

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

Habilitationsschrift

Inflammation als Angriffspunkt für die Therapie der Atherosklerose

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Medizinische Molekularbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinische Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Antje Ludwig

Eingereicht: Mai 2016
Dekan: Professor Dr. med. A. Pries
1. Gutachter: Professor Dr. med. S. Felix
2. Gutachterin: Professor Dr. med. I. Hilger

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	2
1 Einleitung	3
1.1 Atherosklerose – eine inflammatorische Erkrankung	3
1.2 Inflammation als Angriffspunkt für die Therapie der Atherosklerose	5
1.3 Inflammationsmarker in der vulnerablen atherosklerotischen Läsion als Zielstruktur für die Magnetresonanz-Bildgebung	6
2 Ergebnisse	8
2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System als potenzielles Target antiinflammatorischer Therapie im Gefäßsystem	8
2.1.1 Partielle Proteasominhibition ruft eine protektive antioxidative Antwort in Endothelzellen hervor	8
2.1.2 Antiinflammatorische Effekte niedrigdosierter Proteasominhibition im Gefäßsystem	19
2.1.3 Niedrigdosierte Proteasominhibition hemmt die frühe Atherogenese in der LDL-Rezeptor-defizienten Maus	30
2.1.4 Statine hemmen das Proteasom in vaskulären Zellen nicht	43
2.1.5 Selektive Proteasominhibitoren	51
2.2 Inflammation in der atherosklerotischen Läsion als Objekt für die Magnetresonanz-Bildgebung	57
2.2.1 Magnetresonanz-Bildgebung von atherosklerotischen Plaques des WHHL-Kaninchens mit elektrostatisch stabilisierten Eisenoxidnanopartikeln	57
2.2.3 Die Interaktion mit Glykosaminoglykanen führt zu einer schnellen Aufnahme von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxidnanopartikeln in Monozyten und Makrophagen	71
3 Diskussion	84
3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System – ein geeignetes Target für die antiinflammatorische Therapie der Atherosklerose?	84
3.2 Magnetresonanztomographie zur Darstellung von Inflammation in der Gefäßwand	86
4 Zusammenfassung und Ausblick	88
5 Literaturverzeichnis	89
Danksagung	93
Erklärung	94

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin Protein-Ligase
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EZM	Extrazellulärmatrix
GAG	Glykosaminoglykan(e)
GPx3	Glutathionperoxidase 3
HO-1	Hämoxygenase 1
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IFN γ	Interferon <i>gamma</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KEAP1	<i>Kelch like-erythroid cell-derived protein with 'cap-'n'-collar'-homology associated protein 1</i>
LDL	<i>low density</i> -Lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LDLR ^{-/-}	LDL-Rezeptor-defizient
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SOD-1	Superoxiddismutase 1
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VCAM-1	<i>vascular adhesion molecule 1</i>
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen
VSOP	<i>very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose – eine inflammatorische Erkrankung

Die meisten Todesfälle weltweit sind laut Statistiken der Weltgesundheitsorganisation WHO auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen, deren häufigste Ursache die Atherosklerose ist. Die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Strategien für die Diagnose und Therapie der Atherosklerose liegt auf der Hand.

Die Atherosklerose wird heute als ein chronisch inflammatorischer Prozess in der Gefäßwand betrachtet ¹. Das Endothel bildet die Barriere zwischen Blutgefäßwand und Lumen. Endothelzellen sind unter normalen physiologischen Bedingungen resistent gegenüber der Adhäsion von Entzündungszellen und Thrombozyten und kontrollieren den Gefäßtonus. Diese Funktionen werden hauptsächlich durch das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt, dessen Synthese von der endothelialen NO Synthase (eNOS) reguliert wird. NO induziert die Vasodilatation, verhindert die Thrombozytenaktivierung und blockiert die Aktivierung der Expression von inflammatorischen Molekülen, z.B. von Adhäsionsmolekülen wie *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und Chemokinen wie *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1). Proatherogene Risikofaktoren (z.B. Rauchen, Bluthochdruck, Hyperlipidämie) aber auch gestörte Scherkräfte an Verzweigungen und Kurvaturen von Arterien können zu einer endothelialen Dysfunktion führen, die durch eine Endothelzellaktivierung, erhöhte Permeabilität und eNOS-Funktionsstörung gekennzeichnet ist ². Die eingeschränkte Barrierefunktion des Endothels begünstigt das Eindringen von Lipiden, insbesondere des *low density lipoproteins* LDL, in die Gefäßwand. LDL-Partikel haben eine hohe Affinität zu Komponenten der Extrazellulärmatrix (EZM) in der Intima, welche die subendotheliale Akkumulation und Modifizierung (Oxidation, Aggregation) dieser Lipoproteine vermitteln. Eine besondere Bedeutung wird dabei Chondroitinsulfatproteoglykanen (z. B. Versican) mit hyperelongierten und stark sulfatierten Glykosaminoglykanketten zugewiesen ³. Subendotheliale Lipidakkumulation und fortschreitende endotheliale Dysfunktion führen zu einer erhöhten endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen sowie von chemotaktischen Substanzen wie MCP-1, welche die Rekrutierung, Adhäsion und die Transmigration von Leukozyten in die Gefäßwand vermitteln ⁴. Monozyten, die so in die Intima einwandern, werden unter Einfluss des *macrophage-colony-stimulating factors* (M-CSF) zu Makrophagen differenziert. Makrophagen nehmen über *scavenger* Rezeptoren wie *scavenger receptor class A* (SRA-I and SRA-II), CD36, *lectin-like oxLDL receptor* (LOX-1), aber auch über Makropinozytose modifiziertes LDL (insbesondere oxidativ geschädigtes LDL) in großen Mengen auf, was schließlich zur Bildung von Schaumzellen führt. Makrophagen geben allerdings auch eine Vielzahl hochaktiver Substanzen wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Matrixmetalloproteinasen (MMP) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei, die wiederum für eine weitere Verstärkung der inflammatorischen Antwort verantwortlich sind. Neue Studien belegen, dass Makrophagen in atherosklerotischen Plaques hinsichtlich der Produktion inflammatorischer Mediatoren heterogen sind. Modellhaft

