinigtes Proteasom wurde mit Kloe455al (BSc2118+Farbstoff Bodipy FL) vorinkubiert, anschließend im SDS-Gel aufgetrennt und das Gel im Phospho-Imager ausgewertet. Rechts daneben eine Coomassie-gefärbte SDS-Page mit aufgereinigtem 20S-Proteasom als Referenz.

Um eine genauere Antwort auf die Frage zu finden, an welche proteasomalen Untereinheiten Kloe455al SDS-stabil bindet, wurde Proteasom mit Kloe455al inkubiert und in der 2D-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Im ersten Versuch zeigte sich eine fluoreszierende Stelle dort, wo die Untereinheit $\beta 1$ zu erwarten ist (*Abbildung 14*). Der Nachweis dieses Spots war jedoch in mehreren Folgeversuchen nicht reproduzierbar und ist am ehesten als Artefakt zu werten, zumal dem Inhibitionsmuster zufolge vor allem ein Spot bei $\beta 5$ zu erwarten gewesen wäre.

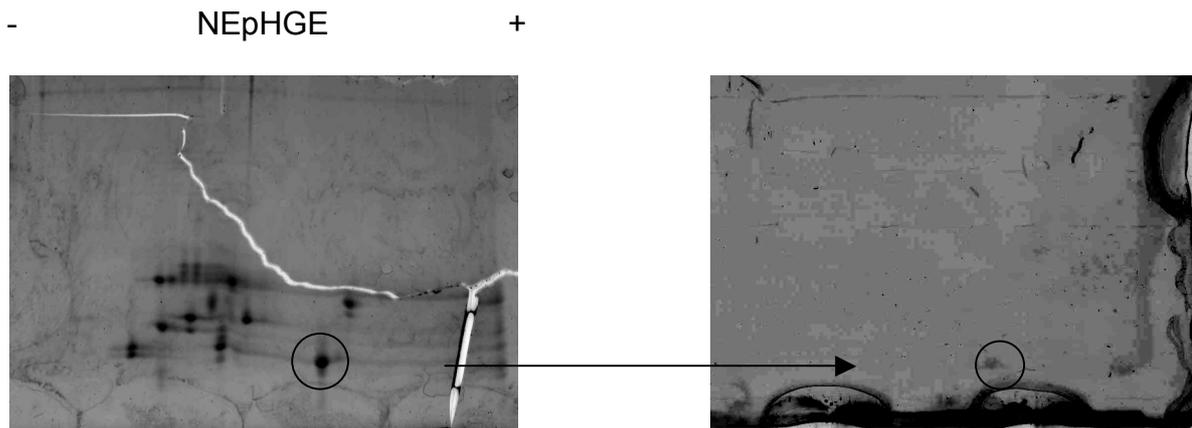


Abb. 14. **Analyse der Bindung Kloe455al an Proteasom in der 2D-Gel-Elektrophorese.** Aufgereinigtes Proteasom wurde mit 10 μ M Kloe455al vorinkubiert und in der 2D-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Links die Auswertung im Ruby Protein Stain, rechts im Fluoreszenzreader. Der am ehesten mit β 1 korrespondierende fluoreszierende Spot war in mehreren Folgeversuchen nicht reproduzierbar und muss als Artefakt angesehen werden.

4.4 Zellverteilung von Kloe455al und Nachweis der Aggresomenbildung

Die Behandlung von HeLa-Zellen mit Kloe455al lieferte in der Fluoreszenzmikroskopie Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation des Inhibitors. Gleichzeitig wurden zelluläre Strukturen wie Zellkern, Proteasom und Ubiquitin mittels fluorogener Antikörper angefärbt, wodurch Aussagen über Kollokationen und intrazelluläre Wirkungen des Inhibitors ermöglicht wurden.

In einer Zeitkinetik zeigte sich, dass Kloe455al bereits nach einer halben Stunde in den Zellen nachzuweisen war, wobei sich der Kern etwas intensiver als das Cytoplasma anfärbte. (*Abbildung 15*) Damit folgte der Inhibitor dem in diesem Versuch vorgefundenen Verteilungsmuster des Proteasoms. Die Möglichkeit einer überwiegend nukleären Lokalisation des Proteasoms ist in der Literatur beschrieben, ebenso die auch hier zu sehende Aussparung der Nucleoli (z.B. Wójcik et al. 2003).

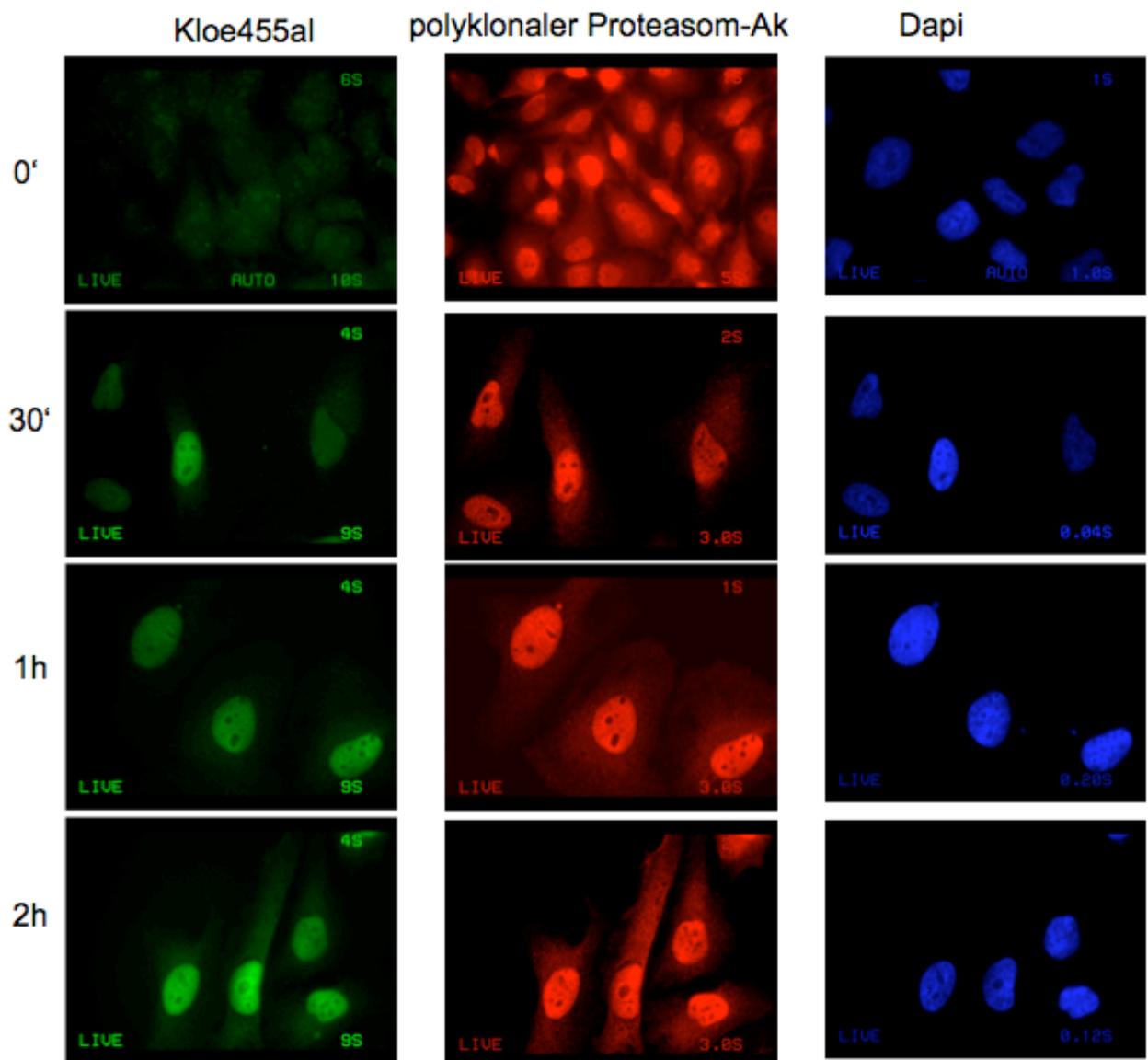


Abb. 15 **Intrazelluläre Verteilung des Inhibitors Kloe455al**. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HeLa-Zellen, die für verschiedene Zeiten mit dem fluoreszierenden Inhibitor Kloe455al (1 μ M) behandelt wurden. Anbei eine Proteasomfärbung mit dem polyclonal-rabbit-Proteasome-Antikörper (Dako) und eine Kernfärbung mit dem Farbstoff Dapi. Es zeigt sich, wie der Inhibitor sich im Verlauf von zwei Stunden cytoplasmatisch und nukleär verteilt.