unterscheidet man pro-inflammatorische M1-Makrophagen (M1-M Φ) von alternativen, eher antiatherogenen M2-Makrophagen (M2-M Φ), wobei ein Kontinuum zwischen beiden Formen in Läsionen vorhanden ist. Außer Monozyten und daraus abgeleitete Makrophagen tragen auch T-Lymphozyten zur Atherogenese bei. Studien in Mausmodellen zeigten eine Heterogenität in der Funktion verschiedener T-Zell-Subtypen. Während Th1-Zellen eher proinflammatorische und proatherogene Effekte vermitteln (CD40-Ligand release), scheinen regulatorische T-Zellen eher antiinflammatorisch und antiatherogen zu sein ⁵. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass auch dendritische Zellen, Mastzellen und B-Zellen in die Atherogenese involviert sind ⁶. Durch den Einfluss proatherogener Stimuli verändern sich die glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der Media: VSMC mit dem für die gesunde Arterie typischen ausdifferenzierten kontraktilem Phänotyp transdifferenzieren in den proliferierenden synthetisierenden Phänotyp. Diese VSMC sind durch eine erhöhte Synthese von EZM-Molekülen gekennzeichnet und migrieren von der Media in die Intima, wo sie an der Bildung der fibrösen Kappe beteiligt sind ⁷. Mit der Progression der atherosklerotischen Läsion und anhaltender Inflammation kann es zur massiven Störung der zellulären Homöostase und daraus resultierender Apoptose von Schaumzellen und glatten Muskelzellen kommen ⁸. Nach neuen Konzepten ist die Apoptose von Makrophagen/Schaumzellen und das anschließende Beseitigen der apoptotischen Zellen (Efferozytose) ein atheroprotektiver Prozess ⁹. Andererseits bedingt apoptotischer und nekrotischer Zelltod das Entstehen des nekrotischen Lipidkernes der atherosklerotischen Läsion ^{10,11}. In atherosklerotischen Plaques sind aus der Apoptose resultierende Membranvesikel, die sogenannten apoptotischen Körperchen, nachweisbar, welche eine Voraussetzung für die Kalzifizierung bilden ^{12,13}. Die Apoptose von VSMC und der Verlust von Collagen durch den Einfluss von MMP führen zur Ausdünnung der fibrösen Kappe und destabilisieren somit die Läsion. In der Folge kann es zur Erosion oder Ruptur der Kappe kommen. Durch den dadurch exponierten stark thrombogenen Atherominhalt kommt es zur Thrombozytenaktivierung mit konsekutiver Atherothrombose, was letztlich zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie Myokardinfarkt und Schlaganfall führen kann. Thrombozyten sind jedoch nicht nur in der Komplikationsphase der Erkrankung von Bedeutung, sondern können auch direkt mit aktivierten Endothelzellen interagieren und durch Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren (z.B. Interleukin 1 β , CD40-Ligand) schon in der Initiation und Progression der Atherosklerose den Entzündungsprozess vorantreiben ¹⁴. Inflammatorische Prozesse sind demnach in allen Phasen der Atherogenese involviert - von der Initiationsphase über die Progression bis hin zu klinischen Komplikationen dieser Erkrankung - und bilden damit einen idealen Angriffspunkt für die Entwicklung von neuen Diagnostik- und Therapiekonzepten.

1.2 Inflammation als Angriffspunkt für die Therapie der Atherosklerose

Eine Therapie, die gezielt auf die Inflammation im atherosklerotischen Gefäß gerichtet ist, gibt es derzeit noch nicht. Neue Erkenntnisse über die Pathomechanismen der Atherosklerose eröffnen jedoch neue Wege, um pharmazeutische aber auch nichtpharmazeutische Strategien zu entwickeln, die vaskuläre Inflammation zu stoppen.

Grundlegende Erkenntnisse konnte unser Labor in den vergangenen Jahren über die Wirkung von Proteasominhibition als potenziell antiinflammatorischen Therapieansatz im Gefäßsystem erlangen. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist das zentrale Proteinabbausystem eukaryontischer Zellen¹⁵. Das 26S Proteasom ist eine ATP-abhängige Protease. Es besteht aus einem katalytischen Kern, dem 20S Proteasom, und aus zwei 19S-Regulatorkomplexen, welche für die Substraterkennung sowie den Transport der abzubauenen Proteinkette in das katalytische Zentrum verantwortlich sind¹⁶. Das zylinderförmige 20S Proteasom setzt sich aus vier aneinander gelagerten Ringen zusammen, die wiederum jeweils aus sieben nicht identischen Untereinheiten bestehen. Die beiden äußeren Ringe werden von α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) gebildet, die beiden inneren Ringe durch die β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 7$). Interferon γ induziert einen Austausch der aktiven β -Untereinheiten gegen die immunoproteasomalen Untereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ ¹⁷. Das UPS spielt eine wesentliche Rolle sowohl beim Abbau falsch gefalteter Proteine als auch bei der Degradation wichtiger regulatorischer Proteine des Zellzyklus, der Transkriptionsmaschinerie und des Stoffwechsels¹⁸⁻²¹. Der selektive Abbau der Proteine wird über die kovalente Bindung von Ubiquitinmolekülketten vermittelt, die als Erkennungssignal für das 26S Proteasom dienen. Die Ubiquitinierung ist ein mehrstufiger ATP-verbrauchender Prozess. Zuerst wird Ubiquitin, katalysiert durch E1 (Ubiquitin aktivierendes Enzym), aktiviert. Aktiviertes Ubiquitin wird auf E2 (Ubiquitin konjugierendes Enzym) übertragen und schließlich durch E3 (Ubiquitin Protein-Ligase) kovalent an das abzubauenen Protein gebunden²². Während nur wenige E1- und E2-Enzyme beschrieben wurden, gibt es eine große Anzahl von E3-Ligasen, welche die Substratspezifität der Ubiquitinierung und damit des proteasomalen Abbaus von Proteinen vermitteln¹⁶.

Mit der Entwicklung spezifischer Proteasominhibitoren erhielt man wichtige Werkzeuge zur Aufklärung der Funktion des UPS, aber auch die Möglichkeit, durch Veränderung der proteasomalen Aktivität in wichtige zelluläre Prozesse einzugreifen^{23,24}. Die heute am häufigsten verwendeten Proteasominhibitoren hemmen die katalytischen β -Untereinheiten des 20S Proteasoms. Das Peptiddehyd MG132 sowie die in ihrer Bindung stabileren Peptidboronate MG262 und Bortezomib hemmen am effektivsten die chymotrypsinartige Aktivität des Proteasoms und in höheren Konzentrationen auch die trypsinartige und die caspaseartige Aktivität. Eine vollständige oder nahezu vollständige Inhibition der proteasomalen Aktivität führt zum Zelltod. Da schnell proliferierende Zellen sensibler gegenüber Proteasominhibition sind, wurde das Potenzial von Proteasominhibitoren zur Krebstherapie früh erkannt und führte zur Zulassung von Bortezomib für die Therapie des multiplen Myeloms²⁵. Die mögliche antiinflammatorische Anwendung wurde schon vor Jahren vorgeschlagen²⁶. Tatsächlich wurden Proteasominhibitoren erfolgreich in

experimentellen Modellen inflammatorischer Erkrankungen getestet^{27,28}. Der antiinflammatorische Effekt der Proteasominhibition wurde hauptsächlich auf die Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) zurückgeführt. Das UPS spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung dieses zentralen Mediators der inflammatorischen Antwort²⁹. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist NFκB überwiegend als Komplex mit seinen Inhibitormolekülen (IκB) im Zytoplasma lokalisiert. Proinflammatorische Signale, wie die Bindung des Tumornekrosefaktor α (TNF-α) an den membranständigen TNF-Rezeptor, setzen eine Signalkaskade in Gang, welche zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und anschließender Degradation von IκB durch das 26S Proteasom führt. NFκB wird so von IκB befreit, wandert in den Zellkern und ist dort an der Aktivierung der Transkription einer Vielzahl von Genen der inflammatorischen Antwort beteiligt, wie z.B. der Adhäsionsmoleküle mit ihrer bereits oben beschriebenen Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Darüber hinaus ist auch erhöhter oxidativer Stress eng mit der Verstärkung des inflammatorischen Geschehens im Gefäßsystem assoziiert³⁰. Ein für die oxidative Stressantwort bedeutender Transkriptionsfaktor, *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2), wird ebenfalls durch das UPS kontrolliert. Unter normoxischen Bedingungen wird Nrf2 an den *Kelch like-ECH-associated protein 1* (Keap1)- Komplex gebunden, ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut. Erhöhte intrazelluläre Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies verursachen eine Dissoziation von Nrf2 und Keap1-Komplex, sodass vermehrt Nrf2 in den Zellkern transloziert und dort die Aktivierung der Transkription antioxidativer Enzyme, wie SOD-1 und HO-1 induziert³¹.