Sieht man sich die Zellen nach einer 18stündigen Inkubationszeit mit Kloe455al an, erkennt man die mit Pfeilen gekennzeichneten perinukleären Aggregate, die Ubiquitin, Proteasom und den zu untersuchenden Inhibitor enthalten. (*Abbildungen 16&17*). Ähnliche Aggregate sind seit Ende der 90er in der Literatur beschrieben und wurden 1998 erstmalig mit dem Namen Aggresomen belegt (Johnston et al. 1998). Laut Johnston et al. sollen sich diese Strukturen am mikrotubulären Organisationszentrum

bilden, wenn die Kapazität der Zelle, anfallende falsch gefaltete Proteine zu degradieren, erschöpft ist, wie dies unter Proteasominhibitor der Fall sein kann.

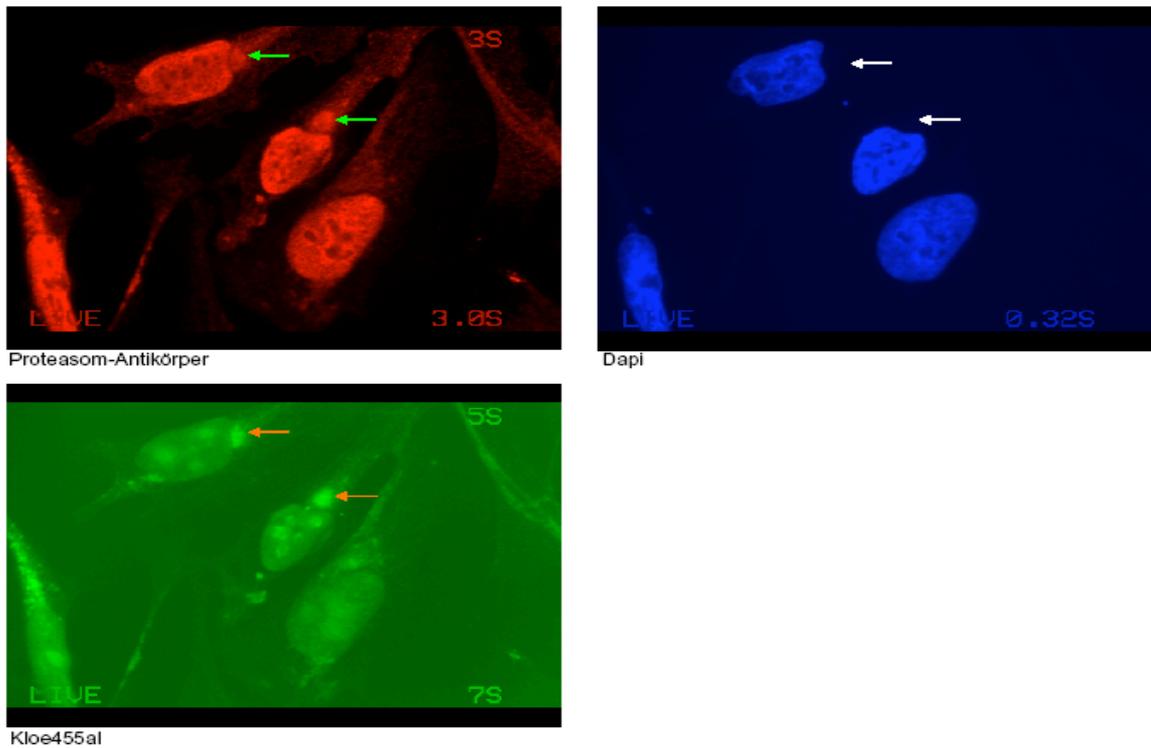
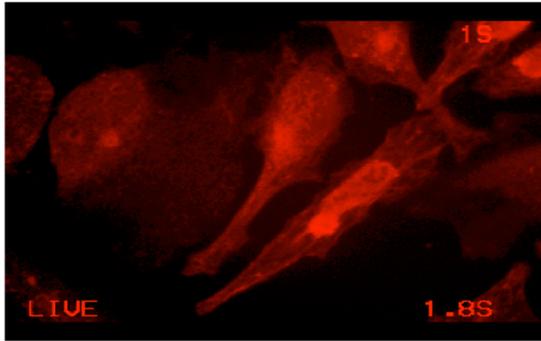
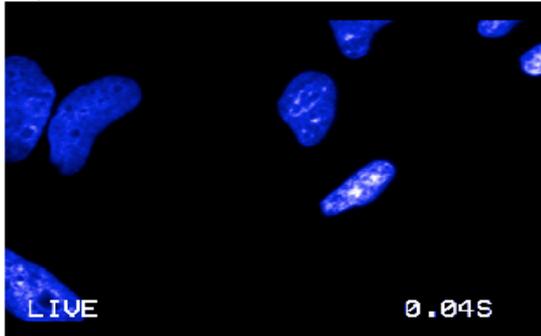


Abb. 16 **Proteasom-Färbung nach 18stündiger Behandlung mit Inhibitor.** HeLa-Zellen wurden 18 h mit dem fluoreszierenden Inhibitor Kloe455al (1 μ M) behandelt. Intrazelluläres Proteasom wurde in der Immunfluoreszenz mit polyclonal-rabbit-Proteasome-Antikörper (Dako) als 1. Antikörper markiert, die Zellkerne wurden mit Dapi angefärbt. Es zeigen sich perinukleäre Aggregate, die Proteasom und Inhibitor enthalten und eine Aussparung im Zellkern verursachen.

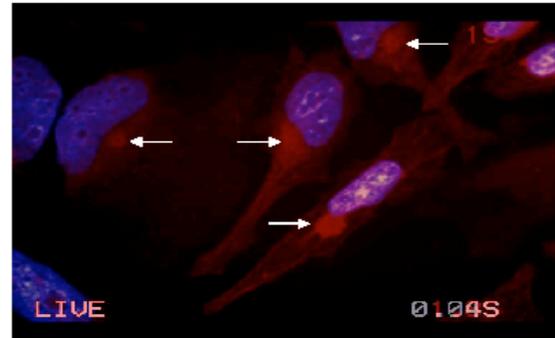
monoklonaler Ubiquitin-Antikörper



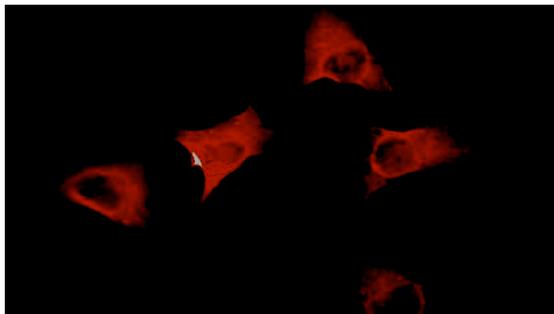
Dapi



Merge



a)



b)

Abb. 17a **Ubiquitin-Färbung nach 18stündiger Behandlung mit Inhibitor.** Zellen behandelt wie in Abb 16. Es zeigt sich, dass die perinukleären Aggregate auch Ubiquitin enthalten. In 17b Kontrollfärbung mit Ubiquitin-Antikörpern an unbehandelten HeLa-Zellen.