Für die Anwendung von Proteasominhibition als antiinflammatorische Therapie im Gefäßsystem setzen wir voraus, dass die Inflammation effektiv unterdrückt wird, ohne jedoch toxisch auf Zellen bzw. Organe zu wirken. Dieses Ziel konnten wir durch den Einsatz von Peptid-Proteasominhibitoren in niedrigen Konzentrationen erreichen, die lediglich eine partielle Proteasominhibition bewirken. Wir entwickelten das Konzept von Proteasominhibitoren als „Gifte und Heilmittel“, die, abhängig von ihrer Dosierung und daraus resultierendem Grad der Inhibition, entweder zytotoxisch oder nichttoxisch und zellfunktionsmodulierend wirken³². Die vorliegende Arbeit beschreibt die Wirkung von niedrigdosierter Proteasominhibition in Zellkultur- und Tiermodellen inflammatorischer Gefäßveränderungen (endotheliale Dysfunktion, Atherosklerose) und stellt neue, selektive Proteasominhibitoren vor.

1.3 Inflammationsmarker in der vulnerablen atherosklerotischen Läsion als Zielstruktur für die Magnetresonanz-Bildgebung

Die Möglichkeiten der nichtinvasiven und invasiven angiologischen Diagnostik atherosklerotischer Gefäße liegen derzeit in der Darstellung von pathologischen, anatomisch-morphologischen Veränderungen. So können zwar Lage der Läsion und Grad der Stenosierung bestimmt werden, entscheidend für das Auftreten von Komplikationen wie Plaqueruptur oder Plaqueerosion ist jedoch nicht die Größe der Läsion, sondern deren zelluläre und molekulare Zusammensetzung. Vulnerable

Plaques sind gekennzeichnet durch einen hohen Makrophagenanteil, Destabilisierung der Extrazellulärmatrix und erhöhter Apoptose- und Nekroserate und daraus resultierendem großen nekrotischen Lipidkern. Auch Neoangiogenese und Kalzifizierung können Marker für Plaquevulnerabilität sein. Diese destabilisierenden Gefäßveränderungen sind mit den heute für die Routinediagnostik zur Verfügung stehenden bildgebenden Methoden nicht darstellbar.

Mit Hilfe von Kontrastmitteln, die spezifisch an inflammatorische Zielstrukturen binden, könnten rupturgefährdete Plaques detektiert werden. Tatsächlich gibt es Studien, die zeigen, dass Makrophagen, aber auch Neoangiogeneseprozesse in atherosklerotischen Läsionen mit Eisenoxidnanopartikeln markiert und mittels *in vivo* MRT dargestellt werden können. Insbesondere sterisch stabilisierte *ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles* (USPIO) erwiesen sich als geeignet für die Detektion selbst früher inflammatorischer Stadien atherosklerotischer Läsionen³³⁻³⁶. Nachteilig für eine klinische Diagnostik ist allerdings die Tatsache, dass alle USPIO erst frühestens 24 bis 48 Stunden nach Injektion in der atherosklerotischen Läsion nachweisbar sind. Experimentelle und klinische Daten deuten darauf hin, dass elektrostatisch stabilisierte zitratbeschichtete *very small superparamagnetic iron oxide particles* (VSOP) einige Vorteile gegenüber sterisch stabilisierten USPIO haben^{37,38}. Im Vergleich zu polymerbeschichteten USPIO sind VSOP deutlich kleiner und ihre Aufnahme in Zellen ist schneller und quantitativ überlegen³⁷. VSOP sind die bisher einzigen elektrostatisch stabilisierten Eisenoxidnanopartikel, die als Kontrastmittel die klinische Entwicklung bis zu Phase II Studien durchlaufen haben³⁸. Innerhalb der Klinischen Forschergruppe KFO-213 „Magnetische Nanopartikel für die Zelluläre und Molekulare MR-Bildgebung“ untersuchten wir in enger Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern des Institutes für Radiologie der Charité die Möglichkeit, mit VSOP vulnerable atherosklerotische Plaques mittels MR-Bildgebung zu identifizieren. Dazu werden Untersuchungen im Atherosklerose-Kaninchenmodell durch Zellkulturexperimente ergänzt, welche zugrunde liegende Mechanismen der Aufnahme, des Transportes und der Prozessierung von VSOP in vaskulären und inflammatorischen Zellen der Gefäßwand sowie die Bindung der Partikel an Strukturen der extrazellulären Matrix eruieren. In der vorliegenden Arbeit werden die ersten *in vivo* und *in vitro* Daten vorgestellt.

2 Ergebnisse

2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System- ein potenzielles Target antiinflammatorischer Therapie

2.1.1 Partielle Proteasominhibition ruft eine potenziell atheroprotektive Antwort in Endothelzellen hervor

Meiners S, Ludwig A, Lorenz M, Dreger H, Baumann G, Stangl V, Stangl K (2006). Nontoxic Proteasome Inhibition Activates a Protective Antioxidant Defense Response in Endothelial Cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40, 2232-2241

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.003>

Wir untersuchten die Effekte von nichttoxischer versus toxischer Proteasominhibition in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden über 24 Stunden mit je einer niedrigen und einer hohen Dosis der Proteasominhibitoren MG132 und MG262 behandelt. Während sowohl die jeweils hohe als auch die niedrige Konzentration eine nachweisbare Hemmung der proteasomalen Aktivität bewirkte (Akkumulation polyubiquitinerter Proteine) induzierten die hohen Dosierungen in den Endothelzellen Apoptose, während die niedrigen Dosierungen die Zellviabilität nicht beeinflussten. Eine umfassende Genexpressionsanalyse zeigte dosisabhängig unterschiedliche Veränderungen der Genexpression nach Proteasominhibition. Bemerkenswert war die durch nichttoxische Proteasominhibition erhöhte Expression verschiedener antioxidativer Enzyme, wie SOD-1, HO-1 und GPx3, was funktionell zu einer verbesserten Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid-induziertem oxidativen Stress führte. Auch wichtige Regulatoren der Endothelfunktion zeigten nach niedrigdosierter Proteasominhibition eine vorteilhafte Regulation (Erhöhung des Transkriptniveaus der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase, Reduktion der Endothelin mRNA), die mit einer verbesserten Vasoreaktivität von isolierten Aortenringen korrelierte. Darüber hinaus exprimierten Endothelzellen nach niedrigdosierter Proteasominhibition weniger MCP-1. Diese Daten legen nahe, dass niedrigdosierte Proteasominhibition ein vielversprechender Ansatzpunkt für antioxidative und antiinflammatorische Therapien im kardiovaskulären System sein könnte.

2.1.2 Antiinflammatorische Effekte niedrigdosierter Proteasominhibition im Gefäßsystem

Ludwig A, Fechner M, Wilck N, Meiners S, Grimbo N, Baumann G, Stangl V, Stangl K. Potent anti-inflammatory effects of low-dose proteasome inhibition in the vascular system. *Journal of Molecular Medicine*, 2009, 87, 793-802

<http://dx.doi.org/10.1007/s00109-009-0469-9>

Ausgehend von der Beobachtung, dass partielle Proteasominhibition in humanen Endothelzellen zu den beschriebenen vasoprotektiven Effekten führt, testeten wir nun die Hypothese, dass niedrigdosierte Proteasominhibition die zytokinstimulierte inflammatorische Aktivierung des Endothels unterdrücken kann. Tatsächlich beobachteten wir, dass die 24stündige Vorbehandlung von HUVEC mit nichttoxischen Dosierungen von MG132 und MG262 zu einer signifikanten Hemmung der TNF- α -induzierten Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin führt und die Adhäsion von THP-1-Monozyten an TNF- α -stimulierte HUVEC-Zellen vermindert. Dieser Effekt war nicht auf eine Unterbindung der nukleären Translokation von NF κ B zurückzuführen, wie bei hochdosierter Proteasominhibition beobachtbar, da die partielle Inhibition des Proteasoms offenbar nicht ausreichte, den Abbau von I κ B α zu hemmen. Niedrigdosierte Proteasominhibition verminderte effektiv den durch TNF- α induzierten Anstieg intrazellulärer ROS in HUVEC.