4.5 Wasserlöslichkeit: der Inhibitor BSc3635

Die guten inhibitorischen sowie zytotoxischen Eigenschaften der Substanz BSc2118 machten weitere Versuche wünschenswert, so zum Beispiel die Testung der antineoplastischen Wirkung im Tierversuch. Ein Problem besteht in der mangelnden Wasserlöslichkeit der getesteten Inhibitoren bei höheren Konzentrationen, so dass sie in dem relativ zelltoxischen Lösungsmittel DMSO hergestellt und aufbewahrt werden müssen.

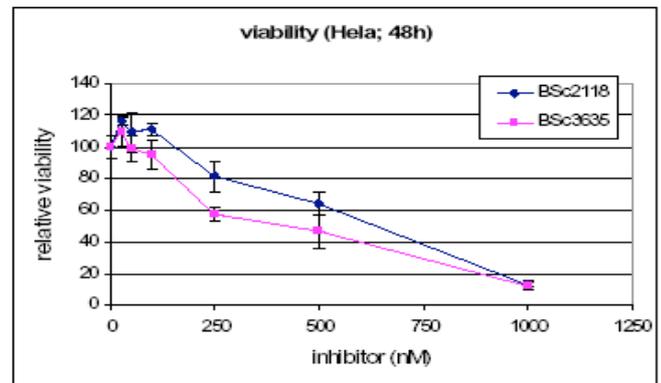
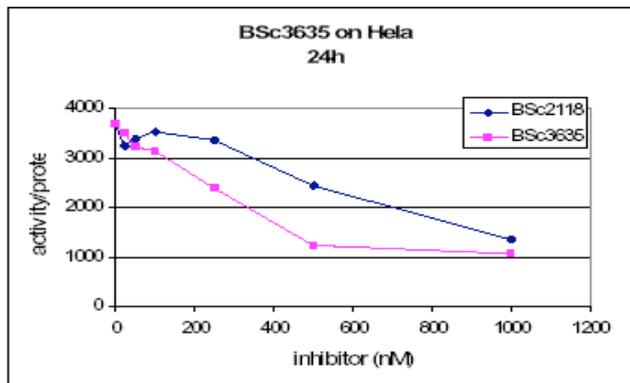
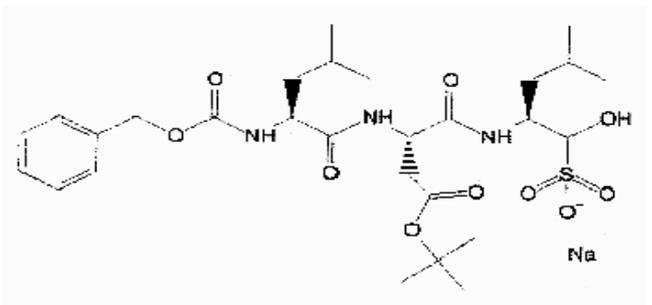
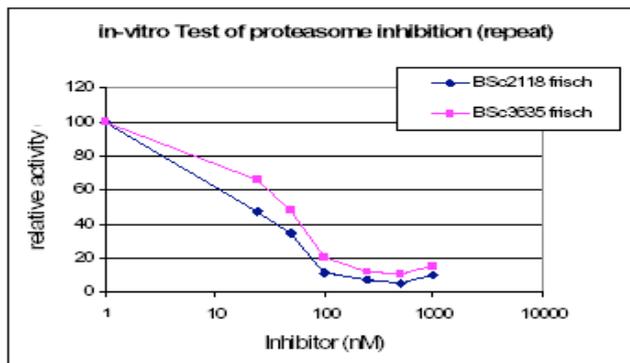


Abb. 17. **Analyse des wasserlöslichen Inhibitors BSc3635.** Schematisch gezeigt ist der Inhibitor BSc3635, eine wasserlösliche Variante des Inhibitors BSc2118, der zwar in vitro das Proteasom etwas schlechter inhibiert (links oben), jedoch im Zellversuch bezüglich intrazellulärer Proteasomaktivität (unten links) und Toxizität Vorteile aufweist.

Ein Austausch der Aldehydgruppe des Inhibitors BSc2118 gegen eine Sulfatgruppe verbesserte die Wasserlöslichkeit erheblich. Die so entstandene Substanz BSc3635 ließ sich in einer Konzentration von 20 mM in Wasser lösen.

Während ihr inhibitorisches Potential beim in vitro Verdau dem von BSc2118 etwas nachstand, kompensierte die bessere Löslichkeit dieses Defizit im Zellversuch (*Abbildung 17*).

5 Diskussion

Proteasominhibitoren spielen eine Rolle in der Erforschung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Klinisch werden sie in der antineoplastischen Therapie eingesetzt und könnten in absehbarer Zeit auch als Immunmodulatoren bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen zum Einsatz kommen.

Der einzige Proteasominhibitor mit einer klinischen Zulassung ist das Boronat Bortezomib. Die Zulassung gilt bisher ausschließlich für die Behandlung des Multiplen Myeloms nach mindestens einer Vortherapie.

Daneben befindet sich Bortezomib in verschiedenen klinischen Studien zur Therapie anderer maligner Erkrankungen. Die bisher publizierten Ergebnisse zeigen ein heterogenes Bild der Bortezomib-Wirkung auf unterschiedliche Tumorgewebe. In einer Phase II Studie zeigte Bortezomib beispielsweise weder alleine noch in Kombination mit Irinotecan eine Wirkung bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (Kozuch et al. 2008); in einer anderen Phase II Studie an nicht-kleinzelligem Lungenkrebs wurde dagegen eine moderate Wirksamkeit der Bortezomib-Therapie bezüglich der Krankheitskontrolle beschrieben (Fanucchi et al. 2006). Bei diesen Studien ist zu bedenken, dass lediglich Patienten mit fortgeschrittener und/oder therapieresistenter Krankheit rekrutiert wurden. Auch ein Teil der Patienten mit Multiplem Myelom spricht nicht auf die Therapie mit Bortezomib an. Als möglicher Resistenzmechanismus wird eine Mutation im Gen der katalytischen Proteasom-Untereinheit $\beta 5$ angesehen (Oerlemans et al. 2008). Darüber hinaus werden unter der Therapie mit Bortezomib gravierende unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie Thrombozytopenien, Anämien, Neutropenien und periphere Neuropathien beobachtet (Rote Liste 2008). Ebenso wurde in der APEX-Studie eine signifikant höhere Inzidenz von Herpes zoster unter Bortezomib-Behandlung als im Dexamethason-Studienarm beobachtet (Chanan-Khan et al. 2008).

Der noch nicht in der Klinik zugelassene Proteasominhibitor NPI-0052 induziert in multiplen Myelom-Zellen von Patienten, die nicht auf eine Bortezomib-Therapie ansprechen, Apoptose und weist synergistische Effekte in der gemeinsamen Applikation mit Bortezomib auf (Chauhan et al. 2005). Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass Resistenzmechanismen, die gegen einen Proteasominhibitor

bestehen, durch einen chemisch andersartigen Proteasominhibitor überwunden werden können.

Die bekannten Resistenzen gegen Bortezomib sowie die teilweise therapielimitierenden unerwünschten Wirkungen machen die Suche nach neuen Proteasominhibitoren erforderlich. Auch besteht die Möglichkeit, dass Substanzen mit einer veränderten Wirkweise oder Pharmakokinetik andere Indikationen und breitere Indikationsspektren erschließen können.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 28 neu generierte Substanzen als potentielle Proteasominhibitoren getestet. Zwei Verbindungen erwiesen sich als stabile reversible Inhibitoren isolierter Proteasomen. Diese inhibitorischen Eigenschaften wurden in Zellversuchen bestätigt. Eine dieser Substanzen (BSc2118) diente als Ausgangssubstanz für weitere chemische Modifikationen, so dass ein wasserlöslicher, zellgängiger Proteasominhibitor entstand, dessen weiterer Einsatz in Forschung und Klinik denkbar ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen Versuche mit ihren jeweiligen Implikationen diskutiert sowie ein Ausblick auf mögliche Anschlussversuche und Verwendungen gegeben.

5.1 In-vitro-Testung potentieller Inhibitoren – Pro und Kontra

Inhibitoren des Proteasoms setzen meist an den katalytischen Einheiten des 20S-Proteasoms an. Kristallografische Analysen zeigen die Inhibitoren in die Bindungstaschen der aktiven β -Untereinheiten eingepasst, wo sie kovalente oder nicht-kovalente Interaktionen mit der für die Proteolyse essentiellen Aminosäure (Thr1) eingehen (Groll et al. 2004). MG132, die Ausgangssubstanz für die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren, ist ein relativ unspezifischer Proteasominhibitor (Groll et al. 2008), der vornehmlich die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der β 5-Untereinheit inhibiert (Kisselev et al. 2001). Alle getesteten Substanzen entstanden durch chemische Modifikationen der Seitenketten des MG132-Tripeptidgerüsts. Diese Veränderungen betreffen sowohl die chemisch reaktive Aldehyd-Gruppe als auch die dreidimensionale Struktur des Inhibitors.

Weil die meisten Proteasominhibitoren am 20S-Partikel ansetzen, werden potentielle neue Inhibitoren normalerweise zuerst gegen isolierte 20S-Proteasomen in Assays mit fluorogenen Peptiden als Substrate getestet. Die Verwendung von 20S Proteasomen

bietet sich an, weil sie während der Isolation stabil sind, unabhängig von ATP operieren und nicht-ubiquitinierte Substrate degradieren.

In Assays dieser Art zeigten BSc2118, ein Aldehyd mit einem tertiären Butyl-Aspartat an der mittleren Position (siehe Abb. 3, Abschnitt 4.1.1), und das Diketon BSc2189 IC_{50} -Werte unter $0,1 \mu M$ gegenüber der $\beta 5$ -Untereinheit, was sie zu Kandidaten für weitere Versuche machte.

Es gibt jedoch Zweifel an der Aussagekraft dieser recht weit vom physiologischen Zustand entfernten Art der Testung von Inhibitoren, vor allem mit dem Argument, dass freie 20S-Proteasomen in der Zelle keine bedeutende Rolle spielen (Kisselev et al. 2005). Da im Rahmen dieser Arbeit die Inhibitoren BSc2118 und BSc2189 in drei verschiedenen Versuchsansätzen, nämlich genannten Assays mit fluorogenen Peptiden, den in-vitro Assays mit dem synthetischen 25mer-Peptid Kloe1 und in der Zellkultur ähnlich gute Wirkung zeigten, kann eine Korrelation zwischen den Aussagen dieser verschiedenen Verfahren trotz kritischer Stimmen angenommen werden.

Mit in-vitro Assays zum Abbau eines längeren Peptids, in dieser Arbeit wurde ein synthetisches 25mer Peptid verwendet, das einem Abschnitt des murinen CMV-Peptids pp89 entspricht, kommt man nicht nur dem physiologischen Zustand etwas näher als mit fluorogenen Tripeptiden, sondern man erhält auch Informationen darüber, in welchem Maß ein Peptid abgebaut wird und welche Fragmente entstehen. Für Untersuchungen, die in einem immunologischen Zusammenhang stehen, werden Länge und Sequenz der entstandenen Fragmente massenspektrometrisch analysiert. Dabei sind potentielle CD8-T-Zell-Epitope von besonderem Interesse, für deren Generation das Proteasom eine zentrale Rolle spielt (Kloetzel 2001). Etwa 10 % der proteasomal generierten Peptide entsprechen mit 8-10 Aminosäuren Länge formal den Anforderungen an eine feste Bindung an MHC Klasse I, weitere 10-15 % sind initial zu lang, können aber von Tripeptidylpeptidase II und von cytosolischen und im ER lokalisierten Aminopeptidasen, z.B. Aminopeptidase 1, weiter prozessiert werden (York et al. 2006).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Inhibitor BSc2189, der lediglich die chymotrypsin-ähnliche $\beta 5$ -Untereinheit inhibiert, die Degradation eines 25mer-Peptids potenter verhindert als Inhibitor BSc2118, der alle drei Untereinheiten inhibiert. Diese Tatsache kann zum Teil mit der bereits 1997 in Mutationsversuchen implizierten Wichtigkeit der chymotrypsin-ähnlichen Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit erklärt werden

(Heinemeyer et al. 1997). Dennoch ist der Unterschied von 40% in der Degradation des Substrats zwischen einer Proteasominhibition mit BSc2189 und BSc2118 mit den vorliegenden Daten nicht endgültig zu erklären und muss auf noch unbekanntem zusätzlichen Faktoren beruhen, die mit den Bindungseigenschaften von BSc2189 und Kloe1 an die proteasomale β 5-Untereinheit assoziiert sein könnten.

In der antineoplastischen Therapie mit Proteasominhibitoren geht es nach bisherigen Erkenntnissen am ehesten darum, die Degradation bestimmter Proteine zu verhindern, so zum Beispiel den Abbau von I κ B, dem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF κ B (Hideshima et al. 2001), oder auch der defekten ribosomalen Produkte (DRiPs), deren Akkumulation in neoplastisch veränderten Zellen Apoptoseprogramme induzieren können (Meister et al. 2007).

Außerhalb der Krebstherapie wiederum ist es interessant, die Generierung einzelner Fragmente bzw. T-Zell-Epitope durch das konstitutive sowie vor allem durch das Immunoproteasom zu verhindern.

5.1.1 Inhibition des Immunoproteasoms – chronisch entzündliche Erkrankungen

Das Immunoproteasom ist eine im entzündlichen Kontext maßgeblich unter Einfluss des Zytokins Interferon γ auftretende Variante des Proteasoms mit alternativ exprimierten katalytischen Untereinheiten und einem fakultativen Austausch der regulatorischen 19S Komplexe gegen PA28 Komplexe (Kloetzel 2001). Diese Veränderungen bedingen qualitative und quantitative Verschiebungen in der Entstehung antigener Epitope (Chapiro et al. 2006). Eine aufgrund dieser Erkenntnisse angenommene Verbindung zwischen dem Immunoproteasom und entzündlichen Erkrankungen konnte experimentell von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden, wie die folgenden Beispiele verdeutlichen.

Eine dieser Erkrankungen ist die chronische Coxsackie-Virus-induzierte Myokarditis, die in einer dilatativen Kardiomyopathie münden kann. In Versuchen mit zwei verschiedenen Mausstämmen, von denen einer post infectionem zur Chronifizierung, der andere jedoch zur Ausheilung neigt, fanden sich in den zur Chronifizierung neigenden Tieren sowohl in der Akutphase der Entzündung als auch in der chronischen Phase eine erhöhte Expression der proteasomalen Immununtereinheiten (Szalay et al. 2006). Die pathogenetische Bedeutung scheint in der T-Zell-Reaktion auf

immunoproteasomal generierte MHC-I-Epitope zu liegen, die zur Zerstörung von Myokardgewebe führen kann (Szalay et al. 2006). Inhibitoren des Immunoproteasoms könnten die Entstehung dieser pathogenetisch relevanten Epitope möglicherweise verhindern.

Auch bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis wird der Einsatz von Proteasominhibitoren diskutiert (Bun et al. 2008). Bei Patienten mit Sjögren-Syndrom, einer chronischen Entzündung exokriner Drüsen, die unter anderem als Komplikation der rheumatoiden Arthritis auftreten kann, wurde in Epithelien von Speicheldrüsen eine erhöhte Expression der Immuno-Untereinheit $\beta 5i$ auf der mRNA-Ebene festgestellt (Egerer et al. 2006). Bei Patienten mit der HLA-B27-assoziierten ankylosierenden Spondylitis wurde eine Hochregulation des PA28-Aktivator-Komplexes gefunden, während der 19S-Komplex herunterreguliert war. Die Anwesenheit des PA28-Komplexes förderte die proteasomale Generierung der durch HLA-B27 präsentierten Epitope. (Wright et al. 2008).