In hypertensiven Ratten führte die Applikation des Proteasominhibitors Bortezomib zu einer deutlichen Verminderung der durch die Druckbelastung induzierten VCAM-1 Expression in Aorten. Auch hier konnte ein antioxidativer Effekt der Proteasominhibition beobachtet werden. Damit konnte erstmalig im Tiermodell ein potenziell antiatherogener Effekt niedrigdosierter Proteasominhibition gezeigt werden.

2.1.3 Niedrigdosierte Proteasominhibition mit Bortezomib hemmt die frühe Atherogenese in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen

Wilck N, Fechner M, Dreger H, Hewing B, Arias A, Meiners S, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Ludwig A. Attenuation of Early Atherogenesis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice by Proteasome Inhibition. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2012, 32, 1418-1426

<http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.249342>

Niedrigdosierte Proteasominhibition in vaskulären Zellen moduliert offensichtlich Faktoren und Prozesse, die insbesondere in frühen Stadien der Atherogenese von Bedeutung sind. Basierend auf diesen Befunden überprüften wir die Hypothese, dass niedrigdosierte Proteasominhibition die Entstehung der Atherosklerose hemmen kann. Wir untersuchten den Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Atherogenese in der *low-density lipoprotein receptor-deficient* (LDLR^{-/-})-Maus, einem etablierten transgenen Atherosklerosemodell. Durch Fütterung einer fettreichen *Western-type* Diät für 6 Wochen wurden in den Tieren frühe atherosklerotische Läsionen induziert. Gleichzeitige intraperitoneale Injektion von Bortezomib in einer Dosierung von 50 µg/kg Körpergewicht verminderte signifikant die Plaquelast im Vergleich zur Kontrollgruppe (Injektion von physiologischer Kochsalzlösung). Wir beobachteten deutliche antiinflammatorische Effekte, wie eine reduzierte Expression von VCAM-1 in der Aorta, verminderte Makrophageninfiltration der Aorta sowie erniedrigte Serumspiegel von Interleukin 6 und MCP-1. Darüber hinaus wirkte Bortezomib antioxidativ, wie die signifikante Reduktion der Superoxidkonzentration und der Proteinoxidationsprodukte in der Aorta sowie des Gehaltes an Lipidperoxidationsprodukten im Serum belegten. *Whole genome microarrays* zeigten zudem, dass die durch die Hochfettdiät induzierten proatherogenen Änderungen der Genexpression in der Aorta durch Gabe von Bortezomib weitgehend verhindert wurden. Diese Daten zeigten, dass die *in vitro* beobachteten protektiven Effekte niedrigdosierte Proteasominhibition in einem Tiermodell der frühen Atherogenese reproduzierbar waren.

2.1.4 Statine hemmen die proteasomale Aktivität in Gefäßzellen nicht

Ludwig A, Friedel B, Metzkow S, Meiners S, Stangl V, Baumann G, and Stangl K. Effect of Statins on the Proteasomal Activity in Mammalian Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochemical Pharmacology*, 2005, 70, 520-526

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.046>

Statine sind Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme-A-Reduktase. Außer ihrer lipidsenkenden Wirkung wird Statinen eine Reihe von pleiotropen vasoprotektiven Effekten zugesprochen. Rao et al. veröffentlichten 1999 eine Studie, die zur der Annahme führte, dass Statineffekte zum Teil auf eine Inhibition des Proteasoms zurückzuführen sind. Tatsächlich überlappen sich einige Statineffekte mit Effekten, die wir durch Proteasominhibition in endothelialen und glatten Gefäßmuskelzellen erzielten (z.B. eNOS-Hochregulation, Inhibition der NFκB-Aktivierung, Proliferationshemmung). Darum untersuchten wir, ob Statine tatsächlich die proteasomale Aktivität in Gefäßzellen inhibieren können. Wir verglichen die Wirkung von Simvastatin, Atorvastatin und Pravastatin mit der Wirkung des Proteasominhibitors β-clasto-Lactacystin auf die Morphology, Proliferation, Viabilität und proteasomale Aktivität in zwei endothelialen Zelllinien sowie in primären glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Statine und β-clasto-Lactacystin induzierten ähnliche morphologische Veränderungen in Endothelzellen und hemmten deren Proliferation. Wie erwartet, verursachte die Gabe von β-clasto-Lactacystin eine deutliche Inhibition der proteasomalen Aktivität in Endothelzellen und VSMC, während alle untersuchten Statine keinen Einfluss auf die proteasomale Aktivität von Gefäßzellen hatten. Außerdem konnten Statine selbst in hohen Dosierungen die Aktivität von isolierten 20S Proteasomen nicht hemmen. Wir schlussfolgerten, dass antiinflammatorische und antiproliferative Effekte von Statinen nicht auf einer proteasominhibitorischen Wirkung beruhen.

2.1.5 Selektive Proteasominhibitoren

Groll M, Korotkov VS, Huber EM, de Meijere A, Ludwig A. A Minimal β -Lactone Fragment for Selective β 5c or β 5i Proteasome Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition Engl.*, 2015, 54, 7810-7814

<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201502931>

Ein Proteasominhibitor, der als antiinflammatorisches Therapeutikum anwendbar ist, muss für diese Anwendung geeignete Eigenschaften aufweisen. Im Gegensatz zur Krebstherapie wären hier Inhibitoren, die selektiv einzelne Untereinheiten des Proteasoms bzw. des Immunproteasoms hemmen können und eine möglichst geringe Zytotoxizität aufweisen, von Vorteil.

In dieser Studie wurde die Leitstruktur des inhibitorisch wirksamen Naturstoffes Belactosin C aus *Streptomyces* so verändert, dass die entstandenen Derivate spezifisch an bestimmte katalytische Untereinheiten des 20S Partikels binden, und zwar an die β 5-Untereinheiten. Zwei β -Lactone mit unterschiedlichen Ligandenseitenketten (P-Ketten) wurden synthetisiert und analysiert. Die Substanz, welche neben einer Dimethoxybenzyl-Einheit eine Isopropyl-P1-Seitenkette (Valin-Analogon) enthielt, erwies sich in ihrer hemmenden Wirkung selektiver gegenüber β 5c verglichen mit β 5i, als die Substanz, welche eine Methylpropyl- P1-Seitenkette (Isoleucin-Analogon) trug. Das Belactosin-Derivat mit Isoleucin-ähnlicher P1-Seitenkette erwies sich sechsfach stärker hemmend gegenüber β 5i als das Derivat mit Valin-ähnlicher P1-Seitenkette.

Damit wurden minimale Strukturelemente identifiziert, welche eine Unterscheidung zwischen β 5c und β 5i zulassen. Die Beobachtung, dass allein die Modifizierung des P1-Restes die Selektivität der Inhibition beeinflusste, ist eine für die Entwicklung neuer Proteasominhibitoren wichtige Erkenntnis. In Zellkulturexperimenten wurde die Zellgängigkeit beider Derivate nachgewiesen. Verglichen mit dem peptidischen Proteasominhibitor MG132 erwiesen sich beide Substanzen als deutlich weniger zytotoxisch gegenüber Hela-Zellen. Mit diesen Eigenschaften könnten sich die untersuchten β -Lactone als Leitstrukturmotiv für die Entwicklung von Proteasominhibitoren speziell für die Anwendung bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie der Atherosklerose, eignen.