Solche Beobachtungen lassen die Überlegung zu, dass die spezifische Inhibition des Immunoproteasoms in der Therapie vieler entzündlicher Erkrankungen zumindest theoretisch vom Wirkprofil wie auch bezüglich der unerwünschten Wirkungen vorteilhaft sein müsste.

Jedoch ist es logischerweise für eine immunmodulatorische Wirkung nicht zwingend notwendig, dass der Inhibitor eine ausschließliche Affinität zum Immunoproteasom hat, solange dieses parallel zum konstitutiven Proteasom inhibiert wird. So zeigte der Inhibitor Bortezomib, der keine Spezifität für Immunoproteasom hat, in einem Maus-Modell zum systemischen Lupus erythematodes (SLE) eine gute Wirksamkeit in der Symptombekämpfung (Hautveränderungen, Nephritis) und verbesserte das Überleben der behandelten Tiere. Dieses Ansprechen ist am ehesten einer Wirkung auf langlebige Plasmazellen zuzuschreiben (Neubert et al. 2008).

Vor diesem Hintergrund wurden die Substanzen in dieser Arbeit nicht nur auf verschiedene Aktivitäten des konstitutiven Proteasoms getestet, sondern auch auf die IFN- γ -induzierten proteolytischen Untereinheiten $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$ des Immunoproteasoms. Dabei zeigte sich eine ebenso gute Wirkung gegen das Immunoproteasom wie gegen das konstitutive Proteasom. Somit liegen zwar neue Inhibitoren des Immunoproteasoms vor, die jedoch keine stärkere Affinität zu den Immununtereinheiten als zu den konstitutiven Einheiten aufweisen. Eine weitere

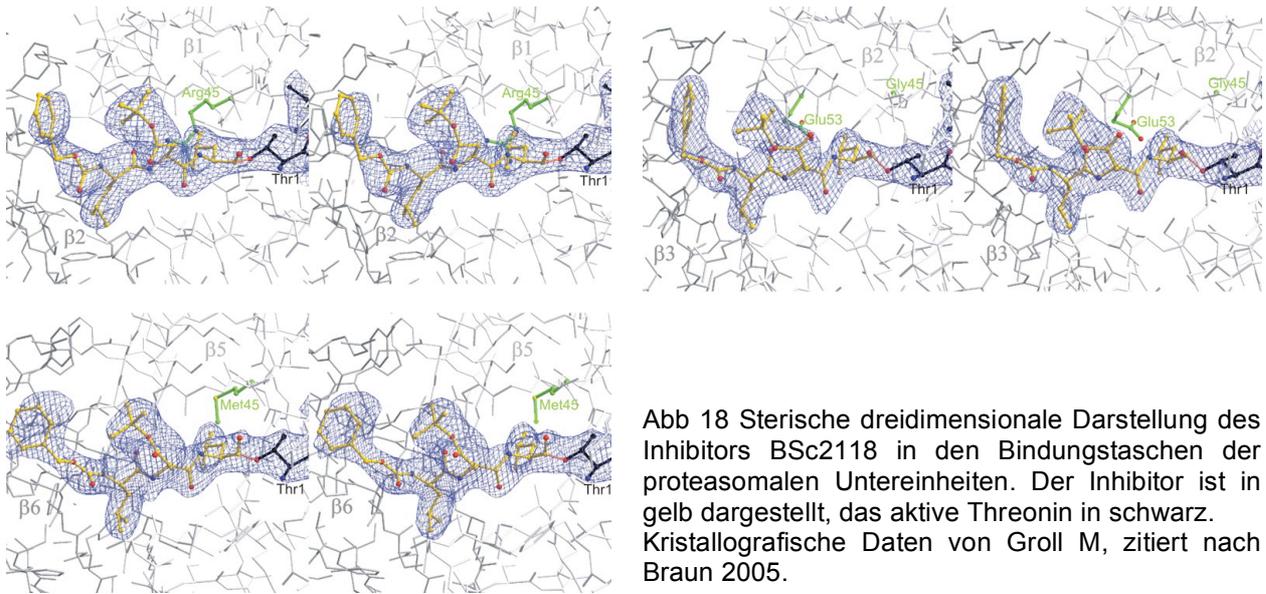
Suche nach spezifischen Immunoproteasom-Inhibitoren ist daher von großem Interesse.

Längerfristig wäre es sogar interessant, die Schnittpräferenzen des konstitutiven und Immunoproteasoms pharmakologisch so spezifisch manipulieren zu können, dass die Generierung pathogener Epitope gezielt modulieren werden könnte. Dabei ist zu bedenken, dass es neben Inhibitoren mit verschiedenen Affinitäten zu den proteasomalen Untereinheiten auch Modulatoren gibt, die einzelne proteasomale Untereinheiten stimulieren. Der eigentlich aus der HIV/AIDS-Behandlung bekannte Proteaseinhibitor Ritonavir ist ein Beispiel für eine Substanz, die einerseits eine Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität, andererseits aber eine Stimulation der Trypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms bedingt (André et al. 1998). Die gezielte Inhibition und Aktivierung einzelner proteasomaler und immunoproteasomaler Untereinheiten hat das Potential, neue Möglichkeiten in der immunmodulatorischen Therapie aufzutun.

Vor jeder pharmakologischen Nutzung einer Substanz ist die Charakterisierung ihrer chemischen Eigenschaften unerlässlich.

5.1.2 Chemische Eigenschaften der Inhibitoren

Aus Kokristallisationsversuchen von Proteasomen mit Inhibitoren ist bekannt, dass die Aldehyd-Gruppe des Inhibitors BSc2118 eine kovalente Bindung mit dem in die Bindungstasche hineinreichenden N-terminalen Threonin des Proteasoms eingeht und somit den nukleophilen Angriff unterbindet. Die Tripeptidkette nimmt eine β -Struktur an und passt sich in der Bindungstasche zwischen anderen β -gefalteten Proteinstrukturen antiparallel ein (Braun et al. 2005). Eine analoge Chemie für das Aldehyd BSc2189 ist anzunehmen.



In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen zu inhibitorischen Eigenschaften des Aldehyds BSc2118 zeigte sich, dass die Inhibition über 24 Stunden zeitkonstant ist und der Inhibitor (100 nM) selbst durch 2000fachen Substratüberschuss nicht von der katalytischen Bindungstasche verdrängt wird. In Verdünnungsversuchen konnte eine partielle Reversibilität gezeigt werden.

Daraus lässt sich schließen, dass der Inhibitor zumindest unter Versuchsbedingungen *in vitro* sehr stabil ist, eine höhere Bindungskonstante als natürliche Substrate hat und ein Gleichgewicht eingeht zwischen seiner gelösten und gebundenen Form.

Eine gute Methode, das Verhalten von Proteasominhibitoren weiter zu charakterisieren, ist die Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff, der die inhibitorischen Eigenschaften nicht beeinträchtigt und zellgängig ist. Auf diese Weise können proteasomale Banden von Untereinheiten, an die der Inhibitor gebunden ist, im Polyacrylamid-Gel visualisiert werden, die intrazelluläre Verteilung des Inhibitors kann fluoreszenzmikroskopisch beurteilt werden und sogar die Verteilung der markierten Substanz in verschiedenen Organen von Versuchstieren nachvollzogen werden (Verdoes et al. 2006). Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit BSc2118 an den Fluoreszenzfarbstoff Bodipy FL gekoppelt.

Trennt man mit diesem markierten Inhibitor vorinkubiertes Proteasom im SDS-Gel auf, so werden erst ab einer sehr hohen Konzentration von 10 μ M fluoreszierende Banden detektiert, die der Größe proteasomaler Untereinheiten entsprechen. 10 μ M liegt deutlich über der Konzentration, die aufgrund der IC_{50} -Werte zu erwarten wäre, und die

Anfärbung verschiedener Banden lässt eher auf eine unspezifische Bindung des im Überschuss hinzugegebenen Inhibitors an diverse Untereinheiten schließen. Diese Tatsache spricht dafür, dass die spezifische reversible Bindung der Aldehyd-Gruppe des Inhibitors BSc2118 an das aktive Threonin der Bindungstasche die reduzierenden Bedingungen des SDS und die anschließende Auftrennung im Acrylamidgel nicht übersteht. Damit stellt die Limitation der Methode in diesem Experiment ein weiteres Indiz für die bereits in der Verdünnungsreihe gefundene Reversibilität der Bindung dar. Ein irreversibler Inhibitor der β 5-Untereinheit wie Lactacystin bleibt fest gebunden und zeigt, radioaktiv markiert, eine klare Bande im Acrylamidgel (Fentenay et al. 2005). Als Anschlussversuche zur Charakterisierung der Bindung des Inhibitors BSc2118 an verschiedene proteasomale Untereinheiten müsste die reversible Bindung vor einer SDS-Page entweder durch ein Crosslink-Verfahren stabilisiert werden oder die reduzierenden Bedingungen müssten durch ein Nativ-Gel umgangen werden.

Es stellt sich die Frage, ob Reversibilität der proteasomalen Hemmung eine klinisch erwünschte Eigenschaft ist. Tatsächlich hieße eine irreversible Bindung an das Proteasom, dass man die Zeiten zwischen den Applikationen verlängern könnte, jedoch besitzen irreversible Inhibitoren eine ausgeprägtere Zytotoxizität. So inhibiert die natürliche Substanz Epoxomicin spezifisch und irreversibel alle proteasomalen Untereinheiten, ein in der Forschung gerne genutzter Effekt, ist jedoch so zytotoxisch, dass ein Einsatz in der Klinik höchst unwahrscheinlich ist (Groll et al. 2004).

Daraus folgend kann die Hypothese formuliert werden, dass für Proteasominhibition anfällige neoplastisch entartete Zellen schon nach kurzer Zeit einer Inkubation mit reversiblen Proteasominhibitoren apoptotisch werden, gesunde Zellen jedoch davon profitieren, dass bei reversiblen Inhibitoren der Effekt nach einer gegebenen Zeit nachlässt. Mit anderen Worten reversible Inhibitoren durchaus wirksam gegen Krebszellen sind, dabei aber gegenüber gesunden Zellen weniger unerwünschte Wirkungen haben als irreversible Inhibitoren.

5.2 Wirkung der Inhibitoren auf Zellen

Die Testung der Inhibitoren auf Zellen in der Zellkultur ist aus vier Gründen von großer Bedeutung:

1. Es muss gezeigt werden, dass die Inhibitoren in die Zellen gelangen, im intrazellulären Milieu stabil sind und vor Ort Proteasomen, die nicht durch einen aufwändigen Aufreinigungsprozess gegangen sind, tatsächlich inhibieren.
2. Um die Inhibitoren für Tierversuche vorzubereiten bzw. diese auf ein notwendiges Maß zu reduzieren, muss für verschiedene Zellen titriert werden, ab welcher Konzentration der Zelltod eintritt.
3. Die Modalität des Zelltodes ist für weitere Forschung und für den klinischen Einsatz von großer Bedeutung.
4. Längerfristig wird es interessant sein, die Inhibitoren auf möglichst vielen verschiedenen gesunden und malignen humanen Zellen zu testen, um potentielle Einsatzgebiete zu finden.

Bei der Behandlung von Zellen mit den Substanzen BSc2118, BSc2189 und BSc3635 konnte gezeigt werden, dass die proteasomale Aktivität nach zwei Stunden bei 500 nM nahezu vollständig gehemmt war. Die Inhibitoren gelangen also in die Zellen und inhibieren das dort im physiologischen Zustand vorliegende Proteasom.

Erwähnenswert ist der Inhibitor BSc3635, der eine Weiterentwicklung der Substanz BSc2118 darstellt. Durch eine Sulfatgruppe konnte nicht nur die Wasserlöslichkeit verbessert werden, sondern damit auch die intrazelluläre Inhibition. Im direkten Vergleich zu BSc2118 sind die in-vitro-Ergebnisse etwas schlechter, dafür jedoch die intrazelluläre Hemmung verbessert.

Genauere Vorstellungen vom Eindringen in die Zellen und der Kolo-kalisation mit Proteasom konnte für BSc2118 fluoreszenzmikroskopisch mit seiner Farbstoffgekoppelte Variante Kloe455al erhalten werden. Über zwei Stunden hinweg reichert sich die Substanz im Cytoplasma und im Zellkern unter Aussparung der Nucleoli an und ist damit dort lokalisiert, wo auch Proteasomen angetroffen werden.

Durch keinen dieser Versuche kann eine Aussage darüber getroffen werden, auf welche Art und Weise die Inhibitoren in die Zelle gelangen. Am wahrscheinlichsten folgen sie ihrem Konzentrationsgradienten und passieren als amphiphile Substanzen die Zellmembran direkt. Es gibt keinen Grund zu der Annahme, dass sie durch einen existierenden Transportmechanismus in die Zelle geschleust werden. Ob die beobachtete Zellgängigkeit auf alle Zellen gleichermaßen zutrifft, sollte in Folgeversuchen an verschiedenen Krebszellen untersucht werden und ist vor einem klinischen Einsatz unbedingt erforderlich.

Die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine im Western Blot ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Inhibition durch die getesteten Substanzen auch die Degradation natürlicher proteasomaler Substrate betrifft. Welche dieser akkumulierenden Proteine letztendlich dazu beitragen, den Zelltod einzuleiten, ist sicherlich für jede Zellart etwas verschieden und auch innerhalb einer Zellart wie eingangs erwähnt multifaktoriell (Hideshima et al. 2001, Meister et al. 2007). Prinzipiell gibt es in der Zelle eine schwer zu überschauende Anzahl antiapoptotischer Proteine, die zum Beispiel der Bcl-2-Familie angehören, und proapoptotischer Proteine wie BH3-only-Proteine, die sich normalerweise die Waage halten. Der Apoptose geht eine Gleichgewichtsverschiebung in Richtung der proapoptotischen Faktoren voraus (Fletcher et al. 2006).

Die von Meister et al. postulierte Idee, dass die Akkumulation nicht degradiertes Proteine über einen ER-Stress dazu beiträgt, die Apoptose einzuleiten, scheint sich in den unter Proteasominhibition fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen perinukleären Aggregaten zu bestätigen, die nach Johnston et al. entstehen, wenn die Zelle durch Überexpression schwer löslicher Proteine oder durch Proteasominhibition mit unlöslichen, aggregierenden und schwer abbaubaren Substraten überlastet ist (Meister et al. 2007, Johnston et al. 1998). Diese von Johnston et al. als Aggresomen bezeichneten Aggregate formieren sich perinukleär am Zentrosom und verursachen eine typische Eindellung des Zellkerns, die auch in den hier gezeigten Immunfluoreszenzen zu sehen sind.

Dieser in Krebszellen erwünschte Effekt könnte auch einige der bisher beobachteten unerwünschten Wirkungen von Proteasominhibitoren erklären. In Neuronen wurde die Entstehung von Proteinaggregaten sowie eine Umorganisation des Zytoskeletts und ER-Stress unter Proteasominhibition beschrieben. Diese Beobachtungen können zur Erklärung der unter Bortezomib-Behandlung auftretenden Polyneuropathie beitragen (Csizmadia et al. 2007).