2.2 Inflammation in der atherosklerotischen Läsion als Objekt für die nichtinvasive Bildgebung

Molekulare Bildgebung mittels MRT bietet potenziell die Möglichkeit, eine hochauflösende Diagnostik auf anatomisch-morphologischer und molekularer Ebene zu vereinen. Dazu bedarf es Kontrastmitteln mit spezifischen molekularen Targets. In enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Radiologie innerhalb der Klinischen Forschergruppe KFO-213 „Magnetische Nanopartikel für die Zelluläre und Molekulare MR-Bildgebung“ untersuchen wir die Möglichkeit der Identifizierung rupturgefährdeter Plaques durch Visualisierung inflammatorischer Veränderungen der Extrazellulärmatrix in der MR-Bildgebung.

2.2.1 Magnetresonanz-Bildgebung von atherosklerotischen Plaques des WHHL-Kaninchens mit elektrostatisch stabilisierten Eisenoxidnanopartikeln

Wagner S, Schnorr J, Ludwig A, Stangl V, Gemeinhardt I, Schellenberger E, Ebert M, Schwenke C, Hamm B, Taupitz M Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization. *International Journal of Nanomedicine*; 2013, 8, 767-779

<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S38702>

Im Modell der *Watanabe-Heritable-Hyperlipidemic* (WHHL)-Kaninchen wurde untersucht, ob VSOP geeignet sind, inflammatorische Plaques mittels MRT zu identifizieren. Bereits innerhalb einer Stunde nach intravenöser Applikation von VSOP in einer Dosierung von 0,05 mmol Fe/kg Körpergewicht konnte in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen ein MR-Signalverlust beobachtet werden. Der Signalverlust korrelierte mit Plaquemorphologietypen, die nach den Kriterien der *American Heart Association* (AHA) als instabil definiert werden. Histologisch konnte das zum Signalverlust führende Eisen sowohl in Makrophagen der atherosklerotischen Läsion, als auch in kalzifizierenden Membranvesikeln, die einen hohen Gehalt an stark sulfatierten Glukosaminoglykanen aufwiesen, nachgewiesen werden.

Mit dieser Studie konnten erstmals kalzifizierende Membranvesikel als destabilisierende Komponente der atherosklerotischen Läsion *in vivo* visualisiert werden. Damit wurde eine neue Marker-Target Kombination für die MRT von rupturgefährdeten, atherosklerotischen Plaques beschrieben.

2.2.2 Die Interaktion mit Glykosaminoglykanen führt zu einer schnellen Aufnahme von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxidnanopartikeln in Monozyten und Makrophagen

Ludwig A, Poller WC, Westphal K, Minkwitz S, Lättig-Tünnemann G, Metzkwow S, Stangl K, Baumann G, Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Stangl V. Rapid binding of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles to THP-1 monocytic cells via interaction with glycosaminoglycans. *Basic Research in Cardiology*, 2013, 108, 328

<http://dx.doi.org/10.1007/s00395-013-0328-2>

In dieser *in vitro* Studie wurden die Aufnahmekinetiken, die Aufnahmemechanismen und der Einfluss aufgenommener Eisenoxid-Nanopartikel auf die Zellfunktion untersucht. Dabei wurden elektrostatisch stabilisierte VSOP mit hydrodynamischen Durchmessern von 6-8 nm in die Untersuchungen eingeschlossen und mit sterisch stabilisierten dextranbeschichteten Partikeln mit hydrodynamischen Durchmessern von über 60 nm (Resovist) verglichen. Als Modellzelllinie diente THP-1, eine monozytäre Linie, die eine hohe Expression der Proteoglykane Versican und Perlecan aufweist. THP-1-Monozyten lassen sich durch Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat zu Makrophagen differenzieren. VSOP markierten Monozyten und Makrophagen stärker als Resovist. Die Bindung von VSOP erfolgte deutlich schneller und führte zu keiner messbaren Erhöhung intrazellulärer ROS. VSOP hatten keinen messbaren Einfluss auf die Viabilität und Teilungsfähigkeit beladener Monozyten. Die effektive Aufnahme von VSOP wurde in primären humanen Makrophagen bestätigt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass VSOP im Gegensatz zu Resovist nicht nur durch Phagozytose aufgenommen wurden, sondern auch an Strukturen der Zelloberfläche aggregierten. Wir konnten experimentell belegen, dass es sich bei diesen Strukturen mit großer Wahrscheinlichkeit um sulfatierte Glykosaminoglykanketten, wie sie für das Proteoglykan Versican typisch sind, handelt. Wir vermuten, dass die effektive Bindung von VSOP in Makrophagen auf einer schnellen Aggregation an der Zelloberfläche und anschließender forcierter Phagozytose in die Zellen beruht. Darüber hinaus wiesen VSOP eine hohe Affinität zu *in vitro* generierten apoptotischen Membranvesikeln auf.

Somit konnten mit diesen Zellkulturexperimenten die im Kaninchenmodell erhobenen Befunde weiter untermauert werden.

3 Diskussion

Viele experimentelle und klinische Daten konnten in den vergangenen Jahren die zentrale Bedeutung der Inflammation bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Atherosklerose belegen. Die Inflammation im Gefäß wird durch komplexe Wechselwirkungen mehrerer Zelltypen, einer Vielzahl von Mediatoren und verschiedener zellulärer Prozesse verursacht. Es ist heute noch nicht erkannt, welche Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Therapien und Diagnostikverfahren den größten Erfolg versprechen. Einige vielversprechende Ansätze gegen inflammatorische Zielmoleküle und Signalwege (z.B. Leukotriene, P-Selektin, Phospholipase, TNF-Signalweg, Interleukin-1-Signalweg) befinden sich zurzeit in der präklinischen Entwicklungsphase (zur Übersicht: Charo und Taub 2011)³⁹. Im Jahr 2013 startete die CIRT (Cardiovascular Inflammation Reduction Trial)-Studie mit dem Ziel, die Inflammationshypothese der Atherothrombose direkt zu testen. Diese randomisierte, placebokontrollierte, multizentrische Studie untersucht, ob niedrigdosiertes Methotrexat bei Patienten mit überstandem Herzinfarkt und Typ 2-Diabetes oder metabolischem Syndrom kardiovaskuläre Ereignisse, wie erneuter Herzinfarkt oder Schlaganfall, reduzieren können. Ergebnisse werden 2018 erwartet⁴⁰.

3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System – ein geeignetes Target für die antiinflammatorische Therapie der Atherosklerose?

Mit der Entdeckung der Funktion des UPS bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB eröffnete sich ein neuer Weg für antiinflammatorische Therapieansätze²⁹. Die antiinflammatorische Wirkung von Proteasominhibitoren konnte in Tiermodellen von Arthritis, Psoriasis, Colitis und anderen entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden^{27,28,41}.

Das UPS greift in eine Vielzahl von zellulären Prozessen ein. Somit ist es nicht überraschend, dass man Hinweise auf eine Beteiligung des UPS sowohl an der Initiations- und Progressionsphase als auch an der Komplikationsphase der Atherosklerose finden konnte. Die Frage, welche Funktionen das UPS in den verschiedenen Stadien der Pathogenese der Atherosklerose tatsächlich hat, ist weitgehend ungeklärt. Aufgrund dieser Kenntnislücke kann über die Auswirkung von Proteasominhibitoren in der Atherosklerose nur spekuliert werden. Mehrere Autoren postulierten eine duale Rolle des UPS in der Atherosklerose: Zunächst trägt das Proteasom durch Aktivierung von proinflammatorischen Signalkaskaden zur Initiation der Atherogenese bei – Proteasominhibition wirkt hemmend auf die Atherogenese. Im späteren Verlauf wirkt das Proteasom insbesondere durch Degradation oxidativ geschädigter Proteine der Progression der Atherosklerose entgegen – Proteasominhibition forciert die Atherogenese^{42,43}. Hinzu kommt, dass Proteasominhibition auch dosisabhängig zu ganz unterschiedlichen Effekten führen kann, wie wir in umfangreichen Untersuchungen zeigen konnten^{32,44}. Während hohe Inhibitor dosierungen proapoptotisch wirken, schützt eine partielle Hemmung des Proteasoms kardiovaskuläre Zellen vor oxidativem Stress. Als zugrunde liegenden Mechanismus beschrieben Dreger et al. eine Nrf2-

vermittelte Induktion antioxidativer Enzyme in Kardiomyozyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen^{45,46}.

In Tiermodellen der Atherosklerose führte Proteasominhibition zu scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen. So berichteten Herrmann et al. 2007, dass chronische Proteasominhibition in Koronararterien hypercholesterinämischer Schweine oxidativen Stress verursacht und dadurch die endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose verstärkt⁴⁷. Im genauen Gegenteil dazu belegt unsere Studie einen antioxidativen, antiinflammatorischen und schließlich antiatherogenen Effekt in der entstehenden Atherosklerose im LDLR^{-/-} Mausmodell⁴⁸. Allerdings sind in diesen beiden Studien unterschiedliche Inhibitoren in nicht vergleichbaren Dosierungen verwendet worden. Van Herck et al. beschrieben den Effekt von Bortezomib (100 µg/kg Körpergewicht) auf bereits bestehende atherosklerotische Läsionen in Karotiden der ApoE^{-/-} Maus und bemerkten eine Veränderung der Plaquekomposition in Richtung eines rupturgefährdeten Phänotyps ohne Beeinflussung der Plaquegröße⁴⁹. Diesen Effekt konnten wir in der Aorta der LDLR^{-/-} Maus mit der von uns verwendeten niedrigeren Bortezomibkonzentration bestätigen (bisher unpublizierte Daten).

Die an Tiermodellen mit fortgeschrittener Atherosklerose gewonnen Erkenntnisse lassen einen therapeutischen Einsatz von Bortezomib in der Atherosklerose als nicht sinnvoll erscheinen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass für Bortezomib viele Nebenwirkungen beschrieben wurden, die eine langfristige Anwendung ohnehin ausschließen. Durch Bortezomib verursachte neurodegenerative Prozesse und Magen-Darm-Erkrankungen sind wahrscheinlich auf unspezifische Wirkungen, sogenannte *Off-Target*-Effekte, gegen verschiedene Serin-Proteasen, wie Cathepsin A, Cathepsin G, Chymase und Dipeptidylpeptidase II zurückzuführen⁵⁰. Neuentwickelte Inhibitoren, wie Carfilzomib⁵¹, das 2013 als Therapeutikum des Multiplen Myeloms zugelassen wurde, sollen deutlich proteasomspezifischer sein, dadurch weniger Nebenwirkungen haben und sich damit möglicherweise besser für eine Anwendung außerhalb der Tumorthherapie qualifizieren⁵⁰. Ein weiterer vielversprechender neuer Ansatz sind Inhibitoren, die spezifisch das Immunproteasom hemmen können. In murinen Modellen der rheumatoiden Arthritis²⁷ und Lupus²⁸ erwies sich der LMP7-selektive Hemmer PR-957 (ONX0914) im Vergleich zu Bortezomib und Carfilzomib als effektiver in der Hemmung der Autoimmunreaktion. PR-957 verursachte jedoch nicht nur eine Verringerung der Autoimmunantikörperproduktion, sondern erniedrigte außerdem effektiv die Konzentration einer Reihe inflammatorischer Zytokine²⁷.

Ein Proteasominhibitor, der als antiinflammatorisches Therapeutikum in der Atherosklerose anwendbar ist, muss für genau diese Anwendung geeignete Eigenschaften aufweisen. Aufgrund der ungenügenden Kenntnisse über die Funktion des Proteasoms bzw. proteasomaler Subtypen in der Atherosklerose, ist es derzeit noch nicht möglich, diese Anforderungen genau zu formulieren. Sicher sollten diese Proteasominhibitoren in erster Linie antioxidativ und antiinflammatorisch wirken und dabei eine minimale Zytotoxizität aufweisen. Denkbar wäre auch, in Analogie zur Arthritis, dass Proteasominhibitoren, die spezifisch das Immunproteasom hemmen, zum Erfolg

führen könnten. Das setzt voraus, dass die Funktion des Immunproteasoms in der Initiation und Progression der Atherosklerose verstanden wird – ein Schwerpunkt unserer aktuellen Forschung. Proteasominhibitoren anwendungsspezifisch „maßzuschneidern“, ist mit der detaillierten Aufklärung der Struktur des Proteasoms eine realistische Option geworden. Röntgenkristallstrukturanalysen ermöglichten die Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Proteasominhibitoren und dem Proteasom. Somit eröffnet sich die Möglichkeit, Leitstrukturen von inhibitorisch wirksamen Substanzen so zu verändern, dass sie hochspezifisch an bestimmte katalytische Untereinheiten des 20S Partikels binden oder selektiv immunproteasomale Untereinheiten hemmen⁵². Die Untersuchung neuer hochselektiver Proteasominhibitoren im Kontext der Inflammation des atherosklerotischen Gefäßes bildet einen weiteren Schwerpunkt unserer zukünftigen Forschung.

Für einige der in der Primär- und Sekundärprävention erfolgreich eingesetzten Medikamente wurden auch antiinflammatorische Effekte belegt. Besonders für Statine, also Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), wurden über die Senkung des Cholesterolspiegels hinausgehende, sogenannte pleiotrope Wirkungen beschrieben, die auch eine positive Beeinflussung der Entzündung einschließen. Der Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung von Statinen ist ungeklärt. Rao et al. berichteten, dass Lovastatin in seiner Prodrugform (β -Lactonstruktur) ursächlich für die Zellzyklusblockade in Tumorzellen verantwortlich ist. Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass Lovastatin in seiner Prodrugform unabhängig von einer Wirkung auf die HMG-CoA-Reduktase das Proteasom *in vitro* und in Zellen hemmt. Desweiteren wurde beschrieben, dass Mevalonat durch eine Erhöhung der proteasomalen Aktivität die proteasominhibitorische Wirkung von Lovastatin in seiner Prodrugform und von Lactacystin aufhebt⁵³. Die Hypothese, dass Statine modulierend auf die proteasomale Aktivität wirken, wurde in der Folge von verschiedenen Forschergruppen geprüft und führte zu widersprüchlichen Ergebnissen⁵⁴⁻⁵⁶. Wie oben beschrieben, konnten wir aktivitätsverändernde Effekte von Pravastatin, Atorvastatin und Simvastatin (in seiner Prodrugform) und Mevalonat weder *in vitro* an isolierten 20S Proteasomen noch an vaskulären Zellen beobachten⁵⁷. Demnach sind antiinflammatorische Effekte von Statinen unserer Erkenntnis nach nicht auf eine proteasominhibitorische Wirkung zurückzuführen.