Ausgehend von der unterschiedlichen Wirkung von Proteasominhibitoren auf verschiedene Zellarten wird für jeden Inhibitor aufs Neue im Zell- und im Tierversuch die Konzentration titriert werden müssen, die eine genügende Toxizität gegenüber der zu eliminierenden Krebszelle und eine vertretbare Toxizität gegenüber der zu erhaltenden Körperzelle aufweist. In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften der Substanzen lediglich an vier Krebszelllinien exemplarisch getestet. Eine systematische Testung des Inhibitors BSc3635 gegen eine Vielzahl von Krebszellen, wie sie zum

Beispiel im Panel des amerikanischen *National Cancer Institute* vorhanden ist (Holbeck et al. 2004), wäre eine sinnvoller nächster Schritt.

5.3 *Ausblick und Fazit*

Mit Bortezomib wurde 2003 der erste Proteasominhibitor gegen das Multiple Myelom zugelassen, ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom mit maligner Entartung eines Plasmazell-Klons (Bross et al. 2004). Inzwischen machen nicht nur Bortezomib-Resistenzen bei dieser Erkrankung neue Proteasominhibitoren nötig (Oerlemans et al. 2008), sondern neue Einsatzgebiete sowohl auf dem Feld der Onkologie als auch der Rheumatologie scheinen sich für die Substanzklasse der Proteasominhibitoren aufzutun.

Die Entwicklung potenter, reversibler und zellgängiger Inhibitoren, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt werden, steht somit im Interesse pharmakologischer Forschung. Wie bereits erwähnt, muss es sich nun bei den nächsten Schritten der Charakterisierung der Substanzen BSc2118 und vor allem BSc3635 um eine erschöpfende, gezielte und systematische Testung auf verschiedenen Krebszellen handeln, was im Rahmen dieser Arbeit nur an einigen Modellzellen zur besseren Erforschung der Zellgängigkeit und intrazellulären Wirksamkeit erfolgen konnte, sowie um Tierversuche zur Testung der Verteilung im Organismus, Wirkung und Toxizität bei Mammalia. Erste Versuche im Mausmodell werden derzeit von Izabela Mlynarczuk und Jacob Golab in Warschau durchgeführt (persönliche Kommunikation).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen einen ersten Schritt im Prozess der Entwicklung neuer, klinisch einsetzbarer Proteasominhibitoren darstellen.

6 Zusammenfassung

Das Proteasom spielt eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Proteindegradation. Proteasominhibitoren werden zur Erforschung des Ubiquitin-Proteasom-Systems eingesetzt und finden klinische Anwendung in der antineoplastischen Therapie. Perspektivisch könnten Proteasominhibitoren auch als Immunmodulatoren bei entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden. Als bislang einziger Vertreter dieser Wirkgruppe hat Bortezomib eine klinische Zulassung zur Therapie des Multiplen Myeloms. Dabei sind Resistenzen gegen Bortezomib sowie teilweise therapielimitierende unerwünschte Wirkungen beschrieben. Aus diesen Gründen ist die Suche nach neuen in der antineoplastischen und immunmodulatorischen Therapie einsetzbaren Proteasominhibitoren sinnvoll.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 28 Substanzen als potentielle Proteasominhibitoren getestet. Zwei Substanzen konnten als stabile, reversible Proteasominhibitoren mit fluorogenen Peptidsubstraten charakterisiert werden. Sie beeinflussen weiterhin die proteasomale Degradation eines viralen 25mer-Peptids. In Zellkultur-Experimenten konnte ihre Membrangängigkeit sowie ihre Wirksamkeit gegen Proteasomen im intrazellulären Milieu nachgewiesen werden. Intrazellulär führten sie zur Akkumulation proteasomaler Substrate. In der Immunfluoreszenz wurden unter Proteasominhibition perinukleäre Aggregate nachgewiesen, die ein morphologisches Korrelat für zellulären Stress sind. Bei Untersuchungen an vier verschiedenen Krebszelllinien (HeLa, DU145, HCT116 und A549) führten sie dosisabhängig zum Zelltod.

Beide untersuchten Substanzen zeichneten sich jedoch durch eine schlechte Wasserlöslichkeit aus. Dieses Problem wurde durch eine chemische Modifikation gelöst, aus der die Verbindung BSc3635 hervorging, die einen wasserlöslichen Inhibitor mit verbesserter Zellgängigkeit darstellt. Somit ist BSc3635 für weitere Testungen in Richtung eines klinischen Einsatzes eine Alternative.

7 Schriftenverzeichnis

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA et al. Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. *Cancer Res.* 1999; 59(11):2615-22

André P, Groettrup M, Klenerman P et al. An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(22):13120-4

Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F, Kuehn L, Pfeifer G. Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett.* 1988;241:239-45

Bazzaro M, Lee MK, Zoso A et al. Ubiquitin-Proteasomen System Stress Sensitizes Ovarian Cancer to Proteasome Inhibitor–Induced Apoptosis. *Cancer Res* 2006;66(7):3754-63

Braun BC, Glickmann M, Dahlmann B et al. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol.* 1999;1(4):211-6

Braun HA, Umbreen S, Groll M, Kuckelkorn U, Mlynarczuk I, Wigand ME, Drung I, Kloetzel PM, Schmidt B. Tripeptide Mimetics Inhibit the 20S Proteasome by Covalent Bonding to the Active Threonines. *J. Biol. Chem.* 2005;280(31):28394-411

Bross PF, Kane R, Farrell AT. Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:3954-64

Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature.* 1991; 353(6342):355-7

Brun J. Proteasome inhibition as a novel therapy in treating rheumatoid arthritis. *Med Hypotheses.* 2008 epub ahead of print

Chanan-Khan A, Sonneveld P, Schuster MW et al. Analysis of herpes zoster events among bortezomib-treated patients in the phase III APEX study. *J Clin Oncol.* 2008; 26(29):4784-90

Chapiro J, Claverol S, Piette F et al. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol.* 2006; 176(2):1053-61

Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br J Cancer.* 2006;95(8):961-5

Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *Cell* 1994;79:13-21

Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):2727-30

Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:801-47

Csizmadia V, Raczynski A, Csizmadia E, Fedyk ER, Rottmann J, Alden CL. Effect of an experimental proteasome inhibitor on the cytoskeleton, cytosolic protein turnover, and induction in the neuronal cells in vitro. *Neurotoxicology.* 2008; 29(2):232-43

Dahlmann B. Proteasomes. *Essays Biochem.* 2005;41:31-48

Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merfohr S, Kloetzel PM. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol.* 2000; 303(5):643-53

Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA et al. Antitumor Activity of PR-171, a Novel Irreversible Inhibitor of the Proteasome. *Cancer Res.* 2007; 67(13):6383–91

Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. A 26 S Protease Subunit That Binds Ubiquitin Conjugates. *J Biol Chem.* 1994; 269(10):7059-61

Egerer T, Martinez-Gamboa L, Dankof A et al. Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2006;54(5):1501-8

Fanucchi MP, Fossella FV, Belt R et al. Randomized phase II study of bortezomib alone and bortezomib in combination with docetaxal in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Onc.* 2006; 24(31):5025-33

Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science.* 1995;268(5211):726-31

Fletcher JI, Huang DCS. BH3-only proteins: orchestrating cell death. *Cell Death Differ.* 2006;13(8):1268-71

Früh K, Yang Y, Arnold D et al. Alternative exon usage and processing of major histocompatibility complex-encoded proteasome subunits. *J Biol Chem.* 267(31):22131-40

Da Fonseca PC, Morris EP. Structure of the human 26S proteasome: Subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core. *J Biol Chem.* 2008 (epub ahead of print)

Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol.* 1996;26(4):863-9

Groettrup M, Soza A, Eggers M et al. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature*. 1996;381(6578):166-8

Groll M, Ditzel L, Löwe J et al. Structure of 20S proteasome from Yeast at a 2.4Å resolution. *Nature*. 1997;386:463-71