3.2 Magnetresonanztomographie zur Darstellung von Inflammation in der Gefäßwand

Die chronische Entzündungsreaktion im atherosklerotischen Gefäß ist ein hochkomplexer Vorgang (siehe Einleitung). Andererseits ist die inflammatorische Reaktion als Teil der Immunantwort ein lebensnotwendiger Prozess. Eine langfristige chronische Applikation von Proteasominhibitoren wird deshalb auch in Zukunft nicht vorteilhaft sein. Das gilt jedoch für alle antiinflammatorischen Therapieformen gegen Atherosklerose. Sinnvoller wäre eine hochwirksame antiinflammatorische Therapie, die zeitlich und idealerweise sogar lokal begrenzt wäre. Das setzt allerdings ein

leistungsfähiges Monitoring des Therapieerfolges voraus, wobei Endpunkte für eine erfolgreiche antiinflammatorische Therapie der Atherosklerose bisher nicht definiert sind. Denkbar wären neben der Messung von löslichen Inflammationsmarkern im Serum (z.B. das C-reaktive Protein) auch die Darstellung von Veränderungen der Plaquemorphologie und Plaquekomposition. Wie in der Einleitung beschrieben, ist die kontrastmittelverstärkte MRT mit Eisenoxid-Nanopartikeln eine vielversprechende Technologie zur nichtinvasiven Darstellung von inflammatorischen Strukturen der atherosklerotischen Läsion^{33,58}. Tatsächlich wurden in einer Studie sterisch stabilisierte USPIO zum Monitoring einer Atorvastatintherapie erfolgreich eingesetzt⁵⁹. Alle bisher für experimentelle oder klinische Studien zur *in vivo* Charakterisierung atherosklerotischer Plaques eingesetzten USPIO konnten allerdings frühestens 24 Stunden nach intravenöser Applikation dargestellt werden. Im Gegensatz dazu waren die von uns getesteten VSOP schon 1 h nach intravenöser Injektion im WHHL-Kaninchen nachweisbar⁶⁰. Als Ursache für diese schnelle Anreicherung haben wir einen im Vergleich zu sterisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln grundsätzlich anderen Bindungsmechanismus gefunden: die schnelle Aggregation an Glykosaminoglykanen (GAG) der Zelloberfläche, die in der Folge auch zu einer forcierten Aufnahme in Makrophagen führte⁶¹. Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass die Wechselwirkung mit GAG auch die Ursache für eine schnelle Bindung an andere Strukturen mit offenbar hohem Gehalt an diesen Molekülen ist: den apoptotischen Membranvesikeln. Apoptotische Membranvesikel kommen in instabilen Plaques gehäuft vor. Im Kaninchenmodell wurde eine Korrelation von mit VSOP markierten Membranvesikeln und beginnender Kalzifizierung festgestellt. Wir vermuten, dass VSOP eine hohe Affinität zu GAG mit hohem Sulfatierungsgrad aufweisen. Der hohe Sulfatierungsgrad verleiht diesen GAG starke komplexierende Eigenschaften, welche die Wechselwirkung mit dem Eisen der VSOP erklären. Stark sulfatierte GAG-Ketten sind charakteristisch für Chondroitinsulfatproteoglykane wie z.B. Versican. Da Versican an Stellen mit Plaqueerosion akkumuliert, wird ein pathogenetischer Zusammenhang mit akuter koronarer Thrombose vermutet⁶². Überhaupt besteht ein enger Zusammenhang zwischen Umbauprozessen der EZM und Plaqueinstabilität. Der Verlust von Collagen und Elastin durch die Aktivität extrazellulärer Proteasen schwächt die fibröse Kappe⁶³. Auch dieser Prozess wird durch Inflammation ausgelöst. So gibt es Hinweise darauf, dass pro-inflammatorische M1 Makrophagen MMP besonders hoch exprimieren^{64,65}. Expressionsanalysen an polarisierten humanen Makrophagen wiesen in M1-MΦ ein im Vergleich zu M2-MΦ 16fach höheres Transkriptniveau für Versican nach⁶⁶. Die detaillierte Charakterisierung von GAG und Proteoglykanen, die mit VSOP darstellbar sind, sowie von Prozessen, die zur Anreicherung von diesen GAG und Proteoglykanen in der entzündeten atherosklerotischen Läsion führen, stehen im Fokus laufender Projekte unserer Forschergruppe. Wir sind überzeugt davon, dass die Anreicherung von VSOP an Strukturen der extrazellulären Matrix, die mit Matrixumbau, Apoptose und Kalzifizierung im atherosklerotischen Gefäß korrelieren, eine vielversprechende neue Marker-Target-Kombination für die Detektion rupturgefährdeter Plaques darstellt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Behandlung mit entzündungshemmenden Medikamenten stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Verringerung der Atherosklerose und ihrer Komplikationen, z. B. Myokardinfarkt und Schlaganfall, dar.

Proteasominhibition ist eine potenzielle antiinflammatorische Interventionsmöglichkeit. Genauere Kenntnisse über die Funktion des UPS bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose sind erforderlich, um Proteasominhibition als Therapiekonzept für diese Erkrankung erfolgreich weiterzuentwickeln. Eine weitere Voraussetzung ist die Entwicklung von neuen spezifischen und selektiven Proteasominhibitoren mit geringer Zytotoxizität und deren Testung in geeigneten experimentellen Modellen.

Die Darstellung von inflammatorischen Prozessen in der Gefäßwand ist nicht nur von großer diagnostischer Bedeutung, sondern könnte auch den Erfolg einer antiinflammatorischen Therapie durch ein geeignetes Therapie-Monitoring unterstützen. MRT mit VSOP ist eine vielversprechende Technologie zur nichtinvasiven Darstellung von inflammatorischen Strukturen atherosklerotischer Plaques.

Eine gezielte antiinflammatorische Therapie der Atherosklerose kombiniert mit hocheffektiver Diagnostik ist eine Option zur Senkung der Mortalität durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

5 Literaturverzeichnis

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. Jan 14 1999;340(2):115-126.
2. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Jun 2004;24(6):998-1005.
3. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*. Aug 1998;139(2):205-222.
4. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Nov 2007;27(11):2292-2301.
5. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology*. Mar 2011;12(3):204-212.
6. Ponnuswamy P, Van Vre EA, Mallat Z, Tedgui A. Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis: spotlight on B- and T-cells. *Vascular pharmacology*. May-Jun 2012;56(5-6):193-203.
7. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nature medicine*. Nov 2002;8(11):1249-1256.
8. Martinet W, Kockx MM. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Current opinion in lipidology*. Oct 2001;12(5):535-541.
9. Tabas I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxidants & redox signaling*. Sep 2009;11(9):2333-2339.
10. Van Vre EA, Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Apr 2012;32(4):887-893.
11. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic research in cardiology*. Sep 2011;106(5):749-760.
12. Shroff RC, Shanahan CM. The vascular biology of calcification. *Seminars in dialysis*. Mar-Apr 2007;20(2):103-109.
13. New SE, Goettsch C, Aikawa M, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circulation research*. Jun 21 2013;113(1):72-77.
14. Badimon L, Storey RF, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. May 2011;105 Suppl 1:S34-42.
15. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*. Dec 18 2003;426(6968):895-899.
16. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:1015-1068.
17. Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, et al. Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *The Journal of biological chemistry*. Oct 2 1998;273(40):25637-25646.
18. Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Aug 2002;82(8):965-980.
19. Fuchs SY. The role of ubiquitin-proteasome pathway in oncogenic signaling. *Cancer biology & therapy*. Jul-Aug 2002;1(4):337-341.
20. Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Mar 2003;4(3):192-201.
21. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and biophysical research communications*. Jun 6 2003;305(3):709-718.

22. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*. Apr 2002;82(2):373-428.
23. Beck P, Dubiella C, Groll M. Covalent and non-covalent reversible proteasome inhibition. *Biological chemistry*. Oct 2012;393(10):1101-1120.
24. Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chemistry & biology*. Jan 27 2012;19(1):99-115.
25. Adams J, Behnke M, Chen S, et al. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. Feb 17 1998;8(4):333-338.
26. Wojcik C. Inhibition of the proteasome as a therapeutic approach. *Drug discovery today*. Apr 1999;4(4):188-189.
27. Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature medicine*. Jul 2009;15(7):781-787.
28. Ichikawa HT, Conley T, Muchamuel T, et al. Beneficial effect of novel proteasome inhibitors in murine lupus via dual inhibition of type I interferon and autoantibody-secreting cells. *Arthritis and rheumatism*. Feb 2012;64(2):493-503.
29. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*. Sep 9 1994;78(5):773-785.
30. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology*. Feb 6 2003;91(3A):7A-11A.
31. Chapple SJ, Siow RC, Mann GE. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Aug 2012;44(8):1315-1320.
32. Meiners S, Ludwig A, Stangl V, Stangl K. Proteasome inhibitors: poisons and remedies. *Medicinal research reviews*. Mar 2008;28(2):309-327.
33. Schmitz SA, Taupitz M, Wagner S, Wolf KJ, Beyersdorff D, Hamm B. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. Oct 2001;14(4):355-361.
34. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, et al. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*. May 20 2003;107(19):2453-2458.
35. Howarth SP, Tang TY, Trivedi R, et al. Utility of USPIO-enhanced MR imaging to identify inflammation and the fibrous cap: a comparison of symptomatic and asymptomatic individuals. *European journal of radiology*. Jun 2009;70(3):555-560.
36. Tang TY, Muller KH, Graves MJ, et al. Iron oxide particles for atheroma imaging. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Jul 2009;29(7):1001-1008.
37. Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, et al. Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Investigative radiology*. Jul 2004;39(7):394-405.
38. Wagner M, Wagner S, Schnorr J, et al. Coronary MR angiography using citrate-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as blood-pool contrast agent: initial experience in humans. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. Oct 2011;34(4):816-823.
39. Charo IF, Taub R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nature reviews. Drug discovery*. May 2011;10(5):365-376.
40. Everett BM, Pradhan AD, Solomon DH, et al. Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *American heart journal*. Aug 2013;166(2):199-207 e115.
41. Kalim KW, Basler M, Kirk CJ, Groettrup M. Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation. *Journal of immunology*. Oct 15 2012;189(8):4182-4193.

42. Di Filippo C, Marfella R, D'Amico M. Possible dual role of ubiquitin-proteasome system in the atherosclerotic plaque progression. *Journal of the American College of Cardiology*. Oct 14 2008;52(16):1350-1351; author reply 1351.
43. Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. On to the road to degradation: atherosclerosis and the proteasome. *Cardiovascular research*. Jan 15 2010;85(2):291-302.
44. Meiners S, Ludwig A, Lorenz M, et al. Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free radical biology & medicine*. Jun 15 2006;40(12):2232-2241.
45. Dreger H, Westphal K, Weller A, et al. Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovascular research*. Jul 15 2009;83(2):354-361.
46. Dreger H, Westphal K, Wilck N, et al. Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovascular research*. Jan 15 2010;85(2):395-403.
47. Herrmann J, Saguner AM, Versari D, et al. Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. *Circulation research*. Oct 26 2007;101(9):865-874.
48. Wilck N, Fechner M, Dreger H, et al. Attenuation of early atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by proteasome inhibition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Jun 2012;32(6):1418-1426.
49. Van Herck JL, De Meyer GR, Martinet W, Bult H, Vrints CJ, Herman AG. Proteasome inhibitor bortezomib promotes a rupture-prone plaque phenotype in ApoE-deficient mice. *Basic research in cardiology*. Jan 2010;105(1):39-50.
50. Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, et al. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. May 1 2011;17(9):2734-2743.
51. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer research*. Jul 1 2007;67(13):6383-6391.
52. Groll M, Korotkov VS, Huber EM, de Meijere A, Ludwig A. A Minimal beta-Lactone Fragment for Selective beta5c or beta5i Proteasome Inhibitors. *Angewandte Chemie*. Jun 26 2015;54(27):7810-7814.
53. Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K. Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 6 1999;96(14):7797-7802.
54. Kumar B, Andreatta C, Koustas WT, Cole WC, Edwards-Prasad J, Prasad KN. Mevastatin induces degeneration and decreases viability of cAMP-induced differentiated neuroblastoma cells in culture by inhibiting proteasome activity, and mevalonic acid lactone prevents these effects. *Journal of neuroscience research*. Jun 1 2002;68(5):627-635.
55. Wojcik C, Bury M, Stoklosa T, et al. Lovastatin and simvastatin are modulators of the proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Sep 2000;32(9):957-965.
56. Murray SS, Tu KN, Young KL, Murray EJ. The effects of lovastatin on proteasome activities in highly purified rabbit 20 S proteasome preparations and mouse MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Metabolism: clinical and experimental*. Sep 2002;51(9):1153-1160.
57. Ludwig A, Friedel B, Metzkow S, et al. Effect of statins on the proteasomal activity in mammalian endothelial and vascular smooth muscle cells. *Biochemical pharmacology*. Aug 15 2005;70(4):520-526.
58. Patterson AJ, Tang TY, Graves MJ, Muller KH, Gillard JH. In vivo carotid plaque MRI using quantitative T2* measurements with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a dose-response study to statin therapy. *NMR in biomedicine*. Jan 2011;24(1):89-95.
59. Tang TY, Howarth SP, Miller SR, et al. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease. *Journal of the American College of Cardiology*. Jun 2 2009;53(22):2039-2050.

60. Wagner S, Schnorr J, Ludwig A, et al. Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:767-779.
61. Ludwig A, Poller WC, Westphal K, et al. Rapid binding of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles to THP-1 monocytic cells via interaction with glycosaminoglycans. *Basic research in cardiology*. Mar 2013;108(2):328.
62. Kolodgie FD, Burke AP, Wight TN, Virmani R. The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Current opinion in lipidology*. Oct 2004;15(5):575-582.
63. Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends in cardiovascular medicine*. Nov 2007;17(8):253-258.
64. Johnson JL, Sala-Newby GB, Ismail Y, Aguilera CM, Newby AC. Low tissue inhibitor of metalloproteinases 3 and high matrix metalloproteinase 14 levels defines a subpopulation of highly invasive foam-cell macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Sep 2008;28(9):1647-1653.
65. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Dec 2008;28(12):2108-2114.
66. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of immunology*. Nov 15 2006;177(10):7303-7311.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir auf meinem Weg zur Seite standen.

An erster Stelle möchte ich Gert Baumann, Karl Stangl und Verena Stangl für die langjährige Förderung und Unterstützung herzlich danken.

Allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Medizinischen Klinik für Kardiologie und Angiologie danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Lösung von technischen und wissenschaftlichen Problemen. Insbesondere möchte ich mich bei jenen bedanken, die unsere Forschungsvorhaben mit großem Engagement vorangebracht haben: bei Susanne Metzkwow, die mich viele Jahre mit ihrer Freundschaft und zuverlässigen Mitarbeit unterstützt hat sowie bei Anke Stach und Andrea Weller für ihre kompetente und gewissenhafte Arbeit. Für ihren Beitrag zum Gelingen der Forschungsprojekte danke ich allen beteiligten Doktoranden, Master- und Bachelorstudenten.

Für die gemeinsame Verwirklichung von Projekten und die zahlreichen spannenden Diskussionen danke ich Mario Lorenz, Henryk Dreger, Bernd Hewing und Wolfram Poller. Sehr gern erinnere ich mich an die Jahre der freundschaftlichen Zusammenarbeit mit Silke Meiners zurück. Von ganz besonderem Wert sind mir die vielen Stunden geteilter Begeisterung (nicht nur für die Wissenschaft) mit Nicola Wilck.

Allen Kooperationspartnern innerhalb der Klinischen Forschergruppe „Magnetische Nanopartikel für die Zelluläre und Molekulare MR-Bildgebung“ sowie Michael Groll und Vadim Korotkov danke ich für die großartige Zusammenarbeit.

Ich danke der Charité Universitätsmedizin Berlin für die Förderung meiner Arbeit durch die Gewährung des Rahel-Hirsch-Habilitationsstipendiums.

Meiner Familie bin ich für ihre Liebe und Hilfe in allen Lebenslagen dankbar.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

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

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....17.05.2016.....
Datum

.....Antje Ludwig.....
Unterschrift