Groll M, Huber R. Inhibitors of the eukariotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1695(1-3):33-44

Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, et al. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature*. 2008; 452(7188):755-8

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57-70

Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH. The Active Sites of the Eukaryotic 20 S Proteasome and Their Involvement in Subunit Precursor Processing. *J. Biol. Chem*. 1997;272 :25200-9

Hideshima T, Richardson P, Chauhan D et al. The Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Growth, Induces Apoptosis, and Overcomes Drug Resistance in Human Multiple Myeloma Cells. *Cancer Res*. 2001; 61:3071-76

Holbeck SL. *European Journal of Cancer*. 2004; 40:785–793

Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *JCB*. 1998; 143(7):1883-98

Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration Approval Summary: Bortezomib for the Treatment of Progressive Multiple Myeloma after One Prior Therapy. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(10):2955-60

Karin M. Nuclear factor-κB in cancer development and progression. *Nature*. 2004; 441: 431-6

Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001;8(8):739-58

Kisselev AF, Goldberg AL. Monitoring Activity and Inhibition of 26S Proteasomes with Fluorogenic Peptide Substrates. *Methods Enzymol.* 2005;398:364-78

Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8582-90

Kloetzel PM, Falkenburg PE, Hossli P, Glatzer KH. The 19S ring-type particles of drosophila. *Exp Cell Res.* 1987;170(1):104-13

Kloetzel PM. Antigen processing by the Proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(3):179-87

Kozuch PS, Rocha-Lima CM, Dragovich T et al. Bortezomib with or without irinotecan in relapsed or refractory colorectal cancer: results from a randomized phase II study. *J Clin Oncol.* 2008; 26(14):2320-6

Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(15):680-85

Lesinski GB, Raig ET, Guenterberg K et al. IFN- α and Bortezomib Overcome Bcl-2 and Mcl-1 Overexpression in Melanoma Cells by Stimulating the Extrinsic Pathway of Apoptosis. *Cancer Res.* 2008; 68(20): 8351-60

Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science.* 1995; 268(5210):533-9

Marastoni M, Baldisserotto A, Trapella C, Gavioli R, Tomatis R. P3 and P4 position analysis of vinyl ester pseudopeptide proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006; 16:3125-30

Meister S, Schubert U, Neubert K et al. Extensive Immunoglobulin Production Sensitizes Myeloma Cells for Proteasome Inhibition. *Cancer Res.* 2007; 67 (4):1783-92

Mitsiades CS, Mitsiades N, Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome inhibitors as therapeutics. *Essays Biochem.* 2005; 41:205-18

Neubert K, Meister S, Moser K et al. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med.* 2008 Jun 8. [Epub ahead of print]

Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG et al. Molecular basis of bortezomib/Velcade® resistance: Proteasome subunit $\beta 5$ (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood.* 2008; epub ahead of print

Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, Grever MR, Orlowski M, Dang CV. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a Proteasome inhibitor. *Cancer Res.* 1998; 58:4342-48

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999;18(49):6853-66

Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S Subcomplexes of the 26 S Proteasome and Their Distribution in the Nucleus and the Cytoplasm. *J Biol Chem.* 1994;269:7709-18

Qin J-Z, Ziffra J, Stennett L et al. Proteasome Inhibitors Trigger NOXA-Mediated Apoptosis in Melanoma and Myeloma Cells. *Cancer Res.* 2005;65(14):6282-93

Richardson P, Mitsiades C, Schlossmann R et al. The treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;2007:317-23

Rivett AJ. The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J. Biol. Chem.* 1989 264: 12215-12219

Roccaro AM, Hideshima T, Raje N et al. Bortezomib Mediates Antiangiogenesis in Multiple Myeloma via Direct and Indirect Effects on Endothelial Cells. *Cancer Res.* 2006;66(1):184-91

Rock KL, Gramm C, Rothstein L et al. Inhibitors of the Proteasome Block the Degredation of Most Cell Proteins and the Generation of Peptides Presented on MHC Class I Molecules. *Cell.* 1994;78:761-71

Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 1995;268:579-82

Soligo S, Servida F, Delia D et al. The apoptogenic response of human myeloid leukaemia cell lines and of normal and malignant haematopoietic progenitor cells to the Proteasomen inhibitor PSI. *Br J Haematol.* 2001;113(1):126-35

Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X et al. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Br J Dermatol.* 2008;158(3):496-504

Stohwasser R, Soza A, Eggers M, Koszinowski UH, Kloetzel PM. PA28 $\alpha\beta$ double and PA28 β single transfectant mouse B8 cell lines reveal enhanced presentation of a mouse cytomegalovirus (MCMV) pp89 MHC class I epitope. *Mol Immunol.* 2000; 37(1-2):13-9

Szalay G, Meiners S, Voigt A et al. Ongoing coxsackievirus myocarditis is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes. *Am J Pathol.* 2006;168(5):1542-52

Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signalling paradigm and therapeutic agent. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1647-53

Verdoes M, Florea BI, van der Linden WA et al. A fluorescent broad-spectrum proteasome inhibitor for labelling proteasomes in vitro and in vivo. *Chem Biol.* 2006; 13(11):1217-26

Vierstra RD, Langam SM, Haas AL. Purification and initial characterization of ubiquitin from the higher plant, *Avena sativa*. *J Biol Chem.* 1985;260(22):12015-21.

Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol.* 2006;3(4):255-61

Wilk S, Orlowski M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem.* 1983;40(3):842-9

Willamson MJ, Blank JL, Bruzzese FJ et al. Comparison of biochemical and biological effects of ML 858 (salinosporamide A) and bortezomib. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(12):3052-61

Wójcik C, DeMartino GN. Intracellular Localization of Proteasomes. *IJBCB.* 2003;35:579-89

Wright CA, Edelmann M, Digleria K et al. Ankylosing spondylitis monocytes show upregulation of proteins involved in inflammation and the Ubiquitin Proteasome pathway. *Ann Rheum Dis.* 2008 [epub ahead of print]

York IA, Bhutani N, Zendzian S, Goldberg AL, Rock KL. Tripeptidyl Peptidase II Is the Major Peptidase Needed to Trim Long Antigenic Precursors, but Is Not Required for Most MHC Class I Antigen Presentation. *J Immunol.* 2006; 177(3):1434-43

Yoshimura T, Kameyama K, Takaqi T et al. Molecular Characterization of the "26S" Proteasome Complex from Rat Liver. *J Struct Biol.* 1993;111(3):200-11

Zhu Q, Wani G, Wang QE, El-mahdy M, Snapka RM, Wani AA. Deubiquitination by proteasome is coordinated with substrate translocation for proteolysis in vivo. *Exp Cell Res.* 2005; 307(2):436-51.

8 Publikation

Braun HA, Umbreen S, Groll M, Kuckelkorn U, Mlynarczuk I, Wigand ME, Drung I, Kloetzel PM, Schmidt B. Tripeptide Mimetics Inhibit the 20S Proteasome by Covalent Bonding to the Active Threonines. *J. Biol. Chem.* 2005;280(31):28394-411

9 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. P.-M. Kloetzel für die Betreuung meiner Promotion. Ich habe mich in seiner Arbeitsgruppe als Mediziner unter Biologen und Biochemikern stets gut aufgehoben gefühlt.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Ulrike Kuckelkorn für ihre Geduld, ihre Hilfsbereitschaft, ihre guten Erklärungen und kritischen Nachfragen, kurzum für viele schöne und lehrreiche Stunden im Labor.

Ich danke Frau Katrin Textoris-Taube für die Bereitstellung massenspektrometrischer Daten.

Ich danke Ilse Drung, Mathias Riehn, Frédéric Ebstein, den Doktoranden der AG Kloetzel sowie Thomas Groschek und Hauke Wiegand für ihre Unterstützung.

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Selbstständigkeitserklärung

ERKLÄRUNG

„Ich, Moritz Eric Wigand, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Testung neuer Proteasominhibitoren* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift