

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Kardiologie und Angiologie,
Charité – Universitätsmedizin Berlin

eingereicht über das
Institut für Tierschutz
und Tierverhalten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Der Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die kardiale Hypertrophie in der Dahl Salz-sensitiven Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mandy Fechner
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3440

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Norbert-Christian Juhr
Zweiter Gutachter: PD Dr. Silke Meiners
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

protein degradation, hypertrophy, heart diseases, animal models, rats,
hypertension, cell culture

Tag der Promotion: 25.01.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-908-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

In Gedenken an Dr. med. vet. Manja Hartig

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	KARDIALE HYPERTROPHIE	3
2.1.1	Phänotypische Charakteristika der Druck-induzierten kardialen Hypertrophie	3
2.1.2	Molekulare Charakteristika der kardialen Hypertrophie	4
2.1.3	Molekulare Mechanismen der kardialen Hypertrophie	5
2.1.4	Charakteristika des kardialen Remodeling	5
2.2	TIERMODELL DAHL SALZ-SENSITIVE RATTE	6
2.3	UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM	7
2.3.1	Protein-Markierung durch Ubiquitin	7
2.3.2	Das Proteasom und der Abbau ubiquitinerter Proteine	8
2.3.3	Aufgaben des Proteasoms	10
2.4	PROTEASOMINHIBITION	12
2.4.1	Selektive Proteasominhibitoren	12
2.4.2	Effekte der Proteasominhibition	13
2.4.3	Proteasominhibitor Bortezomib	16
2.5	FRAGESTELLUNG	18
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN	20
3.1.1	Zellkultur und -präparation	20
3.1.2	Zellstimulation (Hypertrophie-Induktion und Proteasominhibition)	22
3.1.3	Messung der proteasomalen Aktivität mit Hilfe fluorogener Substrate	22
3.1.3.1	Zell-Lyse	22
3.1.3.2	Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchinonsäure (BCA) - Assay	23
3.1.3.3	Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität	24
3.1.4	Morphometrie	25
3.1.5	Relative mRNA-Expressionen von kardialen Hypertrophie-Markergenen (ANP und α -MHC)	26
3.1.5.1	RNA-Isolation	26
3.1.5.2	cDNA-Synthese	28
3.1.5.3	Quantitative Real-Time-PCR	28
3.1.6	Zellviabilität	30
3.2	IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN	30
3.2.1	Versuchstiere	30
3.2.2	Tierhaltung	31
3.2.3	Tierfütterung	31
3.2.4	Bortezomib	31
3.2.5	Versuchsaufbau	32
3.2.6	Blutdruckmessung	33
3.2.7	Euthanasie der Versuchstiere und Blutentnahme	33
3.2.8	Entnahme von Herz und Aorta	34
3.2.9	Entnahme weiterer Organe und Gewebe	35

Inhaltsverzeichnis

3.2.10	Messung der proteasomalen Aktivität in PBMC, Leber, Niere und Herz mit Hilfe fluorogener Substrate	35
3.2.10.1	Lymphozytenisolierung	35
3.2.10.2	Zell-Lyse	36
3.2.10.3	Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchinonsäure (BCA) - Assay	36
3.2.10.4	Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität	36
3.2.11	Bestimmung des relativen Herzgewichts	36
3.2.12	Histopathologische Untersuchung des Herzens	36
3.2.13	Morphometrische Untersuchung der Kardiomyozyten	37
3.2.14	Quantitative Analyse der kardialen Fibrose	37
3.2.15	Relative mRNA-Expression von kardialen Hypertrophie- und Fibrose-Markergenen (β-MHC und Col IIIa1)	38
3.2.15.1	RNA-Isolation	38
3.2.15.2	cDNA-Synthese	38
3.2.15.3	Quantitative Real-Time-PCR	39
3.2.16	Untersuchung der Vasoreaktivität der isolierten Aorta descendens	39
3.2.17	Relative mRNA-Expressionen von eNOS, ET-1 und VCAM-1 in der Aorta	41
3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND GRAPHISCHE DARSTELLUNG	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	EINFLUSS DES PROTEASOMINHIBITORS BORTEZOMIB AUF HYPERTROPHIERTE NEONATALE RATTENKARDIOMYOZYTEN	43
4.1.1	Bortezomib reduzierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in nRC	43
4.1.2	Der Proteasominhibitor reduzierte die Isoproterenol-induzierte Flächenzunahme von nRC	44
4.1.3	Die Supprimierung des hypertrophen Zellwachstums durch Bortezomib war mit einer verminderten Expression von kardialen Hypertrophie-Markergenen assoziiert	46
4.1.4	Die partielle Inhibition des Proteasoms hatte keinen Einfluss auf die Viabilität von nRC	47
4.2	EINFLUSS DES PROTEASOMINHIBITORS BORTEZOMIB AUF DIE HYPERTONIE-INDUZIERTER KARDIALE HYPERTROPHIE IN DER DAHL SALZ-SENSITIVEN RATTE	48
4.2.1	Bortezomib reduzierte die Morbidität und Mortalität hypertensiver DSSR	49
4.2.2	Der Proteasominhibitor verhinderte die Körpergewichtsabnahme hypertensiver DSSR	51
4.2.3	Bortezomib verhinderte tendenziell die Erhöhung der relativen Organgewichte salzgefütterter DSSR	53
4.2.4	Bortezomib reduzierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in PBMC und Organen tendenziell	54
4.2.5	Einfluss des niedrig-dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf das Herz Dahl Salz-sensitiver Ratten	57
4.2.5.1	Bortezomib reduzierte das Herzgewicht hypertensiver DSSR	57
4.2.5.2	Die Herzen Bortezomib-behandelter DSSR waren histopathologisch unauffälliger	62
4.2.5.3	Das reduzierte Herzgewicht war mit einer tendenziell verringerten Kardiomyozyten-Querschnittsfläche assoziiert	62
4.2.5.4	Die Expression des kardialen Hypertrophie-Markergens β-MHC wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst	64
4.2.5.5	Das reduzierte Herzgewicht war mit einem tendenziell reduzierten Kollagenanteil assoziiert	65

Inhaltsverzeichnis

4.2.5.6	Die Expression des kardialen Fibrose-Markergens Col IIIa1 wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst	67
4.2.6	Einfluss des niedrig-dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf das Gefäßsystem Dahl Salz-sensitiver Ratten	67
4.2.6.1	Bortezomib verringerte den arteriellen Blutdruck in hypertensiven DSSR	68
4.2.6.2	Der Proteasominhibitor verbesserte die beeinträchtigte Vasoreaktivität hypertensiver DSSR tendenziell	69
4.2.6.3	Die Expression der eNOS in der Aorta wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst	72
4.2.6.4	Der reduzierte arterielle Blutdruck Bortezomib-behandelter DSSR war mit einer tendenziell verringerten Expression von ET-1 in der Aorta assoziiert.....	73
4.2.6.5	Bortezomib reduzierte die Expression des inflammatorischen Markers VCAM-1 in der Aorta hypertensiver Ratten.....	74
4.2.7	Die Behandlung hypertensiver DSSR mit Bortezomib induzierte keine hämatologischen oder hämatopoetischen Nebenwirkungen.....	75
5	DISKUSSION	77
5.1	EINFLUSS DES PROTEASOMINHIBITORS BORTEZOMIB AUF HYPERTROPHIERTE NEONATALE RATTENKARDIOMYOZYTEN	78
5.1.1	Bortezomib inhibierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in nRC ohne zytotoxische Nebeneffekte	78
5.1.2	Der Proteasominhibitor Bortezomib wirkte in nRC anti-hypertroph	79
5.2	EINFLUSS DES PROTEASOMINHIBITORS BORTEZOMIB AUF DIE HYPERTONIE-INDUZIERT KARDIALE HYPERTROPHIE IN DER DAHL SALZ-SENSITIVEN RATTE	80
5.2.1	Bortezomib inhibierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in DSSR organspezifisch.....	80
5.2.2	Bortezomib wirkte in DSSR anti-hypertroph.....	82
5.2.2.1	Bortezomib reduzierte das Herzgewicht hypertensiver DSSR	82
5.2.2.2	Das Herzgewicht wurde trotz nicht signifikanter anti-fibrotischer und anti-hypertropher Effekte signifikant reduziert.....	85
5.2.2.3	Die Expressionen von Hypertrophie- und Fibrose-Markergenen wurden durch Bortezomib nicht beeinflusst	87
5.2.2.4	Mögliche Mechanismen der anti-hypertrophen Wirkung einer Proteasominhibition	88
5.2.3	Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf das Gefäßsystem Dahl Salz-sensitiver Ratten	90
5.2.3.1	Der Proteasominhibitor wirkte in DSSR anti-hypertensiv.....	90
5.2.3.2	Bortezomib verbesserte die beeinträchtigte Vasoreaktivität hypertensiver DSSR tendenziell	91
5.2.3.3	Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Expression der eNOS in den Aorten hypertensiver DSSR	94
5.2.3.4	Bortezomib reduzierte die Expression von ET-1 in der Aorta tendenziell	95
5.2.3.5	Anti-inflammatorische Effekte von Bortezomib in dem Gefäßsystem hypertensiver DSSR.....	96
5.2.4	Die kardiovaskuläre Protektion des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib in DSSR war mit einer reduzierten Morbidität und Mortalität assoziiert.....	97
5.3	EIGNUNG DES TIERMODELLS	98
5.4	EIGNUNG DES VERSUCHSREGIMES	99

Inhaltsverzeichnis

5.5	FAZIT DER IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN UND PERSPEKTIVE DES PROTEASOMINHIBITORS BORTEZOMIB FÜR DIE THERAPIE DER KARDIALEN HYPERTROPHIE	100
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
7	SUMMARY.....	104
8	ANHANG.....	106
	A Abkürzungsverzeichnis	106
	B Literaturverzeichnis	108
	C Publikationsverzeichnis	125
	D Danksagung	126
	E Selbständigkeitserklärung.....	127

1 Einleitung

Die kardiale Hypertrophie stellt einen Adaptationsmechanismus des Herzens an eine chronische Arbeitsüberlastung dar und zeichnet sich durch ein hypertrophes Wachstum der Kardiomyozyten und einer daraus resultierenden Vergrößerung des Herzens aus (Sugden, 1998). Anfänglich ermöglicht dies eine kompensatorische Zunahme der kontraktilen Kraft (Sugden, 1998). Langfristig gesehen ist die kardiale Hypertrophie jedoch mit einem Remodeling assoziiert. Die Fibroblasten proliferieren (Wakatsuki, 2004), die extrazelluläre Matrix wird umgebaut (Jalil, 1998) und die Kardiomyozyten gehen in Apoptose (Teiger, 1996). Daraus resultieren eine zunehmende Wandsteifigkeit sowie ein Kontraktionsverlust und letztendlich die Abnahme der Herzleistung (Sugden, 1998; Wakatsuki, 2004). In diesem Stadium stellt die kardiale Hypertrophie einen unabhängigen Risikofaktor für diverse kardiovaskuläre Komplikationen, wie Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung, plötzlichen Herztod und Schlaganfall dar (Levy, 1988). Das Mortalitätsrisiko von Patienten mit einer kardialen Hypertrophie steigt – unabhängig von Alter, Geschlecht und anderen Risikofaktoren – um das Zwei- bis Vierfache (Artham, 2009). Die Ergebnisse der Tromso-Studie zeigten für die linksventrikuläre Hypertrophie eine Prävalenz von 15 % bei Männern bzw. 9 % bei Frauen der Allgemeinbevölkerung (Schirmer, 1999). Aufgrund dieser hohen klinischen Relevanz stellt die Reduzierung der kardialen Hypertrophie ein wichtiges therapeutisches Ziel dar. Dabei steht bisher die medikamentöse Behandlung des Hauptrisikofaktors der kardialen Hypertrophie - die chronische arterielle Hypertonie - im Vordergrund. Aufgrund der multifaktoriellen Pathogenese der Hypertonie ist diese Therapiestrategie jedoch nicht immer erfolgversprechend. Es besteht demnach ein großer Handlungsbedarf für die Entwicklung neuer Therapieverfahren.

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist für den selektiven Abbau nahezu aller intrazellulären Proteine verantwortlich und spielt bei der Kontrolle von zahlreichen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle (Rock, 1994; Hershko, 1998). Das Proteasom degradiert zum einen geschädigte und gealterte Proteine (Coux, 1996; Voges, 1999) und zum anderen ist es in die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose (Naujokat, 2002), der Transkription (Muratani, 2003), der Inflammation (Elliott, 2003), der Signaltransduktion (Kisselev, 2001) und in die Antigenpräsentation involviert (Kloetzel, 2004).

Eine Hemmung des Proteasoms durch spezifische Inhibitoren hat je nach Zelltyp und Proliferationsstatus, Art und Dosis des Inhibitors und Dauer der Hemmung unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle bzw. den Organismus (Borissenko, 2007; Meiners, 2008 b). Während der ersten Untersuchungen mit Proteasominhibitoren stellten sich vor allem deren anti-proliferativen und pro-apoptotischen Eigenschaften heraus. Diese wurden schon frühzeitig als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt für die Behandlung von malignen Krebserkrankungen erkannt und führten zu der Entwicklung und Zulassung des Peptid-Boronates Bortezomib (Delic, 1998; Adams, 2004).

Im Laufe der letzten Jahre wurden zunehmend protektive Auswirkungen der Proteasominhibition nachgewiesen, vor allem wenn diese nur partiell erfolgte. Dazu gehören beispielsweise anti-inflammatorische Effekte, insbesondere bei Ischämie/Reperfusionsschäden (Campbell, 1999; Pye, 2003; Zhang, 2006) und eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation, u. a. durch anti-oxidative Effekte (Stangl, 2004; Lorenz, 2009).

Die anti-hypertrophen Effekte einer Proteasominhibition konnte Dreger erstmalig in einem *In-vitro*-Modell der neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRC) nachweisen (Dreger, 2003).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf hypertrophierte kultivierte nRC *in vitro* und eine Hypertonie-induzierte kardiale Hypertrophie *in vivo* untersucht werden. Sollte die anti-hypertrophe Wirkung *in vivo* nachweisbar sein, könnte sich daraus ein möglicher therapeutischer Einsatz der partiellen Proteasominhibition in der kardialen Hypertrophie ableiten. Voraussetzungen dafür wären neben einer deutlichen Reduktion der kardialen Hypertrophie, das möglichst geringfügige Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen.

2 Literaturübersicht

2.1 Kardiale Hypertrophie

Die kardiale Hypertrophie bezeichnet eine Vergrößerung des Herzens durch eine Volumenzunahme der Kardiomyozyten bei gleichbleibender Zellzahl und zeichnet sich außerdem durch eine Myofibrillogenese, erhöhte RNA- und Proteinsynthese und qualitative Veränderungen in der Genexpression aus (Sugden, 1998). Sie ermöglicht die Adaptation des Herzens an eine chronisch erhöhte Arbeitsleistung, die durch verschiedene pathologische Zustände, z. B. einer arteriellen Hypertonie notwendig wird (Sugden, 1998).

Eine pathologische kardiale Hypertrophie ist im Gegensatz zu einer physiologischen Hypertrophie („Sportlerherz“) mit einem kardialen Remodeling assoziiert. Dieses umfasst sowohl eine Proliferation von Fibroblasten (Wakatsuki, 2004) und Veränderungen der extrazellulären Matrix (Jalil, 1998) als auch eine Zunahme des apoptotischen Zelltodes von Kardiomyozyten (Teiger, 1996).

Die Hypertrophie des Herzens stellt anfänglich einen kompensatorischen Mechanismus dar und ermöglicht eine Zunahme der kontraktilen Kraft und eine verbesserte Druck-Volumen-Arbeit der Ventrikel (Sugden, 1998). Langfristig gesehen führen die interstitielle Fibrose und die damit einhergehende Wandsteifigkeit des Herzens sowie die Apoptose von Kardiomyozyten und der daraus resultierende Kontraktionsverlust jedoch zu einer Abnahme der Herzleistung (Sugden, 1998; Wakatsuki, 2004). Die kardiale Hypertrophie stellt an diesem Punkt einen unabhängigen Risikofaktor für diverse kardiovaskuläre Ereignisse, wie Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung, plötzlichen Herztod und Schlaganfall dar (Levy, 1988).

2.1.1 Phänotypische Charakteristika der Druck-induzierten kardialen Hypertrophie

Die chronische arterielle Hypertonie ist, neben genetischen Polymorphismen und dem Verlust von Kardiomyozyten infolge ischämischer Schäden, der wichtigste Risikofaktor für die pathologische kardiale Hypertrophie (Barry, 2008). Die Hypertonie führt zu einer chronischen Drucküberlastung des Herzens und dadurch zu der Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie. Kardiomyozyten reagieren auf eine zunehmende Wandspannung mit der Neusynthese parallel angeordneter Sarkomere und nehmen im Durchmesser zu, während sich ihre Länge nicht verändert. In Folge dessen werden die Ventrikelwände und das Septum dicker, während sich das Kammervolumen nicht verändert oder sogar verkleinert. Diese phänotypischen Veränderungen ermöglichen die Anpassung der Herzleistung an die chronische Drucküberlastung.

2.1.2 Molekulare Charakteristika der kardialen Hypertrophie

Verschiedene Zellkulturmodelle, insbesondere neonatale Rattenkardiomyozyten (nRC), ermöglichten in den letzten Jahrzehnten die genaue Untersuchung von hypertrophen Stimuli und ihren Effekten hinsichtlich der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie. Die Untersuchungen ergaben, dass Kardiomyozyten auf hypertrophe Stimuli mit charakteristischen Veränderungen der Genexpression reagieren (Glennon, 1995), die wiederum die oben beschriebenen phänotypischen Veränderungen induzieren und aufrechterhalten (Frey, 2003). Relativ schnell, aber nur vorübergehend, kommt es in den nRC zu der Expression sogenannter „unmittelbar frühen Gene“ (*immediate early genes*), zu denen Gene gehören, die die Transkriptionsfaktoren c-fos, c-jun, c-myc und egr-1 (*early growth response factor-1*) kodieren. Diese Expressionsänderung scheint eine unspezifische Reaktion terminal differenzierter Zellen in Antwort auf Wachstumsstimuli zu sein. Wenige Stunden nach Einsetzen des Hypertrophiestimulus kommt es in ventrikulären neonatalen Rattenkardiomyozyten zu der langfristigen Reexpression fetaler Gene, die normalerweise nur in der frühen Entwicklung der kardialen Ventrikel exprimiert werden (Iwaki, 1990). Dazu zählen Gene, die die kontraktile Proteine β -MHC (*β -myosin heavy chain*) (Waspé, 1990) und α -skA (*α -skeletal actin*) (Bishopric, 1987) und die natriuretischen Peptide ANP (atriales natriuretisches Peptid) (Knowlton, 1991) und BNP (*brain natriuretic peptid*) (Nakagawa, 1995) kodieren. In Abhängigkeit von dem hypertrophen Stimulus können jedoch Abweichungen von dem sogenannten „fetalen Genmuster“ auftreten. Beispielsweise induziert das β -adrenerge Isoproterenol in kultivierten nRC eine erhöhte Genexpression von α -MHC (*α -myosin heavy chain*) und reduziert die Genexpression von β -MHC (Rupp, 1991).

Ähnliche Effekte hypertropher Stimuli auf die Expression von „unmittelbar frühen Genen“ und das „fetale Genmuster“ können *in vivo* beobachtet werden (Izumo, 1988; Glennon, 1995). Allerdings gibt es dabei spezieabhängige Besonderheiten zu beachten. Adulte, wie auch fetale humane ventrikuläre Kardiomyozyten exprimieren vor allem die Myosin-Isoform β -MHC. In den Ventrikeln adulter Nager dominiert jedoch α -MHC (Lompré, 1984). Hypertrophe Stimuli induzieren hier einen Wechsel der Isoformen von adultem α -MHC zu fetalem β -MHC. In adulten humanen Kardiomyozyten kann zwar eine erhöhte Genexpression von β -MHC beobachtet werden (Lowe, 1997), von einem Wechsel der Myosin-Isoformen kann aber aufgrund der sowieso schon dominierenden Expression von β -MHC nicht die Rede sein (Nadal-Ginard, 1989). Dementsprechend gilt reexprimiertes fetales β -MHC nur in Nager-Ventrikeln als Hypertrophie-Marker (Izumo, 1987).

Die Manifestation der erhöhten β -MHC-Genexpression auf Proteinebene ermöglicht Ratten mit hypertrophierten Herzen eine bioenergetisch effizientere ventrikuläre Kontraktion (Nadal-Ginard, 1989). Die funktionelle Signifikanz der erhöhten Expression von β -MHC in humanen Kardiomyozyten ist jedoch unklar (LeWinter, 2005).

Die erhöhte Expression von ANP und BNP in druck- bzw. volumenüberlasteten Ventrikeln stellt einen kompensatorischen Mechanismus dar. Die beiden natriuretischen Peptide wirken natriuretisch, diuretisch, vasodilatierend, reduzieren in Folge dessen die hämodynamische Last und dadurch indirekt die Hypertrophie von Kardiomyozyten (Nadal-Ginard, 1989).

Eine direkte antihypertrophe Wirkung von ANP konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Horio, 2000; Knowles, 2001).

2.1.3 Molekulare Mechanismen der kardialen Hypertrophie

Zahlreiche hypertrophe Stimuli aktivieren in Kardiomyozyten über verschiedene Rezeptoren eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen. Bei der Drucküberlastungs-Hypertrophie des Herzens spielt insbesondere die mechanische Dehnung der Kardiomyozyten eine bedeutende Rolle als Hypertrophie-induzierender Stimulus (Komuro, 1991). Die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin (Simpson, 1991) sowie die vasoaktiven Peptide Endothelin-1 (ET-1) (Sugden, 1996) und Angiotensin II (Nagano, 1992) stellen weitere wichtige Induktoren der kardialen Hypertrophie dar.

Die genannten Stimuli agieren unter anderem über Integrine und G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die wiederum vielfältige Signaltransduktionswege, z. B. die Kaskaden der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen oder die Proteinkinase B aktivieren und außerdem den intrazellulären Kalziumgehalt erhöhen. Letztendlich werden dadurch Transkriptionsfaktoren, z. B. MEF2 (*myocyte enhancer factor*) aktiviert (Sugden, 1998), die wiederum qualitative und quantitative Veränderungen der Genexpression und der Proteinsynthese induzieren (Sugden, 1998). Außerdem führt der erhöhte Kalziumspiegel zu einer gesteigerten Myozytenkontraktion.

An der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie sind des Weiteren Zellzyklus-regulierende Proteine, z. B. Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (CDK) beteiligt, die durch hypertrophe Stimuli vermehrt exprimiert werden (Busk, 2002; Tamamori-Adachi, 2002). Sie aktivieren Signaltransduktionswege, die auch durch mitogene Stimuli aktiviert werden können und induzieren somit das Zellwachstum. Eine Zellteilung erfolgt bei den terminal ausdifferenzierten Kardiomyozyten jedoch nicht (MacLellan, 2000).

Die Dehnung des Herzens bzw. der Kardiomyozyten infolge einer Drucküberlastung ist außerdem mit einer (lokalen) Freisetzung der hypertrophen Stimuli Endothelin-1 und Angiotensin II assoziiert (van Wamel, 2001). Beide Stimuli erhöhen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die wiederum das hypertrophe Wachstum von Kardiomyozyten unterstützen können (Sawyer, 2002). Dabei spielt auch der Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B) eine Rolle (Li, 2004). Des Weiteren verstärkt Angiotensin II durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und dem damit einhergehenden Blutdruckanstieg indirekt die Dehnung des Herzens und damit die Hypertrophie.

2.1.4 Charakteristika des kardialen Remodeling

Das Myokard reagiert auf eine chronische Drucküberlastung nicht nur mit der Hypertrophie der Kardiomyozyten, sondern auch mit einem kardialen Remodeling. Dafür charakteristisch sind, neben einer Zunahme des apoptotischen Zelltodes von Kardiomyozyten, auch Veränderungen der extrazellulären Matrix, eine Proliferation der Fibroblasten und ihre

Differenzierung zu Myofibroblasten. Diese exprimieren im Gegensatz zu normalen Fibroblasten α -smooth muscle actin und zeichnen sich durch eine größere Kontraktilität und Kollagenproduktion aus. Aus den genannten Veränderungen resultieren die Entwicklung einer kardialen Fibrose, eine Zunahme der Wandsteifigkeit und letztendlich eine Abnahme der Herzleistung (Wakatsuki, 2004).

Die extrazelluläre Matrix des Herzens besteht v. a. aus vernetzten Kollagenfasern (Typ I und III) und sichert die strukturelle Integrität der Kardiomyozyten. Eine chronische Drucküberlastung des Herzens induziert ein Remodeling der extrazellulären Matrix. Dieses zeichnet sich durch eine erhöhte Kollagen-Akkumulation und eine veränderte Zusammensetzung und Struktur der extrazellulären Matrix aus. Daraus resultieren ein schlechter vernetztes Kollagengerüst und eine Verminderung der strukturellen Integrität der Kardiomyozyten. An diesen Umbauvorgängen sind vor allem verschiedene Untergruppen der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) beteiligt. Ihre Genexpression und Aktivität ist während des kardialen Remodelings erhöht (Spinale, 2000; Spinale, 2007).

Bei der Induktion eines kardialen Remodelings infolge einer Drucküberlastung spielt neben der Aktivierung des RAAS (Unger, 2004) auch der Wachstumsfaktor TGF- β (*transforming growth factor β*) eine Rolle. Dieser führt zu der oben beschriebenen Phänotyp-Konvertierung von Fibroblasten (Kuwahara, 2004).

2.2 Tiermodell Dahl Salz-sensitive Ratte

Die Dahl Salz-sensitive Ratte (DSSR) gilt als Tiermodell der genetisch determinierten Salz-sensitiven Hypertonie. Innerhalb weniger Wochen wird durch die Fütterung einer salzhaltigen Diät eine ausgeprägte Hypertonie in diesen Tieren induziert. Daraus resultieren eine progressive konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie und Fibrose und renale Läsionen (Rapp, 1985).

In der Literatur werden verschiedene pathophysiologische Mechanismen diskutiert, die der Salz-sensitiven Hypertonie in DSSR zugrunde liegen. Offenbar handelt es sich dabei um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem vor allem Vasodilatoren und Vasokonstriktoren eine wichtige Rolle spielen.

Schon im Jahre 1987 beobachteten Lüscher *et al.* eine beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation in isolierten Aortenringen von salzgefütterten DSSR (Lüscher, 1987). Diese resultiert aus der reduzierten Bioverfügbarkeit des endogenen Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO). Zum einen wird aufgrund der reduzierten Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) weniger NO in den Gefäßen synthetisiert (Chen, 1993; Ni, 1999). Zum anderen wird NO durch den erhöhten Gehalt von reaktiven Sauerstoffspezies in DSSR sehr schnell zu vasoinktiven Metaboliten abgebaut (Swei, 1997; Cai, 2000). Letztendlich führt die verminderte Bioverfügbarkeit von NO zu einer Erhöhung des vaskulären Widerstandes. Dieser resultiert außerdem aus der erhöhten Expression des Vasokonstriktors Endothelin-1

in den Gefäßen von DSSR und bedingt die Entwicklung der Hypertonie in diesem Tiermodell (Barton, 1998).

In den vergangenen Jahren wurden weitere Auffälligkeiten in salzgefütterten DSSR beobachtet, die mit der Entwicklung der Salz-sensitiven Hypertonie in Zusammenhang gebracht werden. Dazu gehören z. B. die erhöhten Aktivitäten des sympathischen Nervensystems (Huang, 1994) und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Zhao, 2000). Außerdem scheinen die Nieren bzw. deren Dysfunktion in der Pathogenese dieser Krankheit eine wichtige Rolle zu spielen (Churchill, 1992; Liu, 2008). Letztendlich trägt möglicherweise auch eine durch ROS induzierte, unspezifische vaskuläre Inflammation zu der Entwicklung einer Hypertonie in salzgefütterten DSSR bei (Tian, 2007).

2.3 Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist für den selektiven Abbau nahezu aller intrazellulären Proteine verantwortlich und stellt damit den wichtigsten nicht-lysosomalen Abbauweg intrazellulärer Proteine in eukaryotischen Zellen dar (Rock, 1994; Zolk, 2006). Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irvine Rose wurden 2004 für ihre erstmalige Beschreibung des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus im Jahre 1982 mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet.

Der Abbau von Proteinen durch das UPS umfasst zwei eigenständige, nacheinander ablaufende Schritte. Zuerst werden die Proteine durch die kovalente Bindung von mehreren Ubiquitin-Molekülen markiert (Jentsch, 1992). Dann erfolgt der ATP-abhängige Abbau dieser markierten Proteine durch das im Zellkern und Zytosol vorkommende 26S Proteasom (Seufert, 1992; Ugai, 1993). Dieser Ubiquitin-vermittelte Abbau von Proteinen spielt bei der Kontrolle von zahlreichen intrazellulären Prozessen eine wichtige Rolle (Hershko, 1998) und ist essentiell für die Lebensfähigkeit eukaryotischer Zellen (Coux, 1996).

2.3.1 Protein-Markierung durch Ubiquitin

Proteine, die für den Abbau durch das 26S Proteasom vorgesehenen sind, werden durch die kovalente Bindung von Ubiquitin-Ketten markiert und dadurch hochselektiv von dem 26S Proteasom erkannt und abgebaut (Voges, 1999) (siehe Abbildung 1).

Ubiquitin ist ein kleines hoch konserviertes Protein (Hershko, 1992). Für die Bindung an das Zielprotein ist die aufeinanderfolgende Aktivität von verschiedenen Enzymen notwendig. Zuerst wird Ubiquitin durch einen ATP-verbrauchenden Schritt durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird im Anschluss auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 übertragen (Hershko, 1992; Ciechanover, 1994). Der dritte Schritt wird durch eine Ubiquitin-Ligase E3 katalysiert. Dabei wird der C-terminale Glycin-Rest des Ubiquitins durch eine Isopeptidbindung kovalent an einen spezifischen Lysin-Rest des Substratproteins gebunden. Anschließend wird durch die Bindung weiterer Ubiquitin-Moleküle an einen spezifischen Lysin-Rest des vorherigen Ubiquitins eine

Polyubiquitin-Kette gebildet (Ciechanover, 1994). Eine effiziente Multi-Ubiquitinierung wird durch den Ubiquitinketten-Elongationsfaktor E4 katalysiert (Koegl, 1999). Die Markierung des Zielproteins mit mindestens vier Ubiquitin-Molekülen ist notwendig, um effizient vom Proteasom gebunden und abgebaut zu werden (Thrower, 2000).

Es gibt nur ein E1-Enzym, viele verschiedene E2-Enzyme, multiple Klassen mit hunderten von E3-Enzymen und mehrere Klassen E4-Enzyme (Hershko, 1998; Hoppe, 2005). Für die Selektivität der Ubiquitin-Protein-Bindung und damit für den selektiven Proteinabbau sind hauptsächlich die Ubiquitin-Ligasen verantwortlich. Sie erkennen spezifische Degradationssignale, z. B. Phosphorylierungen, spezifische N-terminale Aminosäurereste und Aminosäuresequenzen (Hershko, 1998).

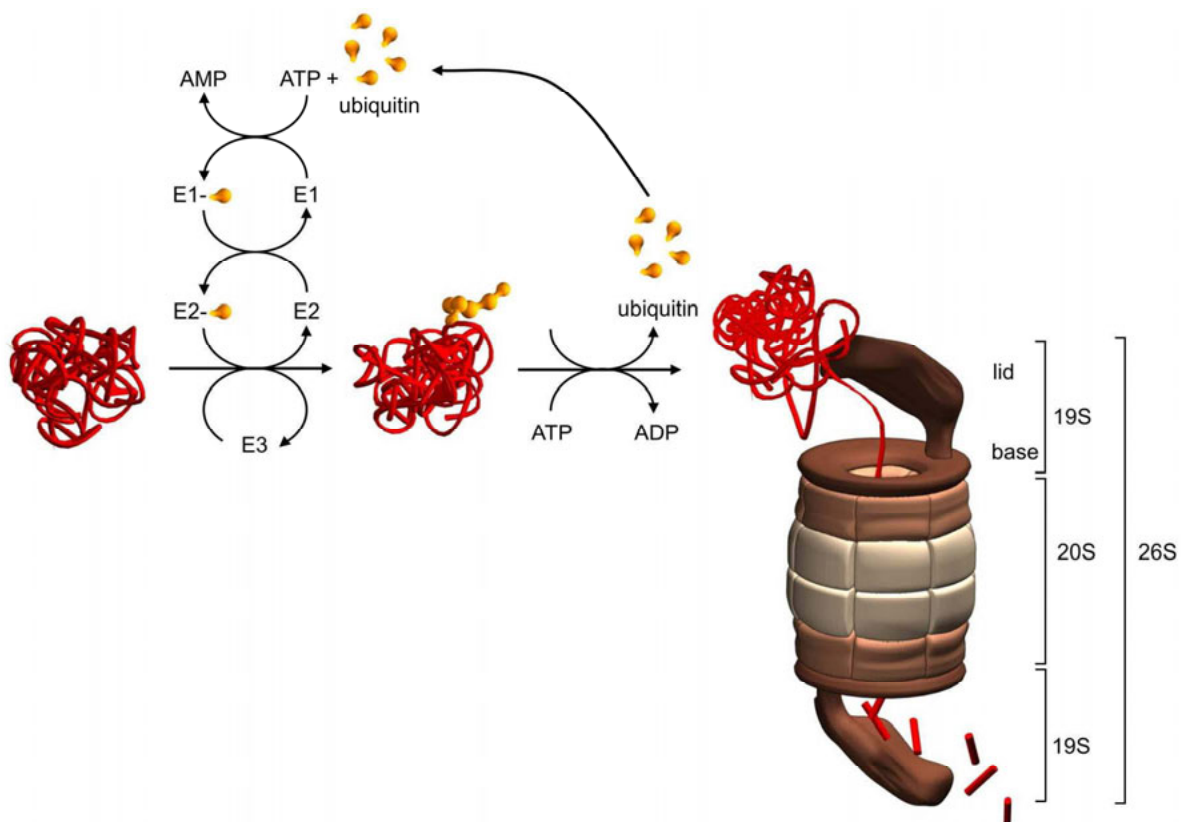


Abbildung 1: Ein für den proteasomalen Abbau vorgesehenes Protein (rot dargestellt) wird in einem ATP-abhängigen Prozess durch die Aktivität von drei Enzymen mit mehreren Ubiquitin-Molekülen (gelb dargestellt) markiert. Anschließend erfolgt die Erkennung, Bindung und Entfaltung durch den 19S Regulatorkomplex und die Translokation des Proteins in die zentrale proteolytische Kammer des 20S Proteasoms. Hier erfolgt durch die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten der Abbau in Oligopeptide (aus Meiners *et al.*, 2008).

2.3.2 Das Proteasom und der Abbau ubiquitiniertes Proteine

Das 26S Proteasom wird durch die ATP-abhängige Assemblierung des 20S Proteasoms mit dem 19S Regulatorkomplex gebildet (Dubiel, 1995; Hershko, 1998). Das 20S Proteasom, auch Kernkomplex genannt, beinhaltet die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten (Groll,

1997). Die Funktion des 20S Proteasoms wird durch den 19S Regulatorkomplex reguliert. Das 26S Proteasom ist 2,5 MDa groß, 45 nm lang, 20 nm breit und besteht aus mindestens 32 verschiedenen Untereinheiten, die bei allen Eukaryoten hoch konserviert sind (Voges, 1999; Glickman, 2002) (siehe Abbildung 1).

Der tonnenförmige proteolytische Kernkomplex der Eukaryoten besteht aus vier übereinander gestapelten Ringen. Die zwei inneren Ringe bestehen aus je sieben β -Untereinheiten (β 1-7) und werden jeweils oben und unten von einem Ring aus je sieben α -Untereinheiten (α 1-7) flankiert. Das 20S Proteasom setzt sich also aus zwei identischen α -Ringen und zwei ebenfalls gleichen β -Ringen zusammen und besteht aus insgesamt 28 Untereinheiten (Groll, 1997; Voges, 1999). Zusammen umgeben die vier Ringe drei innere Hohlräume, zwei Vorkammern und eine zentrale proteolytische Kammer (Voges, 1999). Die beiden Vorkammern werden von den α - und β -Ringen gebildet, die zentrale Kammer nur von den β -Untereinheiten (Voges, 1999; Groll, 2005). Die Assemblierung des 20S Proteasoms aus den verschiedenen Untereinheiten unterliegt einem präzise geregeltem Prozess, der die exakte Positionierung der verschiedenen Untereinheiten garantiert (Schmidt, 1997).

Jeder Kernkomplex besitzt drei verschiedene proteolytisch aktive Seiten, die in den Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 lokalisiert sind und in die zentrale Kammer hineinragen (Dick, 1998). Sie gehören zu der Familie der N-terminalen nukleophilen Hydrolasen (Brannigan, 1995). Die Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonin-Restes der β -Untereinheiten greift den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung der Substratproteine nukleophil an und induziert dadurch ihre hydrolytische Spaltung (Voges, 1999). Das 20S Proteasom kann Peptidbindungen nach jeder Aminosäure spalten. Die drei proteolytisch aktiven β -Untereinheiten spalten jedoch bevorzugt nach unterschiedlichen Aminosäuren (Glickman, 2002). Die katalytischen Threonin-Reste der β 5-Untereinheiten spalten bevorzugt hinter hydrophoben Resten. Ihre Aktivität wird Chymotrypsin-ähnlich genannt. Die β 2-Untereinheiten spalten hauptsächlich hinter basischen Aminosäuren und werden Trypsin-ähnlich genannt. Die aktiven Seiten der β 1-Untereinheiten spalten bevorzugt Peptidbindungen hinter sauren Aminosäuren und werden Caspase-ähnlich genannt (früher auch Post-Glutamyl-Hydrolase Aktivität) (Dick, 1998; Kisselev, 1999). Die Bindung eines Proteins an die spezifische Substratbindungstasche einer proteolytisch aktiven Seite kann auch die übrigen Aktivitäten beeinflussen. Demzufolge ergibt sich die proteolytische Aktivität des Proteasoms aus dem Zusammenspiel verschiedener aktiver Seiten (Borissenko, 2007).

Durch die proteolytische Aktivität des Proteasoms entstehen Peptide mit 4 - 25 Aminosäureresten. Durchschnittlich entstehen Oligopeptide mit sieben bis neun Resten (Nussbaum, 1998). Diese Peptide werden von der Zelle zum einen für die MHC-Klasse-1-Antigenpräsentation verwendet (York, 1999; Kloetzel, 2004) und zum anderen durch verschiedene Proteasen und Aminopeptidasen hydrolysiert (Glickman, 2002).

Die α -Untereinheiten sind katalytisch inaktiv. Sie spielen jedoch eine essentielle strukturgebende Rolle, indem sie die Bildung und Stabilisierung der β -Ringe ermöglichen (Zwickl, 1994). Sie bilden außerdem durch ineinandergreifende N-terminale Seitenketten eine Pore und limitieren dadurch den Zugang von Proteinen in die Vorkammern (Groll, 1997). Die

Bindung des 19S Regulatorkomplexes erfolgt ebenfalls durch die α -Untereinheiten (Peters, 1993; Gray, 1994).

Die 19S Regulatorkomplexe sind an der Erkennung, Bindung, Entfaltung und Translokation der ubiquitinierten Proteine in das Innere des 20S Komplexes beteiligt. Sie befinden sich an beiden Enden des Kernkomplexes und geben dem 26S Proteasom eine hantelförmige symmetrische Struktur (Coux, 1996).

Der 19S Regulatorkomplex besteht aus zwei Teilen. Der größere wird Basis-Komplex (*base*) genannt, befindet sich proximal vom 20S Proteasom und setzt sich aus neun Untereinheiten zusammen, sechs davon sind ATPasen. Der kleinere, Deckel-Komplex (*lid*) genannt, befindet sich distal des Kernkomplexes und besteht aus acht Untereinheiten (Glickman, 1998).

Die ATPasen des Basis-Komplexes unterstützen die ATP-abhängige Assemblierung des 20S Proteasoms und 19S Regulatorkomplexes zum 26S Proteasom (Voges, 1999). Eine weitere wichtige Rolle des 19S Regulatorkomplexes ist die ATP-abhängige Erkennung und Bindung polyubiquitinerter Proteine (Lam, 2002). Aufgrund ihrer Größe ist es gefalteten Proteinen nicht möglich in die Vorkammern des 20S Proteasom zu gelangen. Die ATPasen des Regulatorkomplexes sind in der Lage, die Substratproteine zu entfalten (Braun, 1999) und interagieren des Weiteren direkt mit den α -Untereinheiten des Kernkomplexes. Dies führt zu einer ATP-abhängigen Öffnung der Pore, die den Zugang in die Vorkammern und damit in die zentrale proteolytische Kammer ermöglicht (Köhler, 2001). Mit dem 19S Regulator-komplex assoziierte, deubiquitinierende Enzyme bauen während oder nach dem Proteinabbau durch das 26S Proteasom die Ubiquitin-Kette von distal ausgehend ab, so dass die Ubiquitin-Moleküle wieder für die Markierung weiterer Proteine zur Verfügung stehen (Voges, 1999).

2.3.3 Aufgaben des Proteasoms

Das Ubiquitin-Proteasom-System baut selektiv ca. 80 – 90 % aller intrazellulären Proteine ab (Rock, 1994; Voges, 1999). Dabei degradiert das UPS zum einen geschädigte und gealterte Proteine (Coux, 1996; Voges, 1999). Außerdem spielt es eine essentielle Rolle in zahlreichen grundlegenden zellulären Prozessen, wie der Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose (Naujokat, 2002), der Transkription (Muratani, 2003), der Inflammation (Elliott, 2003), der Signaltransduktion (Kisselev, 2001) und in der Antigenpräsentation (Kloetzel, 2004).

Eine grundlegende Aufgabe des Proteasoms ist der selektive Abbau von anormalen und geschädigten – potentiell toxischen – Proteinen (Glickman, 2002). Dies betrifft sowohl Proteine direkt nach ihrer Synthese, die z. B. mutiert oder falsch gefaltet sind, als auch gealterte Proteinen im Rahmen des Proteinumsatzes (Coux, 1996).

Der Zellzyklus ist von der koordinierten Aktivität seiner positiven (Zykline, Zyklin-abhängige Kinasen) und negativen Regulatoren (Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen)

abhängig. Durch das UPS erfolgt der selektive Abbau beider Regulatoren. Der Ubiquitin-vermittelte Abbau der negativen Regulatoren (z. B. p27^{Kip1}) beendet die Pausen zwischen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus, so dass dieser fortschreiten kann. Der zeitlich streng regulierte proteasomale Abbau der Zyklone erlaubt eine korrekte Terminierung des Zyklus-vermittelten Eintritts in die S-Phase des Zellzyklus. Das 26S Proteasom ist außerdem sowohl an der Induktion als auch an der Suppression der Apoptose beteiligt. Diese gegensätzlichen Effekte sind wahrscheinlich u. a. von dem Proliferationsstatus der Zelle abhängig (Naujokat, 2002).

Die Regulierung von Transkriptionsfaktoren (z. B. NF- κ B, p53, c-jun, c-fos) durch den Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau ist für die Genexpression essentiell (Kisselev, 2001; Adams, 2004). Dabei kann eine Kontrolle der Lokalisation, der Aktivität und der Menge der Transkriptionsfaktoren erfolgen (Muratani, 2003). Als NF- κ B werden induzierbare dimere Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die zu der Rel-Familie gehören. Ihre Aktivierung induziert u. a. die Expression vieler Gene, die in die Immun- und Inflammations-Antwort involviert sind. Außerdem stimuliert NF- κ B die Zellproliferation, inhibiert die Apoptose und induziert die Angiogenese. In nicht-stimulierten Zellen verhindern an NF- κ B gebundene Inhibitorproteine (I κ B) die Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem Zytosol in den Zellkern. Zahlreiche extrazelluläre proinflammatorische Stimuli (z. B. TNF α) induzieren durch die Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes eine Phosphorylierung von I κ B. Diese stellt ein Degradationssignal dar, führt zu einer Ubiquitinierung und damit zu dem Abbau von I κ B durch das UPS. Der nun freie Transkriptionsfaktor NF- κ B kann in den Zellkern translozieren und die Expression von Genen aktivieren, die z. B. für Zytokine und Adhäsionsmoleküle (z. B. ICAM, VCAM) kodieren (Palombella, 1994; Karin, 2000). Letztere sind u. a. an der Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten in entzündete Gebiete beteiligt (Weber, 1994; Kalogeris, 1999).

Die Regulierung der Signaltransduktion durch das Ubiquitin-Proteasom-System erfolgt durch den Abbau von aktivierten Proteinkinasen, z. B. der Proteinkinase C, infolge dessen die Kaskade der Signaltransduktion unterbrochen wird (Kisselev, 2001). Außerdem spielt der Ubiquitin-vermittelte Proteinabbau bei der Regulierung von Zelloberflächen-Rezeptoren und Ionenkanälen eine Rolle (Ciechanover, 2000).

Das UPS generiert durch den Proteinabbau Peptide, die von MHC-Klasse-1-Molekülen auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen präsentiert werden und von zytotoxischen T-Lymphozyten als zelleigen oder „fremd“ erkannt werden. Die Antigen-Präsentation durch das konstitutive 26S Proteasom kann durch die Interferon- γ -induzierte Bildung des sogenannten Immunoproteasoms und der Synthese des Proteasom-Aktivators PA28 deutlich gesteigert werden. Das Immunoproteasom unterscheidet sich von dem konstitutiven 20S Proteasom durch die Expression und Assemblierung der Immuno-Untereinheiten LMP2, LMP7 und MECL-1 an Stelle der konstitutiven β -Untereinheiten 1, 5 und 2 (York, 1999; Kloetzel, 2004).

Fehler im Ubiquitin-Proteasom-System sind in viele pathologische Zustände und Krankheiten involviert. Dazu gehören neurodegenerative, autoimmune, rheumatoide, maligne und

kardiale Erkrankungen, virale Infektionen und Kachexie. Ursächlich können sowohl Fehler bei der Ubiquitin-Markierung (z. B. defekte E2- und E3-Enzyme) sein als auch ein in der Aktivität verändertes 26S Proteasom. So führt z. B. die altersabhängig beobachtete Abnahme der proteasomalen Aktivität zu einer verminderten Qualitätskontrolle durch das UPS und unterstützt damit die Entstehung neurodegenerativer und kardialer Erkrankungen. Der genaue zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar (Dahlmann, 2007).

2.4 Proteasominhibition

Die Entdeckung und Entwicklung von zellpermeablen spezifischen Proteasominhibitoren ermöglichten es, die physiologische Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems genauer zu untersuchen (Kisselev, 2001). Außerdem wurden die biologischen Effekte verschiedener Proteasominhibitoren und ihr möglicher therapeutischer Einsatz näher untersucht. Anfänglich wurden dabei vor allem die zytotoxischen Effekte in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellt und ihr Potenzial hinsichtlich der Therapie von malignen Krebserkrankungen analysiert. In den letzten Jahren rückten jedoch zunehmend nicht-toxische, z. B. anti-inflammatorische Effekte, in das Interesse der Wissenschaft.

2.4.1 Selektive Proteasominhibitoren

An dieser Stelle wird nur auf Proteasominhibitoren eingegangen, die kovalente Bindungen mit den N-terminalen Threonin-Resten der β -Untereinheiten des Proteasoms eingehen. Durch diese Modifizierung kann der Threonin-Rest nicht mehr als Nukleophil wirken und Peptidbindungen spalten. Aufgrund ihres gleichen katalytischen Mechanismus können alle drei aktiven Seiten des Proteasoms auf diese Art gehemmt werden. Allerdings ist das Ausmaß der Hemmung aufgrund der verschiedenen Bindungsaffinitäten der Inhibitoren gegenüber den spezifischen Substratbindungstaschen der proteolytisch aktiven β -Untereinheiten unterschiedlich und man kann daher eine differentielle Hemmung beobachten. In der Regel wird die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität am stärksten gehemmt. Ihre selektive Inhibition reduziert den proteasomalen Abbau je nach Substratprotein um bis zu 50 % (Kisselev, 2006).

Die selektiven Proteasominhibitoren, die kovalente Bindungen mit den Threonin-Resten der aktiven Seiten bilden, lassen sich in Peptid-Aldehyde, Peptid-Boronate, Peptid-Vinylsulfone, Peptid-Epoxyketone und Nicht-Peptide unterteilen.

Die Peptid-Aldehyde, z. B. MG132, waren die ersten synthetisch hergestellten Proteasominhibitoren und werden in der Forschung am häufigsten verwendet (Rock, 1994). Sie bilden reversible kovalente Hemiacetal-Bindungen mit der Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins der aktiven Seite und inhibieren sie dadurch. Sie werden jedoch schnell von der Zelle abgebaut und hemmen auch andere Proteasen (Kisselev, 2001).

Der Proteasominhibitor Bortezomib gehört zu den Peptid-Boronaten. Diese sind wesentlich potenter als die Peptid-Aldehyde und besitzen eine höhere Spezifität für das Proteasom. Sie

bilden ein tetraedrisches Addukt mit dem N-terminalen Threonin-Rest. Peptid-Boronate dissoziieren nur sehr langsam von den proteolytisch aktiven Seiten ab, daher ist ihre Bindung nahezu irreversibel (Adams, 1998; Kisselev, 2001).

2.4.2 Effekte der Proteasominhibition

Eine Hemmung des Proteasoms führt in erster Linie zu einer verminderten Proteindegradation und der Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen (Rock, 1994; Kisselev, 2001).

In proliferierenden Zellen, insbesondere Tumorzellen, hemmen Proteasominhibitoren durch die Stabilisierung von CDK-Inhibitoren das Fortschreiten des Zellzyklus. Dies führt, gemeinsam mit weiteren pro-apoptotischen Effekten der Proteasominhibition, zu einer Induktion der Apoptose (Kisselev, 2001).

Die anti-proliferativen und pro-apoptotischen Eigenschaften der Proteasominhibitoren wurden schon frühzeitig als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt für die Behandlung von proliferativen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und der vaskulären Restenose erkannt (Delic, 1998; Meiners, 2002). In Folge dessen wurde die Entwicklung von Proteasominhibitoren für die Behandlung maligner Erkrankungen vorangetrieben. Daraus resultierte letztendlich die Zulassung des Peptid-Boronates Bortezomib (Adams, 2004).

Der mögliche Einsatz von Proteasominhibitoren in der Therapie der vaskulären Restenose wurde 2002 in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen können nach einer vaskulären Intervention (z. B. Stentimplantation) eine Neointima bilden und dadurch das zuvor geöffnete Gefäß wieder verschließen. In einem Rattenmodell (Ballondilatierte Karotiden) konnte die Proliferation durch die lokale Applikation des Proteasominhibitors MG132 signifikant reduziert und pro-apoptotische Effekte nachgewiesen werden. Außerdem wurden anti-inflammatorische Effekte (z. B. reduzierte Makrophagen-Infiltration, supprimierte NF- κ B-Aktivierung) beobachtet (Meiners, 2002). Letzteres macht deutlich, dass die Inhibition des Proteasoms nicht nur zytotoxische Effekte nach sich zieht.

In einem Rattenmodell der kardialen Fibrose konnte unsere Arbeitsgruppe anti-proliferative Effekte der proteasomalen Hemmung feststellen, ohne dass jedoch eine Apoptose induziert wurde. Spontan hypertensive Ratten (SHR) unterliegen einem kardialen Remodeling. Dieses beinhaltet eine Proliferation der Fibroblasten und strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix, die durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) kontrolliert werden. Die systemische Behandlung der Tiere mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor MG132 reduzierte die Proliferation der Fibroblasten und supprimierte die Expression einiger Kollagene und ihrer umbauenden Enzyme, den MMP. Für die Hemmung der Fibroblasten-Proliferation ist möglicherweise die Akkumulation von Zyklinen und CDK-Inhibitoren unter der Inhibition des Proteasoms verantwortlich. Die reduzierte Expression der Kollagene und MMP wurde mit einer reduzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und weiteren, noch unbekanntem Signalwegen in Verbindung gebracht (Meiners, 2004).

Im Laufe der letzten Jahre wurden zunehmend protektive Auswirkungen der Proteasominhibition nachgewiesen. Außerdem wurde deutlich, dass die hemmungsbedingten Effekte von dem Zelltyp und Proliferationsstatus, der Art und Dosis des Inhibitors und der Dauer der Hemmung abhängig sind (Borissenko, 2007; Meiners, 2008 b). So wurde zum Beispiel beobachtet, dass die Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus in ausdifferenzierten und ruhenden Zellen - im Gegensatz zu proliferierenden Zellen - vor Apoptose schützen kann.

In Versuchen mit humanen lymphoiden Tumorzellen stellten Meriin *et al.* außerdem dosisabhängige Effekte der Proteasominhibition fest. Während hohe Dosen die Apoptose induzierten, schützten niedrige Dosen die gleichen Zellen vor dem programmierten Zelltod. Die Autoren vermuteten, dass die Protektion durch eine Proteasominhibition-vermittelte Expressionssteigerung von HSP72 induziert wurde (Meriin, 1998). Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen mit humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC). Die Proteasominhibitoren MG132 und MG262 induzierten durch Dosierungen, die die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (ChTL) um mehr als 90 % inhibierten und auch die beiden anderen Aktivitäten unterschiedlich stark hemmten, die Apoptose in den HUVEC. Wurde die ChTL nur um ca. 80 % gehemmt und die beiden anderen Aktivitäten kaum beeinflusst, konnten die Autoren keine Apoptose-Induktion beobachten. Stattdessen wurde eine erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen (HSP70, HSP22) und anti-oxidativen Enzymen (Gluthathion-Peroxidase-3, Superoxid-Dismutase-1, Hämoxygenase-1) nachgewiesen, die die Zellen vor H₂O₂-induziertem oxidativen Stress schützten (Meiners, 2006). Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe auch in nRC eine erhöhte Expression von anti-oxidativen Enzymen unter nicht-toxischen Dosierungen des Proteasominhibitors MG132 und einen dadurch vermittelten Schutz vor oxidativem Stress nachweisen (Dreger, 2009). Letztendlich zeigen diese und weitere *In-vitro*-Untersuchungen, dass eine anhaltende ausgeprägte Inhibition aller drei proteasomaler Aktivitäten zytotoxisch ist. Die partielle Hemmung der ChTL in nicht-transformierten Zellen wird im Gegensatz dazu gut toleriert und übt verschiedene protektive Effekte aus (Meiners, 2008 b).

Zu den protektiven Effekten der partiellen Proteasominhibition gehört die schon erwähnte Induktion von verschiedenen Hitzeschockproteinen (Bush, 1997) (Stangl, 2002). Diese stellen ein Abwehrsystem der Zelle dar, indem sie die intrazelluläre Akkumulation von geschädigten, potentiell toxischen Proteinen, die insbesondere unter Stressbedingungen (z. B. Hitze, Ischämie) entstehen, verhindern.

In verschiedenen Tiermodellen mit Ischämie/Reperfusionsschäden, deren wichtigstes Kennzeichen eine Inflammation darstellt, konnten ebenfalls protektive Effekte einer Proteasominhibition nachgewiesen werden. In dem Endothel ischämischer Gefäße wird eine Expressionserhöhung von Adhäsionsmolekülen (z. B. VCAM) induziert, die wiederum zirkulierende Leukozyten rekrutieren. Diese gelangen nach ihrer Adhäsion per Diapedese in das ischämische Gewebe und sind für viele weitere Schäden verantwortlich. In einem Rattenmodell der fokalen zerebralen Ischämie konnte der Proteasominhibitor PS-519 die Einwanderung von Leukozyten und die Infarktfläche reduzieren und letztendlich die neurologische Funktion verbessern. Die Autoren vermuteten, dass diese Ergebnisse auf eine

reduzierte NF- κ B-Aktivierung zurückzuführen sind. Des Weiteren konnten auch sie die schon erwähnten dosisabhängigen Effekte der Proteasominhibition nachweisen (Phillips, 2000). Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen mit dem Proteasominhibitor Bortezomib (Zhang, 2006). In einem Ischämie/Reperusionsmodell am isolierten Rattenherz konnten Campbell *et al.* 1999 zum ersten Mal kardioprotektive Effekte infolge der Hemmung des Proteasoms aufzeigen. Die Autoren vermuteten auch in diesem Fall eine anti-inflammatorische Wirkung, insbesondere durch die inhibitorische Wirkung auf die Adhäsionsmoleküle (Campbell, 1999). In einem Schweinmodell des Myokardinfarkts konnte durch die Hemmung des Proteasoms eine reduzierte Infarktfläche und eine verbesserte myokardiale Funktion festgestellt werden. In diesem Fall machten die Autoren eine verminderte Aktivierung von NF- κ B - der wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen induziert - zumindest teilweise für die kardioprotektiven Effekte verantwortlich (Pye, 2003). Die potenten anti-inflammatorischen Effekte der Proteasominhibition konnten auch in chronischen inflammatorischen Krankheiten (z. B. rheumatoide Arthritis) nachgewiesen werden. Die zugrunde liegende Ursache scheint in allen Fällen hauptsächlich die supprimierte Aktivierung von NF- κ B zu sein (Elliott, 2003).

Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten außerdem, dass die partielle Hemmung des Proteasoms mit einem positiven Einfluss auf die Endothelfunktion assoziiert ist. Der niedrig dosierte Proteasominhibitor MG132 verbesserte die endothelabhängige Vasodilatation nach Gabe des Vasodilatators Acetylcholin in gesunden isolierten Rattenaortenringen, die mit Phenylephrin vorkontrahiert wurden (Stangl, 2004). Er verhinderte außerdem eine TNF- α -induzierte vaskuläre Dysfunktion (Lorenz, 2009). Dieser Effekt wurde anfänglich einer möglicherweise erhöhten Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zugeschrieben (Stangl, 2004). Diese katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), das als gefäßschützend gilt und u. a. die endothelabhängige Vasodilatation induziert. Spätere Untersuchungen konnten diese Vermutung jedoch nicht verifizieren und zeigten andere Ursachen der verbesserten Endothelfunktion infolge einer partiellen Hemmung des Proteasoms auf (Lorenz, 2009). Nichts desto trotz konnte eine erhöhte Expression der eNOS unter Proteasominhibition und daraus resultierende positive Effekte in anderen Tiermodellen der Atherosklerose (Chade, 2005) und der zerebralen Ischämie (Zhang, 2006) nachgewiesen werden. Zu den von Lorenz *et al.* vermuteten Ursachen einer supprimierten vaskulären Dysfunktion in isolierten Rattenaortenringen gehören die verminderte Superoxid-Produktion und die Reduzierung der Expression von Endothelin-1. Superoxid-Anionen inaktivieren NO und tragen damit zu einer endothelialen Dysfunktion bei. Während einer partiellen Hemmung des Proteasoms durch MG132 konnte eine reduzierte Expression der Superoxid-produzierenden NADPH-Oxidase nachgewiesen werden. Außerdem wurden vermehrt anti-oxidative Enzyme wie die Superoxid-Dismutase-1 exprimiert. Diese Effekte erhöhten möglicherweise die Bioverfügbarkeit von NO und verbesserten die Endothelfunktion. Dazu trug des Weiteren die reduzierte Genexpression des potenten Vasokonstriktors ET-1 bei (Lorenz, 2009), die auch in dem oben genannten Atherosklerose-Modell nachgewiesen werden konnte (Chade, 2005). In einem Rattenmodell des akuten ischämischen Nierenversagens konnte ebenfalls ein reduzierter Endothelin-Gehalt

beobachtet werden, der möglicherweise im Zusammenhang mit einer verbesserten renalen Funktion stand (Takaoka, 1999). In hypertensiven Desoxy-Corticosteron-Acetat-Salz-sensitiven Ratten, die mit dem Proteasominhibitor PSI behandelt wurden, war die reduzierte Expression von Endothelin-1 sogar mit einem reduzierten Blutdruck assoziiert (Okamoto, 1998). Möglicherweise trägt die verbesserte Endothelfunktion während einer partiellen Hemmung des Proteasoms zu den schon erwähnten protektiven Effekten in den Tiermodellen der Ischämie/ Reperfusionsschäden durch eine verbesserte Durchblutung bei (Meiners, 2008 b).

Letztendlich ist anzumerken, dass eine *In-vitro*-Hemmung des Proteasoms in Zellen von Säugetieren eine Hochregulierung der mRNA-Expression und Proteinsynthese aller proteasomalen Untereinheiten sowie die Assemblierung neuer Proteasome induziert. Auf diese Weise werden neue nicht-gehemmte Proteasomen generiert, die eine Kompensation der reduzierten proteasomalen Aktivität erlauben (Meiners, 2003). Allerdings dürfte dieser Effekt bei einer wiederholten Hemmung des Proteasoms nur eine untergeordnete Rolle spielen.

2.4.3 Proteasominhibitor Bortezomib

Die Suche nach spezifischen Inhibitoren des 26S Proteasoms führte zu der Entwicklung von Bortezomib (Bross, 2004). *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen machten die anti-proliferativen und pro-apoptotischen Eigenschaften, insbesondere in transformierten Zellen, deutlich (Adams, 2004). In Prostatakarzinomzellen führte Bortezomib z. B. zu einer Erhöhung des CDK-Inhibitors p21. Dieser inhibierte die Zellzyklusprogression durch eine Blockierung des G1-S- und G2-M-Überganges (Adams, 1999). In Anbetracht dieser Fähigkeiten wurde Bortezomib als erster Proteasominhibitor in humanen Studien bezüglich seiner anti-tumorösen Fähigkeiten getestet (Adams, 2004).

Im April 2004 wurde der Proteasominhibitor Bortezomib (früher PS-341 oder MLN-341) in Deutschland für die Behandlung von Patienten mit progressivem multiplem Myelom zugelassen. Der Vertrieb innerhalb der Europäischen Union erfolgt durch die Firma JANSSEN-Cilag International NV (Belgien) unter dem Produktnamen *Velcade*¹. Bortezomib ist der erste und bisher einzige zugelassene Proteasominhibitor.

Bortezomib ist ein kleines modifiziertes Borsäuredipeptid, das aus den Aminosäuren Leucin und Phenylalanin besteht. *Velcade*[®] wird als Mannitol-Borester in Form von gefriergetrocknetem Pulver angeboten. Gelöst in 0,9%iger Natriumchloridlösung, besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Ester und seinem Hydrolyseprodukt, der monomeren Borsäure.

¹www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000539/WC500048136.pdf [Stand 08.08.2010, 14:31]

Die chemische Bezeichnung für die monomerische Form lautet [(1R)-3-methyl-1-[[[(2S)-1-oxo-3-phenyl-2-[(pyrazinylcarbonyl)amino]propyl]-amino}butyl]borsäure. Das Molekulargewicht beträgt 384,24 g/Mol. Die chemische Summenformel lautet $C_{19}H_{25}BN_4O_4$ (Bross, 2004).

Bortezomib wird nach intravenöser Applikation zu ca. 83 % an Plasmaproteine gebunden. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber durch verschiedene Cytochrom P450-Isoenzyme (Bross, 2004). Dabei entstehen eine große Anzahl unterschiedlicher Metaboliten, die sowohl renal als auch hepatisch eliminiert werden (Simons, 2006).

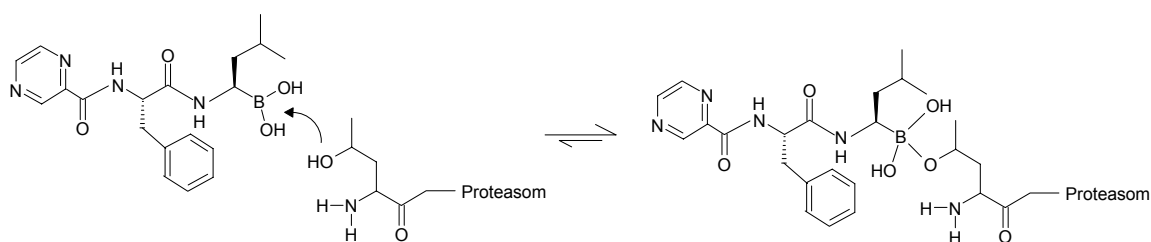


Abbildung 2: Der Proteasominhibitor Bortezomib (links) inhibiert die Threonin-Protease der proteasomalen β -Untereinheiten und verhindert dadurch den Abbau von Proteinen. Dazu geht das Boratom von Bortezomib eine kovalente Bindung mit dem Sauerstoffatom des N-terminalen Threonin-Restes der proteolytisch aktiven β -Untereinheiten ein (nach Borissenko und Groll, 2007).

Bortezomib hemmt selektiv, dosisabhängig und reversibel die Proteasomaktivität (Adams, 2004). Die Inhibition erfolgt durch die kovalente Bindung des Boratoms von Bortezomib an die N-terminale Aminosäure Threonin der proteolytisch aktiven Seiten (Borissenko, 2007) (siehe Abbildung 2). Unter physiologischen Bedingungen hemmt Bortezomib vorzugsweise die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität. In geringerem Ausmaß wird die Caspase-ähnliche Aktivität gehemmt, während die Trypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms kaum beeinflusst wird (Berkers, 2005).

Eine Dosierung von 1,96 mg/m² führt in Leukozyten von Menschen zu einer 80%igen Hemmung des Proteasoms (Adams, 2004). 48 - 72 Stunden nach Applikation erreicht die Proteasomaktivität wieder das Ausgangs-Niveau (Adams, 2004; Bross, 2004).

Nach intravenöser Applikation kann Bortezomib, mit Ausnahme des ZNS, der Augen und der Hoden, in allen Organen nachgewiesen werden. Dabei werden die höchsten Gehalte in der Leber nachgewiesen, während in den Nieren und insbesondere im Herzen weniger Bortezomib detektiert werden kann (Adams, 1999).

In dem Zulassungsbericht der FDA (*Food and Drug Administration*) wurden unerwünschte Nebenwirkungen (Thrombozytopenie, Nephrotoxizität, Neurotoxizität) für Bortezomib bei Ratten erst ab einer Dosierung von $\geq 0,6$ mg/m² beschrieben, wenn der Proteasominhibitor zweimal wöchentlich über 26 Wochen intraperitoneal injiziert wurde. Das Ausmaß der unerwünschten Nebenwirkungen nimmt in Abhängigkeit von der Dosis zu (Bross, 2004). Die tägliche Applikation von Bortezomib wird nur schlecht toleriert. Eine intermittierende

Gabe erlaubt einen längeren Applikationszyklus, weil die proteasomale Aktivität zwischen zwei Gaben das Grundniveau erreichen kann (Bross, 2004).

2.5 Fragestellung

Der Einfluss einer Proteasominhibition auf die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie *in vivo* war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Zu diesem Zeitpunkt hatte Dreger erstmalig *in vitro* den anti-hypertrophen Effekt einer niedrig dosierten Proteasominhibition in neonatalen Rattenkardiomyozyten nachgewiesen. In seinen Untersuchungen erfolgte die Induktion einer Kardiomyozytenhypertrophie mit unterschiedlichen Agonisten. Zeitgleich wurden die Zellen mit verschiedenen Proteasominhibitoren (MG132, MG262) behandelt. Zwei Tage später konnte eine partielle Hemmung des Proteasoms und die verminderte Ausbildung einer Hypertrophie in den nRC festgestellt werden. Dies heißt im Detail, dass infolge der Behandlung mit den Proteasominhibitoren die Zellgröße reduziert war, die mRNA-Expressionen verschiedener Hypertrophie-Markergene reduziert waren und eine Hypertrophie-induzierte Zunahme der RNA- und Proteinsynthese nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Dabei waren die Hypertrophie-supprimierenden Effekte unabhängig von dem eingesetzten Hypertrophiestimulus und es konnte keine Zytotoxizität festgestellt werden (Dreger, 2003).

Zusätzlich zu der von Dreger festgestellten Hypertrophie-Suppression in nRC konnte in einer anderen Untersuchung ein weiterer Effekt der Proteasominhibition festgestellt werden, der zu Beginn dieser Arbeit vermuten ließ, dass eine partielle Hemmung des Proteasoms auch *in vivo* einen Einfluss auf die kardiale Hypertrophie haben könnte. Meiners *et al.* konnten in dem Tiermodell der spontan hypertensiven Ratte anti-fibrotische Effekte einer Proteasominhibition bei einer kardialen Fibrose nachweisen (Meiners, 2004) (siehe 2.4.2). Dies führte zu der Vermutung, dass ein mit einer kardialen Hypertrophie assoziiertes Remodeling durch die Hemmung des Proteasoms beeinflusst werden kann.

Aufgrund der genannten Untersuchungen und Ergebnisse sollte in dieser Arbeit der Einfluss einer partiellen Inhibition des Proteasoms in einem Tiermodell der Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie untersucht werden. Dazu wurden der Proteasominhibitor Bortezomib und die Dahl Salz-sensitive Ratte ausgewählt. Bortezomib bietet, im Gegensatz zu MG132, zum einen den Vorteil, in Wasser bzw. Kochsalzlösung löslich zu sein. Zum anderen ist Bortezomib ein bereits zugelassenes Arzneimittel und viele Details, z. B. bezüglich seiner Toxizität sind bereits untersucht und bekannt.

Analog zu den *In-vitro*-Daten von Dreger sollte in dem ersten Teil dieser Arbeit der Beweis erbracht werden, dass der Proteasominhibitor Bortezomib in nRC ähnliche anti-hypertrophe Eigenschaften aufweist, wie die Proteasominhibitoren MG132 und MG262.

In dem zweiten Teil der Arbeit sollte in dem Tiermodell der Dahl Salz-sensitiven Ratte folgendes untersucht werden:

1. Kann Bortezomib durch die partielle Hemmung des Proteasoms die Ausbildung einer Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie verhindern? Lassen sich mögliche Effekte makroskopisch (Herzgewicht), mikroskopisch (Querschnittsfläche der Kardiomyozyten) und molekularbiologisch (mRNA-Expression eines Hypertrophie-Markergens) nachweisen?
2. Beeinflusst der niedrig dosierte Proteasominhibitor Bortezomib die mit einer kardialen Hypertrophie assoziierte Fibrose? Wenn ja, lassen sich diese Effekte makroskopisch (Herzgewicht), mikroskopisch (Kollagenanteil) und molekularbiologisch (mRNA-Expression von Kollagen) nachweisen?
3. Ist der Einfluss des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf die Hypertonie-induzierte kardiale Hypertrophie im Tiermodell der DSSR ausreichend, um einen möglichen neuen therapeutischen Ansatzpunkt darzustellen? Treten unerwünschte Nebenwirkungen auf?

3 Material und Methoden

3.1 *In-vitro*-Untersuchungen

3.1.1 Zellkultur und –präparation

Materialien

Hanks balancierte Salzlösung (HBSS)	
ohne Kalzium und Magnesium	Invitrogen
L-15 (Leibovitz) Medium	
mit L-Glutamin und L-Aminosäuren	Invitrogen
M199 Medium	
mit L-Glutamin und L-Aminosäuren	Invitrogen
Serum neugeborener Kälber (NBCS)	Invitrogen
Trypsin-EDTA (in HBSS, ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Invitrogen
Kollagenase Typ 2 (70 mg in 50 ml L-15 Medium)	Cell Systems
Cytosin-β-D-arabinofuranosid (Ara-C)	
(10 mM in PBS)	Sigma
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Invitrogen
Trypanblau (0,4 % in PBS)	ICN Biomedicals
Fibronektin	
(625 µl gelöst in 50 ml PBS mit 0,2 % Gelatine)	PromoCell
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):	
137 mM NaCl	Merck
2,7 mM KCL	Merck
4,3 mM Na ₂ HPO ₄	Merck
1,4 mM KH ₂ PO ₄	Merck
pH 7,3 (HCl)	Merck

Zellkulturschale, 150 mm Durchmesser	Falcon
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Falcon
Zellsieb, 70 µm, Nylon	Falcon
Zellkulturplatte, 6 Vertiefungen, Flachboden, 9,6 cm ² Wachstumsfläche	Falcon
Laminarbox LaminAir HBB 2448	Heraeus Instruments
Wasserbad 1092	GFL
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Function line CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer)	Poly Optik

Durchführung

Zellkultur

Die Kultivierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten erfolgte grundsätzlich in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung. Als Standardmedium wurde M199 benutzt, dem 0,1 mg/ml Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurde. Um eine Kontamination der Zellen zu vermeiden, wurde unter einer Werkbank mit laminarer Strömung gearbeitet.

Zellpräparation

Für die Gewinnung der neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden zwei bis drei Tage alte Wistar-Ratten durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Tiere mit 70%igem Ethanol desinfiziert und dann thorakotomiert. Nach Entnahme der Herzen wurden die Atrien abpräpariert und die Ventrikel einem Waschschrift in eiskaltem HBSS (Hanks balancierte Salzlösung) unterzogen. In einer Zellkulturschale mit frischem HBSS (9 ml für 10 Ventrikel) wurden die Ventrikel mit einem Skalpell in 1 mm³ große Stückchen geschnitten. Für den Verdau wurden diese 18 - 20 Stunden mit 50 µg/ml Trypsin bei 4 °C inkubiert. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde mit 2 ml NBCS (Serum neugeborener Kälber) abgestoppt. Nach Zugabe von 5 ml Kollagenaselösung und Überführung in ein Zentrifugenröhrchen wurde die Zell-Lösung für 20 - 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad geschwenkt. Durch vorsichtiges Auf- und Niederpipettieren mit einer 10 ml Pipette wurde das angedaute Herzgewebe weiter zerkleinert. Mit Hilfe eines 70 µm-Zellsiebes (angefeuchtet mit L-15 Medium) wurde das Zellgemisch filtriert. Während einer 7-minütigen Zentrifugation bei 900 U/min sedimentierten die Zellen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 20 ml M199 (mit 10 % NBCS, 10 µM Ara-C, 0,1 mg/ml Penicillin-Streptomycin) resuspendiert. In einer Zellkulturschale wurde die

Zellsuspension für zwei Stunden im Brutschrank präplattiert. Dabei setzen sich z. B. kardiale Fibroblasten schneller ab als Kardiomyozyten. Der Überstand wurde abpipettiert und gut durchmischt, um die Zellen anschließend anzufärben und in einer Neubauerkammer auszuzählen. Dafür wurden 80 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblaulösung gemischt, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können. Auf Fibronectin-beschichteten Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen wurden 2 ml M199 (Zusammensetzung siehe oben) vorgelegt und $0,8 \times 10^6$ Zellen je Vertiefung ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf Standardmedium (Serum- und Ara-C-frei) umgestellt. Anschließend wurden die Zellen nochmals 24 Stunden inkubiert.

3.1.2 Zellstimulation (Hypertrophie-Induktion und Proteasominhibition)

Materialien

Isoproterenol (10 mM in H ₂ O)	Sigma
Bortezomib (10 µM in H ₂ O)	Millenium
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO, in Dimethylsulfoxid)	Biomol

Durchführung

Nach der 24-stündigen Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen stimuliert. Dazu wurden die einzelnen Substanzen direkt in das Medium gegeben. Das synthetische β-adrenerge Isoproterenol (10 µM) diente der Hypertrophie-Induktion in den neonatalen Rattenkardiomyozyten. Zur Hemmung des Proteasoms wurden die reversiblen und selektiven Proteasominhibitoren Bortezomib (5 - 10 nM) und MG132 (50 nM) eingesetzt. Die Stimulierung der Zellen mit den genannten Substanzen erfolgte über 48 Stunden.

3.1.3 Messung der proteasomalen Aktivität mit Hilfe fluorogener Substrate

3.1.3.1 Zell-Lyse

Materialien

PBS (siehe 3.1.1)	
Trypsin-EDTA (in HBSS, ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Invitrogen
M199 Medium	
mit L-Glutamin und L-Aminosäuren	Invitrogen
Serum neugeborener Kälber (NBCS)	Invitrogen
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Falcon

Zentrifuge 5415R

Eppendorf

Durchführung

Nach 48-stündiger Stimulierung wurden die nRC zweimal mit 2 ml PBS pro Vertiefung gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale wurden sie für fünf bis sieben Minuten mit 300 µl Trypsin pro Vertiefung bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml M199 Medium mit 10 % NBCS abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und acht Minuten bei 900 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde in 300 µl PBS resuspendiert. 80 µl dieser Zellsuspension wurden für die Untersuchung der Zellviabilität (siehe 3.1.6) verwendet. Aus den restlichen 220 µl wurden die Proteine und damit auch die Proteasomen extrahiert. Dazu wurden die nRC einer schonenden Zell-Lyse unter hypoosmolaren Bedingungen unterzogen. Die Zellsuspension wurde mit 70 µl *Aqua bidest.* versetzt und in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren, um anschließend bei Raumtemperatur wieder aufzutauen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Bei einer anschließenden Zentrifugation (20 min, 3.500 U/min, 4 °C) trennten sich die löslichen Proteine von den übrigen Zellbestandteilen ab. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung in ein Eppendorfgefäß überführt und konnte bei -70 °C gelagert werden.

3.1.3.2 Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchinonsäure (BCA) - Assay

Materialien

Pierce BCA Protein Assay Kit:

BCA Protein Assay Reagenz A

BCA Protein Assay Reagenz B

Albumin Standard

(BSA – bovine serum albumin, fraction V)

Pierce

Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, durchsichtig

Greiner Bio-One

ELISA-Reader Anthos HT III

anthos labtec instruments

WinRead V.2.3

anthos labtec instruments

Durchführung

Für die Messung der Proteasomaktivität muss eine definierte Menge Protein in der zu untersuchenden Probe enthalten sein. Deshalb erfolgte zuerst eine Bestimmung der Proteinmenge. Das Messprinzip beruht auf einer Reduktion von zweiwertigem Kupfer (= Reagenz B) zu einwertigem Kupfer durch das nachzuweisende Protein. Das einwertige Kupfer bildet mit Bicinchinonsäure (BCA = Reagenz A) einen Farbkomplex. Die Absorption des Komplexes wird gemessen. Dabei korreliert die Farbstoffintensität mit der Proteinkonzentration.

Zuerst wurden die Proteinproben mit *Aqua bidest.* in dem Verhältnis 1:10 verdünnt. Dann wurde das Reaktionsreagenz durch Mischung der Reagenzien A (BCA) und B (Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 angesetzt. Für die Standardreihe wurden in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen 10 µl Standard BSA-Lösung und 200 µl Reaktionsreagenz pipettiert. Ebenso wurden zu 10 µl Proteinsuspension 200 µl Reaktionsreagenz dazugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C. Die Bestimmung der Absorption erfolgte mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm. Zum Abschluss wurde mit der Software WinRead die Proteinkonzentration in µg/µl anhand der BSA-Standardkurve errechnet.

3.1.3.3 Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität

Materialien

fluorogenes Substrat

SLLVY-MCA (Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-Methylcoumarin)	Bachem
---	--------

Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, schwarz	Greiner Bio-One
--	-----------------

SpectraMax GeminiEM Microplate Reader	Molecular Devices
---------------------------------------	-------------------

3 x 26S-Inkubationspuffer:

450 mM Tris-HCl, pH 8,2	Roth
90 mM KCL	Roth
15 mM Mg-Acetat x 4 H ₂ O	Roth
15 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck

Messansatz:

60 µl 3 x 26S-Inkubationspuffer	Boehringer/Roche
23,3 µl <i>Aqua bidest.</i>	Calbiochem
0,22 µl Dithiothreitol (DTT) (0,5 M)	Sigma
6 µl Adenosintriphosphat (ATP) (100 mM)	Sigma
0,5 µl Phosphokreatin (1 M)	Sigma
0,2 µl Phosphokreatinkinase (1 U/µl)	Sigma
10 µl fluorogenes Substrat (2 mM)	

Durchführung

Für die Messung der proteasomalen Aktivität wurden fluorogene Substrate verwendet. Der Peptidrest des verwendeten fluorogenen Substrates SLLVY-MCA wird spezifisch von der

Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms abgebaut. Die Fluoreszenz des entstehenden freien MCA (Methylcoumarin) ist mit einem Spektrofluorometer messbar und proportional zu der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms.

Die vorherige Bestimmung der Proteinkonzentration ermöglichte die Entnahme von 10 µg Protein zur Messung der Proteasomaktivität. Diese Proteinmenge wurde bei 4 °C mit *Aqua bidest.* auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und in eine schwarze Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert (Dreifachwerte). Unter kühlen, lichtgeschützten Bedingungen wurden 100 µl des frisch angesetzten Messansatzes hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte abgedeckt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

3.1.4 Morphometrie

Materialien

PBS (Zusammensetzung siehe 3.1.1)

Paraformaldehyd (PFA, 4 % in PBS) Sigma

Permeabilitätspuffer:

1 % t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton) Sigma

50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Sigma

150 mM NaCl Sigma

pH 7,4 (HCl)

fetales Kälberserum (FCS, 1 % in PBS) Invitrogen

Phalloidin, FITC konjugiert (1 µg/µl in Methanol) Sigma

Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100 Zeiss

Kamera MC-3254 Sony

Morphometrie-Software Scion Image Beta 4.0.1, © 2000,
basierend auf NIH Image von Wayne Rasband Scion Corporation

Durchführung

Für die Durchführung einer computergestützten Morphometrie mussten die Zellen zuerst mit Phalloidin-FITC gefärbt werden. Phalloidin ist ein Toxin, das aus dem Pilz *Amanita phalloides* isoliert wird und an F-Aktin der Muskelzellen bindet. FITC ist ein fluoreszierender Farbstoff (Exzitation bei 495 nm, Emission bei 513 nm), der an das Phalloidin gebunden ist.

Nach 48-stündiger Stimulierung der Zellen wurden die nRC zweimal mit 2 ml PBS pro Vertiefung gewaschen. Es schloss sich eine Fixierung mit 1 ml Paraformaldehyd pro Vertiefung für 20 Minuten, bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken an. Nach zwei Waschschrritten mit PBS wurden die nRC für zehn Minuten mit 1 ml Permeabilitäts-puffer pro Vertiefung behandelt. Auch dies erfolgte bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken. Durch den Puffer wurden die Zellen permeabilisiert, so dass der Farbstoff in die Zellen eindringen konnte. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 1%igem FCS (fetales Kälberserum) blockiert. Das FCS wurde abgesaugt und die Zellen wurden eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank mit 400 µl Phalloidinlösung pro Vertiefung (1:200 in PBS verdünnt) inkubiert. Während dessen waren die Zellkulturplatten in Aluminiumfolie eingewickelt, um ein Ausbleichen des FITC-Farbstoffes zu verhindern. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Für die Ermittlung der Zellgröße bzw. -fläche wurde die nRC mit einer an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Kamera fotografiert. Dabei wurden bei zehnfacher Vergrößerung mindestens zehn Sichtfelder pro Behandlung zufällig ausgewählt. Die morphometrische Auswertung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Scion Image. Diese Software berechnet umschlossene Flächen, die in einem bestimmten, von dem Benutzer ausgewählten Farbbereich liegen. In diesem Fall die grün gefärbten nRC vor schwarzem Hintergrund. Dabei werden nur Flächen berücksichtigt, die eine gewisse Mindestgröße aufwiesen, damit Zelldebris ausgeschlossen werden konnte. Die berechneten Zellflächen aller Sichtfelder einer Behandlung wurden gemittelt. Die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

3.1.5 Relative mRNA-Expressionen von kardialen Hypertrophie-Markergenen (ANP und α -MHC)

Für die Quantifizierung der Expression eines Gens wird mRNA verwendet, die zunächst isoliert und dann durch das Enzym Reverse Transkriptase vollständig in cDNA umgeschrieben wird (Reverse Transkription). Die cDNA dient anschließend als Ausgangsprodukt der quantitativen Real-Time-PCR. Dabei werden die nachzuweisenden Gene gleichzeitig amplifiziert und quantifiziert.

3.1.5.1 RNA-Isolation

Materialien

TRIZOL [®]	Invitrogen
Chloroform	Baker
Iso-Propanol	Baker
70%iger Ethanol	Baker
RNase freies Wasser	Invitrogen

Zellschaber	Greiner Bio-One
PCR-Röhrchen	Applied Biosystems
Vortex-Schüttler Vortex-Genie 2	VWR
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Spektrophotometer DU® 640	Beckman

Durchführung

Nach 48-stündiger Stimulierung der Zellen wurden diese zweimal mit 2 ml PBS pro Vertiefung gewaschen. Anschließend wurden 750 µl TRIZOL[®] in jede Vertiefung pipettiert, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein neues steriles Eppendorfgefäß überführt. Es erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 30 °C. Mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers wurden die Zellen vollständig aufgelöst, im Anschluss mit 150 µl Chloroform versetzt und gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die mRNA durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 U/min von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Die in der oberen Phase befindliche mRNA wurde vorsichtig abpipettiert und zu ihrer Fällung mit 375 µl Iso-Propanol versetzt. Nach einer Durchmischung mit dem Vortex-Schüttler wurde die Probe 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 U/min befand sich die mRNA im gelartigem Pellet. Im Anschluss erfolgte ein zweimaliges Waschen der mRNA mit je einem Milliliter 70%igem Alkohol und anschließender Zentrifugation (5 min, 14.000 U/min, 4 °C). Zum Abschluss wurde die mRNA in 50 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und konnte entweder weiter verarbeitet oder bei -70 °C aufbewahrt werden.

Für die Quantifizierung der mRNA wurde die optische Dichte der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrophotometer bestimmt. Dazu wurden 4 µl der mRNA-haltigen Suspension in 96 µl sterilem Wasser aufgenommen und in eine Glasküvette überführt. Eine Küvette mit *Aqua dest.* diente als Referenzwert. Zur Reinheitsprüfung erfolgte die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient der beiden optischen Dichten (260 nm/280 nm) erlaubt eine Aussage über eine eventuelle Kontamination der Probe (Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen).

3.1.5.2 cDNA-Synthese

Materialien

DNase (2 U/ μ l)	Ambion
Hexamer-Primer (0,5 μ g/ μ l)	TIB MOLBIOL
M-MLV RT-Puffer (5 x) (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase-Puffer)	Invitrogen
DTT (Dithiothreitol) (100mM)	Invitrogen
M-MLV RT (200 U/ μ l) (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase)	Invitrogen
dNTP's (Desoxynukleotid Triphosphate) (10 mM)	Roche
Protector RNase Inhibitor (40 U/l)	Roche
ThermoCycler UNO II	Biometra

Durchführung

mRNA kann mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, Hexamer-Primern und Nukleotiden in cDNA umgeschrieben werden.

Für die cDNA-Synthese dienten 500 ng mRNA als Ausgangsmenge. Diese wurde mit sterilem Wasser auf ein Endvolumen von 9 μ l aufgefüllt. Eventuell noch vorhandene DNA wurde im ThermoCycler bei 37 °C durch den Zusatz von 0,5 μ l DNase abgebaut (Dauer: 15 Minuten). Das Enzym wurde anschließend bei 75 °C (fünf Minuten) deaktiviert. Bei 4 °C wurden zu den Proben 2 μ l Hexamer-Primer pipettiert. Die Erhöhung der Temperatur auf 70 °C über 10 Minuten führte zu einem Aufbrechen der Sekundärstrukturen der mRNA. Während der anschließenden Abkühlung bei Raumtemperatur kam es zu einer Anlagerung der Primer (Annealing). Bei 4 °C wurden 4 μ l M-MLV RT-Puffer, 2 μ l DTT, 1 μ l M-MLV RT, 1 μ l dNTP's und 0,5 μ l Protector RNase Inhibitor dazu pipettiert. Die Reverse Transkription erfolgte eine Stunde lang bei 37 °C im ThermoCycler. Die so erhaltene cDNA diente als Matrize für die Real-Time-PCR.

3.1.5.3 Quantitative Real-Time-PCR

Materialien

SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Sequence Detection System 5700	Applied Biosystems
Software GeneAmp 5700 SDS 1.3	Applied Biosystems
Zentrifuge 5415R	Eppendorf

Tabelle 1: verwendete Primer für die quantitative Real-Time-PCR (Fa. TIB MOLBIOL)

Primer		5'  3'	Temperatur	Konzentration
ANP	vorwärts	AgT ggC AAT gCg ACC AAg CTg T	65 °C	900 nM
ANP	rückwärts	TCg CAA AAg ATC CCA AgC CCT T	65 °C	900 nM
α-MHC	vorwärts	AAC gCC CAA gCC CAC TTg AA	65 °C	900 nM
α-MHC	rückwärts	CAT Tgg CAC ggA CTg CgT CA	65 °C	900 nM
RPS11	vorwärts	ggA TCC TgT CTg gTg TTg TgA CgA A	65 °C	300 nM
RPS11	rückwärts	TCC Cgg Cgg ATg ACA ATg g	65 °C	100 nM

Durchführung

Die Amplifizierung der gewünschten Abschnitte der cDNA erfolgt mittels quantitativer PCR. Durch Verwendung spezifischer Primerpaare werden DNA-Duplikate der gewünschten Sequenz synthetisiert. Die Emittierung einer Fluoreszenz bei Interkalierung des Farbstoffes SYBR[®] Green ermöglicht einen Rückschluss auf die Menge der synthetisierten Sequenzen, da die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt.

Zuerst wurde die cDNA im Verhältnis 1:2,5 mit *Aqua bidest.* verdünnt. Zu einem Mikroliter der cDNA-Verdünnung wurden die entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Konzentration siehe Tabelle 1) pipettiert. Mit *Aqua bidest.* wurde das Volumen auf 12,5 µl aufgefüllt und anschließend wurden 12,5 µl des SYBR[®] Green PCR Master Mix dazugegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1.000 U/min wurde der PCR-Ansatz bei einer für den Primer spezifischen Temperatur (siehe Tabelle 1) in dem Sequence Detection System erhitzt. Eine Temperatur von 50 °C für zwei Minuten aktivierte zuerst die im Master Mix enthaltene AmpErase UNG die verhindert, dass die Amplifizierung von Kontaminationen aus vorangegangenen PCR erfolgt. Anschließend wurde die Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 95 °C (zehn Minuten) aktiviert. Während der anschließenden 40 Zyklen liefen abwechselnd folgende Schritte ab:

Schritt 1: Denaturierung bei 95 °C, 15 Sekunden

Schritt 2: Primer spezifisches Annealing und Amplifikation bei 65 °C, 60 Sekunden

Mit Hilfe des Softwareprogramms GeneAmp 5700 SDS 1.3 wurden die Daten analysiert. Für die Quantifizierung berechnet die Software eine Fluoreszenzkurve bei der die Stärke des Fluoreszenzsignals gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird. Ab dem so genannten Schwellenwert-Zyklus (C_T) übersteigt die gemessene Fluoreszenz signifikant die Basisfluoreszenz und steigt exponentiell. Ein Vergleich zweier Proben zu diesem Zeitpunkt erlaubt eine semiquantitative Aussage über die Menge der Ausgangs-cDNA. Je weniger Zyklen benötigt werden, um den Schwellenwert C_T zu erreichen, umso mehr Ausgangskopien sind in der Probe enthalten. Für diese relative Quantifizierung wird jedoch eine interne Kontrolle benötigt. Dazu wird mit jeder Probe auch eine PCR für ein so genanntes House-Keeping-Gen (RPS11, Annealingtemperatur 65 °C) durchgeführt. Dieses individuell ausgewählte Gen ist für die Zelle essentiell und wird durch eine Behandlung (z. B.

Bortezomib) in seiner Expression nicht verändert. Die C_T -Werte des House-Keeping-Gens in den einzelnen Proben sollten nicht signifikant differieren. Die Normierung auf das House-Keeping-Gen erfolgte, indem der C_T -Wert des House-Keeping-Gens vom C_T -Wert des zu untersuchenden Genes subtrahiert wurde ($= \Delta C_T$). Vom ΔC_T -Wert der behandelten Probe wurde der ΔC_T -Wert der unbehandelten Kontrolle abgezogen ($=\Delta\Delta C_T$). Der relative Expressionsunterschied zwischen Behandlung und Kontrolle, normiert auf das House-Keeping-Gen, ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Dieses Verfahren wird als vergleichende Schwellenwert-Methode bezeichnet.

Alle Optimierungsschritte (u.a. Gelelektrophorese, Primer-Optimierung, Schmelzkurvenanalyse) wurden standardmäßig durchgeführt.

3.1.6 Zellviabilität

Materialien

Trypanblau (0,4 % in PBS)	ICN Biomedicals
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Falcon
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer)	Poly Optik

Durchführung

Für die Erfassung der lebenden und toten Zellen wurden die nRC in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Nach Trypsinierung der Zellen (siehe 3.1.3.1) wurden 80 μ l Zellsuspension mit 20 μ l Trypanblaulösung gemischt. Weil nur tote Zellen den Farbstoff inkorporieren, ist eine Unterscheidung von den lebenden Zellen möglich. Es erfolgte eine Auszählung der lebenden und toten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer und die Berechnung des Anteils der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl. Die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

3.2 *In-vivo*-Untersuchungen

3.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten insgesamt 66 männliche Dahl Salz-sensitive Ratten. Die Tiere stammten aus der Zucht der Arbeitsgruppe Prof. Kreuz (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, CBF, Charité - Universitätsmedizin Berlin). Bei Versuchsbeginn waren die Ratten ca. sechs Wochen alt und 200 - 230 g schwer. Alle Behandlungen und Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen

Tierschutzgesetzes durchgeführt. Es lag eine Tierversuchsgenehmigung des LAGeSo vor (Genehmigungsnummer: G 0207/03).

3.2.2 Tierhaltung

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) in Berlin-Steglitz. Jeweils zwei bis drei Ratten wurden in normierten Makrolonkäfigen vom Typ IV auf Standardeinstreu für Labortiere gehalten. Ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus wurde ebenso automatisch geregelt, wie eine konstante Temperatur von 22° C.

3.2.3 Tierfütterung

Futter und Wasser standen den Ratten *ad libitum* zur Verfügung und deren Aufnahme wurde regelmäßig kontrolliert. Je nach Zugehörigkeit zu den verschiedenen Versuchsgruppen erhielten die Tiere entweder standardisiertes Ratten- und Mäuse-Alleinfutter mit einem Kochsalzgehalt von 0,2 % oder eine Spezialdiät, die mit 4 % Natriumchlorid (NaCl) angereichert war (Fa. Ssniff®).

3.2.4 Bortezomib

Das für diese Untersuchungen verwendete Bortezomib wurde von der Fa. Millenium Pharmaceuticals (Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt und wird unter dem Namen *Velcade*® vertrieben.

Die in diesem Tierversuch verwendete Dosierung von 50 µg/kg KG (entspricht ~ 0,36 mg/m² Körperoberfläche) beruht auf den Ergebnissen laborinterner Vorversuche. Dabei wurden männlichen Wistar-Ratten einmalig und intraperitoneal unterschiedliche Dosierungen von Bortezomib verabreicht. Die dadurch verursachte Hemmung der Proteasomaktivität wurde 24 Stunden nach der Injektion in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gemessen. Die gesuchte Dosis sollte eine etwa 30%ige Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität verursachen.

Außerdem entschied man sich bewusst dafür eine Dosierung zu verwenden, die laut Literaturangaben keine unerwünschten Nebenwirkungen erwarten ließ (siehe 2.4.3).

Velcade® ist als gefriergetrocknetes Pulver mit 3,5 mg Bortezomib in Einzel-Dosen-Ampullen erhältlich. Nach Lösung des Pulvers in 3,5 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung liegt eine Bortezomib-Konzentration von 1 µg/µl vor. Die fertig zubereitete Injektionslösung wurde in einzelnen Aliquots bei -80 °C gelagert, jeweils kurz vor der Injektion entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die dem Körpergewicht der Ratte entsprechende Dosis (50 µg/kg KG) wurde zur besseren Applizierbarkeit in 0,2 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung verdünnt und den Tieren intraperitoneal appliziert. Die Applikation von Bortezomib erfolgte in diesem Tierversuch zweimal wöchentlich.

3.2.5 Versuchsaufbau

Nacheinander wurden zwei grundsätzlich ähnlich aufgebaute Versuche durchgeführt. Der erste Versuch diente der Charakterisierung und Etablierung des Tiermodells der Dahl Salz-sensitiven Ratte. Schwerpunktmäßig sollten die kardialen Veränderungen infolge der Fütterung einer Salzdiät und der gleichzeitigen Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib untersucht werden. In dem zweiten Versuch sollte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nachgewiesen werden. Außerdem erfolgte die weitergehende Analyse der in dem ersten Versuch festgestellten Blutdruckveränderungen, indem zusätzlich am Versuchsende die Vasoreaktivität der isolierten *Aorta descendens* untersucht wurde.

Alle Ratten erhielten bis zur sechsten Lebenswoche ein standardisiertes Ratten- und Mäuse-Alleinfutter mit 0,2 % Natriumchlorid. Danach erfolgte in beiden Versuchen die randomisierte Einteilung in drei verschiedene Versuchsgruppen, die aus jeweils 11 Tieren bestanden:

- Kontroll-Gruppe: Die Ratten in dieser Gruppe erhielten ein standardisiertes Mäuse- und Ratten-Alleinfutter und wurden nicht behandelt. Sie dienten als Kontrolle für die Hypertonie-induzierten Veränderungen in den beiden anderen Gruppen.
- Placebo-Gruppe: In dieser Versuchsgruppe erfolgte die Fütterung einer Diät mit 4 % Natriumchlorid. Des Weiteren wurde diesen Tieren zweimal wöchentlich 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung intraperitoneal injiziert (Volumen: 0,2 ml).
- Bortezomib-Gruppe: Auch diese Tiere erhielten das mit 4 % NaCl angereicherte Futter. Außerdem wurde den Tieren dieser Gruppe zweimal wöchentlich der Proteasominhibitor Bortezomib (*Velcade*[®]) intraperitoneal injiziert. Die Dosis von 50 µg Bortezomib/kg Körpergewicht wurde in 0,2 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung verdünnt.

Das Allgemeinbefinden aller Tiere wurde regelmäßig untersucht. Wöchentlich wurden die Ratten gewogen und die Gewichtsentwicklung kontrolliert. Eine Blutdruckmessung erfolgte in dem ersten Versuch in der ersten, fünften und siebten Versuchswoche und in dem zweiten Versuch zusätzlich in der dritten Versuchswoche. Die Tiere in dem ersten Versuch wurden nach acht Wochen euthanasiert und deren Organe sowie Blut entnommen. Aufgrund der in dem ersten Versuch festgestellten erhöhten Morbidität und Mortalität der Placebo-behandelten Tiere in der letzten Versuchswoche (siehe 4.2.1) wurde der zweite Versuch nach siebeneinhalb Wochen beendet. Den Tieren der Placebo- und Bortezomib-Gruppe wurde die letzte Injektion 24 Stunden vor der Euthanasie verabreicht.

3.2.6 Blutdruckmessung

Materialien

Broome Style Restrainer	indulab ag
Process control	TSE
Blood pressure 20900	TSE
Temperature control 22303	TSE

Durchführung

Der systolische arterielle Blutdruck wurde bei den Ratten in dem ersten Versuch in der ersten, fünften und siebten Versuchswoche bestimmt und bei den Tieren des zweiten Versuchs zusätzlich in der dritten Woche. Die Messung erfolgte am wachen Tier mit Hilfe der nicht-invasiven Schwanzmanschetten-Methode. Hierfür wurden die Ratten in einem Restrainer, einer durchsichtigen Plastikröhre fixiert, sodass nur noch der Schwanz herausragte. Die so fixierten Ratten wurden in eine auf 38 °C temperierte Wärmebox verbracht, in der sie sich innerhalb von 15 bis 20 Minuten an die Temperatur und ungewohnte Fixierung gewöhnten. Dann erfolgte die Blutdruckmessung unter Einsatz einer automatisierten computergestützten oszillatorischen Technik. Dazu wurden direkt hinter der Schwanzwurzel eine Druckmanschette und distal davon ein ringförmiger Pulsaufnehmer platziert. In diesem befand sich ein hochempfindlicher piezoelektrischer Kristall, der die Schwankungen des Blutdrucks in der Arterie in ein elektrisches Signal umwandelte. Die temperaturinduzierte Dilatation der Schwanzarterie führte zu einer messbaren Pulswelle, die auf dem Oszillografen dargestellt wurde. Dann wurde die Druckmanschette schrittweise bis zu dem Verschluss der Schwanzarterie aufgepumpt, sodass der Pulsaufnehmer keine Pulsation mehr erkennen konnte. Dieser Druck wurde als SAB 1 (systolischer arterieller Blutdruck) registriert. Anschließend folgte eine schrittweise Druckabsenkung in der Manschette bis zu dem Wiedereinsetzen des Pulssignals. Der jetzt erreichte Druck wurde als SAB 2 verzeichnet. Der mittlere systolische Blutdruck ergab sich aus den Mittelwerten von SAB 1 und SAB 2. Es erfolgten für jedes Tier drei Messungen, deren Ergebnisse gemittelt wurden.

3.2.7 Euthanasie der Versuchstiere und Blutentnahme

Materialien

Trapanal [®] 0,5 g	Altana
EDTA	Merck

Durchführung

Vor der Blut- und Organentnahme wurden die Ratten gewogen und mit 50 mg/kg Körpergewicht Thiopental (Trapanal[®]) intraperitoneal narkotisiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Tiere in Rückenlage. Durch eine Medianlaparotomie wurde die Bauchhöhle eröffnet. Kaudal der letzten Rippe wurden Entlastungsschnitte gesetzt. Nach der Verlagerung

des Darmkonvolutes aus der Bauchhöhle heraus, lag die *V. cava caudalis* frei und konnte punktiert werden. Dies erfolgte mittels einer 10 ml Spritze mit vorgelegtem EDTA (400µl 0,5 M EDTA für 8 ml Vollblut) und aufgesetzter Kanüle (G20). Nach Punktion der Vene und unter vorsichtiger Aspiration wurde dem Tier das gesamte zirkulierende Blut entnommen und auf diese Weise euthanasiert.

Von dem entnommenen EDTA-Blut wurde in dem ersten Versuch nach Abschluss der Sektion ein Ausstrich auf einem Objektträger angefertigt und zusammen mit einem Teil des Blutes in ein kommerzielles Labor (VetMedLab, Ludwigsburg) eingeschickt. Hier wurde von jedem Tier ein großes Blutbild erstellt. Für die Bestimmung der proteasomalen Aktivität in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden 0,4 ml EDTA-Blut benötigt.

3.2.8 Entnahme von Herz und Aorta

Materialien

PBS

Invitrogen

Histofix

Roth

Durchführung

Für die Entnahme von Herz und thorakaler Aorta wurden das Diaphragma, die Rippen und das Sternum durchtrennt und damit die Brusthöhle eröffnet. Der Herzbeutel wurde eröffnet, das Herz durch einen Scherenschlag direkt über der Herzbasis abgesetzt und anschließend entnommen. Danach wurde es zügig in eiskalten PBS-Puffer verbracht und darin vorsichtig von letzten Blutresten befreit. Eventuell verbliebene Gefäßstümpfe wurden komplett entfernt. Vor dem Wiegen des Herzens wurde dieses vorsichtig trocken getupft und ausgedrückt, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen und nur das reine Herzgewicht zu bestimmen. Anschließend wurde das Herz durch einen Schnitt in seiner Längsachse so halbiert, dass jede Hälfte Anteile der linken und rechten Kammer enthielt. Eine Hälfte wurde in 4%iger phosphatgepufferter Formaldehydlösung (Histofix, Fa. Roth) fixiert, die andere in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu der weiteren Untersuchung bei -80 °C aufbewahrt.

Lunge und Oesophagus wurden entfernt, um den Zugang zur Aorta zu erleichtern. In dem ersten Versuch wurde der Aortenbogen entnommen, vorsichtig von dem umliegenden Gewebe befreit und mit eiskalter Krebs-Henseleit-Lösung (Zusammensetzung siehe 3.2.16) vorsichtig freigespült. Anschließend wurde er in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu der weiteren Untersuchung bei -80 °C aufbewahrt. In dem zweiten Versuch wurde die *Aorta descendens* zügig, aber dennoch unter äußerster Schonung und ohne Zug auszuüben entfernt und ebenfalls in eiskalte Krebs-Henseleit-Lösung verbracht. Auch sie wurde freigespült, dann in *University of Wisconsin*-Lösung (siehe 3.2.16), einer Konservierungslösung aus der Transplantationsmedizin verbracht und bis zum nächsten Tag bei 4 °C aufbewahrt. Dann erfolgte die funktionelle Untersuchung des Endothels (siehe 3.2.16).

3.2.9 Entnahme weiterer Organe und Gewebe

Nach der Entnahme und Aufbereitung von Herz und Aorta wurden Leber, Milz, Nieren, Tibia und Knochenmark entnommen. Bei den genannten Organen wurde das Gewicht bestimmt. Gewebeprobe von Leber und Niere wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenso wie Aorta und Herz eingefroren.

Eine Tibia wurde entnommen, von dem umliegenden Gewebe frei präpariert und in 4%iger phosphatgepufferter Formaldehydlösung (Histofix, Fa. Roth) aufbewahrt. Später wurde die Länge der Tibia mit einer Schiebelehre ausgemessen.

In dem ersten Versuch wurde für die Entnahme des Knochenmarks der Oberschenkel freigelegt und mittig gebrochen. Mit einer Kanüle wurde das Knochenmark vorsichtig herausgekratzt, auf einem entfetteten Objektträger ausgestrichen und an der Luft getrocknet. Die histopathologische Untersuchung der Knochenmarkbiopsie erfolgte in einem kommerziellen Labor (VetMedLab, Ludwigsburg).

3.2.10 Messung der proteasomalen Aktivität in PBMC, Leber, Niere und Herz mit Hilfe fluorogener Substrate

3.2.10.1 Lymphozytenisolierung

Materialien

Lympholyte [®] -Rat	BIOZOL Diagnostica
PBS	Invitrogen
Zentrifuge 5415C	Eppendorf

Durchführung

Für die Messung der proteasomalen Aktivität in den PBMC mussten diese erst aus dem Vollblut isoliert werden. Dies erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurden 400 µl EDTA-Blut mit 400 µl PBS vermischt und vorsichtig auf 1.400 µl Lympholyte[®]-Rat pipettiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (30 min, bei 1.000 U/min, Raumtemperatur) befanden sich die PBMC in einer ringförmigen Schicht zwischen der oberflächlichen PBS-Schicht und dem darunter liegenden Lympholyte[®]. Die PBMC wurden vorsichtig abpipettiert und in 200 µl PBS resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1.000 U/min und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Pellet abermals in 200 µl PBS resuspendiert und gleichermaßen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand wieder verworfen, das aus PBMC bestehende Pellet bei -80 °C eingefroren und für die spätere Bearbeitung aufbewahrt.

3.2.10.2 Zell-Lyse

Materialien

Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Mikropistill	Eppendorf

Durchführung

Für die Extraktion der Proteine und damit auch der Proteasomen wurden die PBMC einer schonenden Zell-Lyse unter hypoosmolaren Bedingungen unterzogen. Dazu wurden die eingefrorenen PBMC mit 20 µl *Aqua bidest.* versetzt und aufgetaut, um anschließend wieder in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren zu werden. Bei Raumtemperatur wurde die Suspension wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Bei einer anschließenden Zentrifugation (20 min, 3.500 U/min, 4 °C) trennten sich die löslichen Proteine von den übrigen Zellbestandteilen ab. Der Überstand wurde für die folgende Proteinbestimmung in ein Eppendorfgefäß überführt.

Mit den Gewebeproben von Leber, Niere und Herz wurde ähnlich verfahren. Diese wurden jedoch zusätzlich nach der Zugabe von *Aqua bidest.* mit einem Mikropistill homogenisiert.

3.2.10.3 Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchinonsäure (BCA) - Assay

Die Proteinmessung in den PBMC- und Gewebeproben erfolgte entsprechend den Angaben unter Punkt 3.1.3.2. Die Gewebeproben wurden jedoch im Verhältnis 1:50 verdünnt.

3.2.10.4 Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität

Die Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität erfolgte entsprechend den Angaben unter Punkt 3.1.3.3.

3.2.11 Bestimmung des relativen Herzgewichts

Für die Quantifizierung der kardialen Hypertrophie von DSSR unter Salzdiät wurde das absolute Herzgewicht auf das Körpergewicht relativiert (=HG/KG). Um den variablen Faktor des Körpergewichtes außer Acht lassen zu können, wurde das Herzgewicht zusätzlich zu der Tibialänge in Relation gebracht (=HG/TL).

3.2.12 Histopathologische Untersuchung des Herzens

Die geblindete histopathologische Untersuchung der Rattenherzen des ersten Versuchs erfolgte durch Fr. Dr. med. vet. G. Wibbelt (Institut für Zoo- und Wildtierkunde, Berlin).

Die in Formalin fixierten und längs halbierten Rattenherzen wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und einer Azan- bzw. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) unterzogen. Die Auswertung erfolgte rein deskriptiv, insbesondere in Hinblick auf mögliche Fibrosen, Nekrosen, Infarkte und Zellinfiltrationen.

3.2.13 Morphometrische Untersuchung der Kardiomyozyten

Material

Mikroskop Leitz DM RBE	Leica
Kamera AxioCam MRc	Zeiss
Software Axiovision Rel 4.6	Zeiss

Durchführung

Im Anschluss an die histopathologische Untersuchung der Rattenherzen des ersten Versuchs erfolgte außerdem die morphometrische Untersuchung der Kardiomyozyten des linken Ventrikels. Die HE-gefärbten Herzschnitte wurden mit 40-facher Vergrößerung betrachtet. Alle Sichtfelder der freien Wand des linken Ventrikels wurden fotografiert. Die anschließende Auswertung erfolgte geblindet. Quergeschnittene Myozyten mit angeschnittenem sichtbarem Kern und intakter Zellmembran wurden mit Hilfe einer Software manuell umfahren und deren Fläche in μm^2 berechnet. Mindestens zehn Myozyten wurden morphometrisch vermessen. Die Flächen aller Myozyten eines Tieres wurden gemittelt.

3.2.14 Quantitative Analyse der kardialen Fibrose

Material

Mikroskop Leitz DM RBE	Leica
Kamera AxioCam MRc	Zeiss
Software Axiovision Rel 4.6	Zeiss

Durchführung

Der quantitative Nachweis einer kardialen Fibrose erfolgte in der freien Wand des linken Ventrikels von DSSR des ersten Versuchs unter Salzdiät. Die mit Azan gefärbten Herzschnitte wurden mit zehnfacher Vergrößerung betrachtet. Alle Sichtfelder der freien Wand des linken Ventrikels wurden fotografiert. Die anschließende Auswertung erfolgte geblindet. Mit Hilfe einer Software wurde der prozentuale Anteil der blau gefärbten Kollagenanteile in dem Verhältnis zu der Gesamtfläche des Ventrikels ermittelt. Die Ergebnisse aller Sichtfelder des linken Ventrikels wurden gemittelt.

3.2.15 Relative mRNA-Expression von kardialen Hypertrophie- und Fibrose-Markergenen (β -MHC und Col IIIa1)

Material und Durchführung dieser Untersuchungen entsprechen weitestgehend den Ausführungen unter 3.1.5. An dieser Stelle sind nur Abweichungen davon aufgeführt.

Untersucht wurden die Tiere des ersten Versuches.

3.2.15.1 RNA-Isolation

Material

Mikropistill	Eppendorf
Schwingmühle MM 300	Retsch
Stahlkugel, Durchmesser 4 mm	Retsch
Vortex-Schüttler Vortex-Genie II	VWR
Zentrifuge 5415R	Eppendorf

Durchführung

Für die Isolierung der mRNA aus den Herzen wurden diese zuerst mit einem Mikropistill homogenisiert. Dann wurden rund 80 mg Gewebe in 1,7 ml TRIZOL[®] aufgenommen. In der Schwingmühle erfolgte mit Hilfe einer Stahlkugel eine feinere Homogenisierung des Gewebes (30 Schwingungen/Sekunde; 2 - 3 Minuten lang). Anschließend erfolgte eine Inkubation für zehn Minuten bei 30 °C. Mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers wurden die Zellen vollständig aufgelöst und im Anschluss mit 340 μ l Chloroform versetzt und gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die mRNA durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 U/min von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Die in der oberen Phase befindliche mRNA wurde vorsichtig abpipettiert und zu ihrer Fällung mit 850 μ l 2-Propanol versetzt. Nach einer Durchmischung mit dem Vortex-Schüttler wurde die Probe 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 U/min befand sich die mRNA in dem Pellet. Im Anschluss erfolgte eine zweimalige Waschung der mRNA mit je einem Milliliter 70%igem Alkohol und folgender Zentrifugation (5 Minuten, 14.000 U/min, 4 °C). Zum Abschluss wurde die RNA in 50 μ l RNase freiem Wasser resuspendiert und konnte bei -70 °C aufbewahrt werden.

Die RNA-Quantifizierung erfolgte wie unter 3.1.5.1 aufgeführt.

3.2.15.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte analog zu den Angaben unter 3.1.5.2.

3.2.15.3 Quantitative Real-Time-PCR

Material

Tabelle 2: verwendete Primer für die quantitative Real-Time-PCR (Fa. TIB MOLBIOL)

Primer		5' 3'	Temperatur	Konzentration
β-MHC	vorwärts	AAC gCC CAA gCC CAC TTg AA	65 °C	900 nM
β-MHC	rückwärts	CAT Tgg CAC ggA CTg CgT CA	65 °C	900 nM
Col IIIa1	vorwärts	AAA CAC gCA Agg CCA TgA gAC	60 °C	300 nM
Col IIIa1	rückwärts	CCA CAC CAA ATT CTT gAT CAg gAC	60 °C	300 nM
RPL19	vorwärts	gAA gAA CAC CTT ggC CCg ACg	65 °C	300 nM
RPL19	rückwärts	TTg gCA gTA CCC TTC CTC TTC CCT	65 °C	900 nM
RPL19	vorwärts	TTg ACC gTC ATA TgT ATC ACA gCC	60 °C	300 nM
RPL19	rückwärts	TgT gCT CCA TgA gAA TCC gC	60 °C	50 nM

Durchführung

Die Durchführung entspricht den Angaben unter 3.1.5.3.

Der zweite Zyklusschritt (primer-spezifisches Annealing und Amplifikation) erfolgte jedoch bei 60 °C bzw. 65 °C. Die Normierung auf das House-Keeping-Gen RPL19 erfolgte, indem der C_T -Wert des House-Keeping-Genes vom C_T -Wert des zu untersuchenden Genes subtrahiert wurde ($=\Delta C_T$). Der relative Expressionsunterschied zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen, normiert auf das House-Keeping-Gen, ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta C_T}$.

3.2.16 Untersuchung der Vasoreaktivität der isolierten Aorta descendens

Material

University of Wisconsin solution (UW-Lösung):

1000 ml ViaSpan®	Dupont Pharma
16 mg Dexamethason	Merck
40 IE Insulin	Sanofi-aventis
200.000 IE Penicillin G	Grünenthal

modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung):

144 mM NaCl	Merck
25 mM NaHCO ₃	Merck
5,9 mM KCl	Merck
1,2 mM MgSO ₄	Merck
1,2 mM KH ₂ PO ₄	Merck
1,6 mM CaCl ₂	Merck
11,1 mM D-Glukose	Merck
1µM Diclofenac	Merck
KCl (3 M)	Merck
Phenylephrin (100 µM)	Sigma
Acetylcholin (0,01 – 10 µM)	Sigma
Endothelin-1 (0,001 – 0,1 µM)	Sigma
doppelwandige Glasbehälter (Organbad)	Medizinisch-Glastechnische Werkstätte P. Heinrich
Kontraktionsaufnehmer FMI TIM-1020	Föhr Medical Instruments GmbH
Feinpositionierungselement Vernier Control Typ 850 N	Hugo Sachs Elektronik
Lab View	National Instruments

Durchführung

In einer speziellen Versuchsanlage wurde die Relaxations- und Kontraktionsfähigkeit der Aorten des zweiten Versuchs untersucht. Währenddessen befanden sich die Aorten in modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung, die in ihrer Zusammensetzung *In-vivo*-Verhältnisse simulierte. In dieser Lösung konnten die Aorten mehrere Stunden untersucht werden, ohne eine Funktionsbeeinträchtigung aufzuweisen.

Nach ihrer Entnahme wurden die thorakalen Aorten in UW-Lösung aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die Präparation der Aorten in modifizierter eiskalter Krebs-Henseleit-Lösung. Dabei wurden sie unter dem Mikroskop vorsichtig von Fett und Bindegewebe befreit und mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung gespült. Anschließend wurden die Aorten in etwa 2 mm breite Ringe geschnitten (pro Ratte zwei Ringe).

Die verwendete Versuchsanlage bestand aus sechs doppelwandigen Organbädern durch die ständig 37 °C warmes Wasser geleitet wurde. Jedes Organbad enthielt 10 ml modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung und wurde mit Carbogen begast (95 % O₂, 5 % CO₂) um einen pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Mit Hilfe von Platinhaken wurden die Aortenringe in diesen

Bädern eingespannt. Die Haken waren mit einem Kraftaufnehmer verbunden, dessen elektrische Signale digitalisiert und mit einer entsprechenden Software (LabView) in Form von kontinuierlichen Kurven (Messung der Zugkraft in mg) aufgezeichnet und ausgewertet wurden. Über die an den Kraftaufnehmern befindlichen Regler konnte eine manuelle Einstellung der Spannung erfolgen.

Zunächst wurden die Ringe locker mit den Haken eingespannt und über die Regler der Kraftaufnehmer manuell auf eine Vorspannung von 2.000 mg eingestellt. Nach 15-minütiger Adaptation wurde in jedes Organbad KCl pipettiert (Endkonzentration KCl im Perfusat: 50 mM). Damit wurde die Kontraktionsfähigkeit der Aortenringe getestet. Ringe die nicht kontrahierten wurden ausgetauscht. Anschließend wurde die Krebs-Henseleit-Lösung in den Organbädern dreimal ausgetauscht, um das Kaliumchlorid zu eliminieren. Während einer einstündigen Behandlungspause konnten die Aortenringe wieder auf eine Ausgangsspannung von 2.000 mg zurückkehren. Wenn notwendig, wurde diese manuell nachjustiert. Die Zugabe des α_1 -Agonisten Phenylephrin (Endkonzentration im Perfusat: 0,05 μ M) bewirkte eine stetige Kontraktion der Aortenringe, die nach etwa 20 bis 30 Minuten ein Plateau erreichte. Anschließend wurde der Vasodilatator Acetylcholin kumulativ in Endkonzentrationen von 0,01 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M in das Organbad pipettiert. Nach dreimaligem Austauschen der modifizierten KH-Lösung innerhalb einer dreiviertel Stunde erreichten die Aortenringe wieder die Ausgangsspannung von 2.000 mg. Abschließend wurde die Kontraktionsfähigkeit der Aortenringe nach Applikation von Endothelin-1 untersucht. Dazu wurde ET-1 kumulativ in Endkonzentrationen von 0,001 μ M, 0,005 μ M, 0,01 μ M, 0,05 μ M und 0,1 μ M in das Organbad pipettiert.

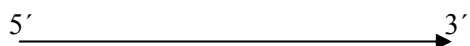
Die Auswertung der erhobenen Messwerte erfolgte mit dem Program LabView. Von jeder Ratte wurden zwei Aortenringe untersucht und deren Ergebnisse gemittelt. Dabei wurde die Vorspannung (2.000 mg) der Aortenringe von allen Werten subtrahiert, so dass nur die aktive Dilatation bzw. Kontraktion berücksichtigt wurde.

3.2.17 Relative mRNA-Expressionen von eNOS, ET-1 und VCAM-1 in der Aorta

Material und Durchführung dieser Untersuchungen entsprechen den Ausführungen unter 3.2.15. An dieser Stelle sind nur die verwendeten Primer aufgeführt.

Untersucht wurden die Tiere des ersten Versuchs.

Tabelle 3: verwendete Primer für die quantitative Real-Time-PCR (Fa. TIB MOLBIOL)

Primer		5'  3'	Temperatur	Konzentration
eNOS	vorwärts	ggA TCC Tgg CAg CCC TAA gA	60°C	900 nM
eNOS	rückwärts	CAC AAC ACg Cgg TgA ACC T	60 °C	900 nM
ET-1	vorwärts	AgA AgT gTA TCT ATC AgC AgC Tgg Tg	60 °C	300 nM
ET-1	rückwärts	gTC TTg ATg CTg TTg CTg ATg g	60 °C	900 nM
VCAM-1	vorwärts	ggC TCg TAC ACC ATC CgC	60 °C	900 nM
VCAM-1	rückwärts	Cgg TTT TCg ATT CAC ACT CgT	60 °C	900 nM
RPS11	vorwärts	TgT Tgg AgA gTg CAg gCC TC	60 °C	300 nM
RPS11	rückwärts	TgC CAg CAg CCT Tgg Tg	60 °C	300 nM

3.3 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Material

SigmaStat3.0[®]

Systat Software GmbH

SigmaPlot[®]

Systat Software GmbH

Durchführung

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit dem Programm SigmaStat3.0[®]. Zuerst wurden die Werte innerhalb jeder Versuchsgruppe auf das Vorliegen einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) überprüft. Von normal verteilten Daten wurden die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet. Bei nicht normal verteilten Daten erfolgte die Berechnung von Median, 25 %-Quartil, 75 %-Quartil, Maximum und Minimum. Anschließend wurde eine Varianzanalyse (Levene Median Test) durchgeführt. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte bei dem Vorliegen einer Normalverteilung und gleicher Varianz mit dem ungepaarten t-Test. Nicht normal verteilte Daten oder ungleiche Varianz führten zu der Durchführung des Mann-Whitney Rank Sum Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Die *In-vitro*-Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit einmalig durchgeführt und konnten aufgrund dessen nicht statistisch ausgewertet werden. Sie wurden jedoch im Vorfeld mehrmals in unserem Labor durchgeführt und deren Ergebnisse waren in der vorliegenden Untersuchung reproduzierbar.

Für die graphische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot[®] verwendet. Balkendiagramme stellen die Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen und die Standardabweichungen dar.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf hypertrophierte neonatale Rattenkardiomyozyten

Der Einfluss der Proteasominhibitoren MG132 und MG262 auf hypertrophierte neonatale Rattenkardiomyozyten wurde bereits ausführlich untersucht (Dreger, 2003). In den hier durchgeführten *In-vitro*-Untersuchungen sollte der Nachweis potenzieller anti-hypertropher Effekte für den Proteasominhibitor Bortezomib erfolgen.

4.1.1 Bortezomib reduzierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in nRC

Der Proteasominhibitor Bortezomib hemmt die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms (ChTL) reversibel und mit hoher Spezifität. Dies kann mit Hilfe fluorogener Substrate nachgewiesen werden. Die Hemmung der proteasomalen Aktivität ist dabei proportional zu der gemessenen Fluoreszenz, die nach Abbau eines spezifischen Substrates durch das Proteasom messbar wird.

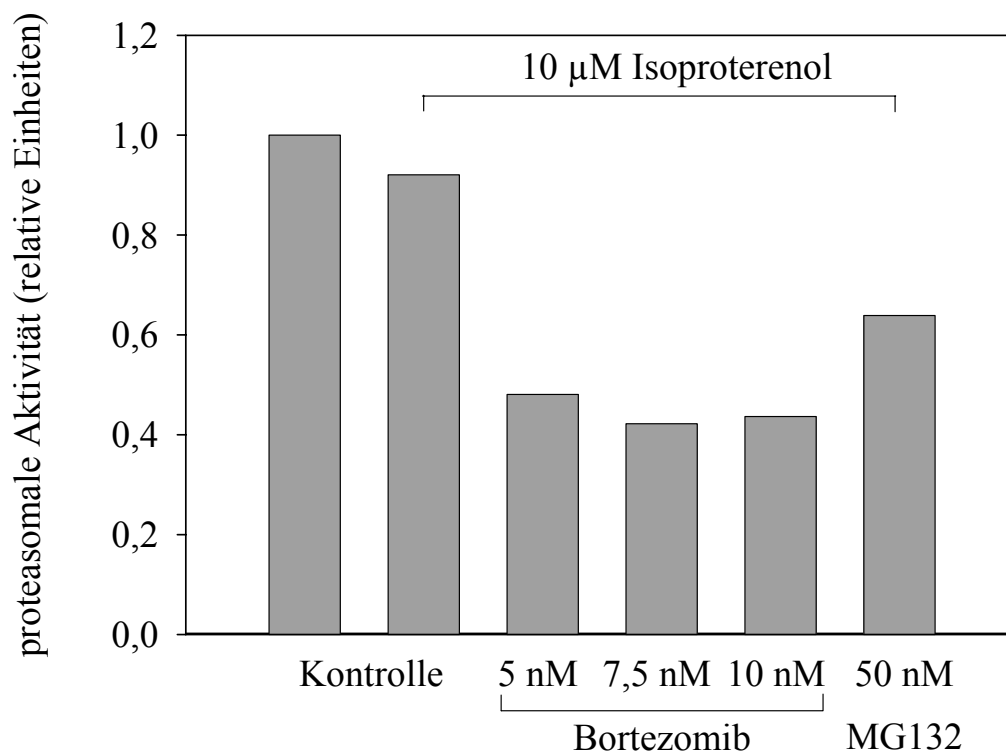


Abbildung 3: Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden über 48 Stunden mit Isoproterenol stimuliert. Die gleichzeitige Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib reduzierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms deutlich (die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert).

Nach einer 48-stündigen Behandlung mit Isoproterenol und dem Proteasominhibitor Bortezomib (5–10 nM) wurde die ChTL in nRC bestimmt. Dabei wird deutlich, dass die alleinige Behandlung mit 10 μ M Isoproterenol keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteasoms hatte (siehe Abbildung 3). Die zusätzliche Gabe von Bortezomib (5 – 10 nM) reduzierte die proteasomale Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen jedoch um etwa die Hälfte. Der Proteasominhibitor MG132 inhibierte das Proteasom weniger deutlich und reduzierte dessen Aktivität um etwa ein Drittel.

4.1.2 Der Proteasominhibitor reduzierte die Isoproterenol-induzierte Flächenzunahme von nRC

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden über 48 Stunden mit dem β -adrenergen Isoproterenol stimuliert und für den Nachweis einer anti-hypertrophen Wirkung gleichzeitig mit dem Proteasominhibitor Bortezomib behandelt. Nach Anfärbung der Zellen mit Phalloidin-FITC, das an F-Aktin von Muskelzellen bindet, erfolgte die computergestützte Berechnung der Zellflächen (siehe Abbildung 4). Eine gleichzeitig durchgeführte Zellzählung ließ keinen Einfluss der Hypertrophie-Induktion oder Proteasominhibition auf die Anzahl der Kardiomyozyten erkennen (Daten nicht gezeigt).

Die alleinige Behandlung mit Isoproterenol führte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu einer deutlichen Zunahme der Zellfläche (siehe Abbildung 5). Die Isoproterenol-induzierte Hypertrophie der neonatalen Kardiomyozyten ließ sich durch die gleichzeitige Behandlung mit Bortezomib dosisabhängig supprimieren. Der anti-hypertrophe Effekt ließ sich schon bei der geringsten Dosierung (5 nM) nachweisen und wurde mit den höheren Dosierungen noch deutlicher. Mit 10 nM Bortezomib behandelte Zellen wiesen die gleiche Zellfläche auf wie nRC, die nicht mit Isoproterenol stimuliert wurden. Diese Dosierung induzierte damit eine ähnliche Verringerung der Zellfläche, wie sie auch mit dem Proteasominhibitor MG132 (50 nM) erreicht wurde.

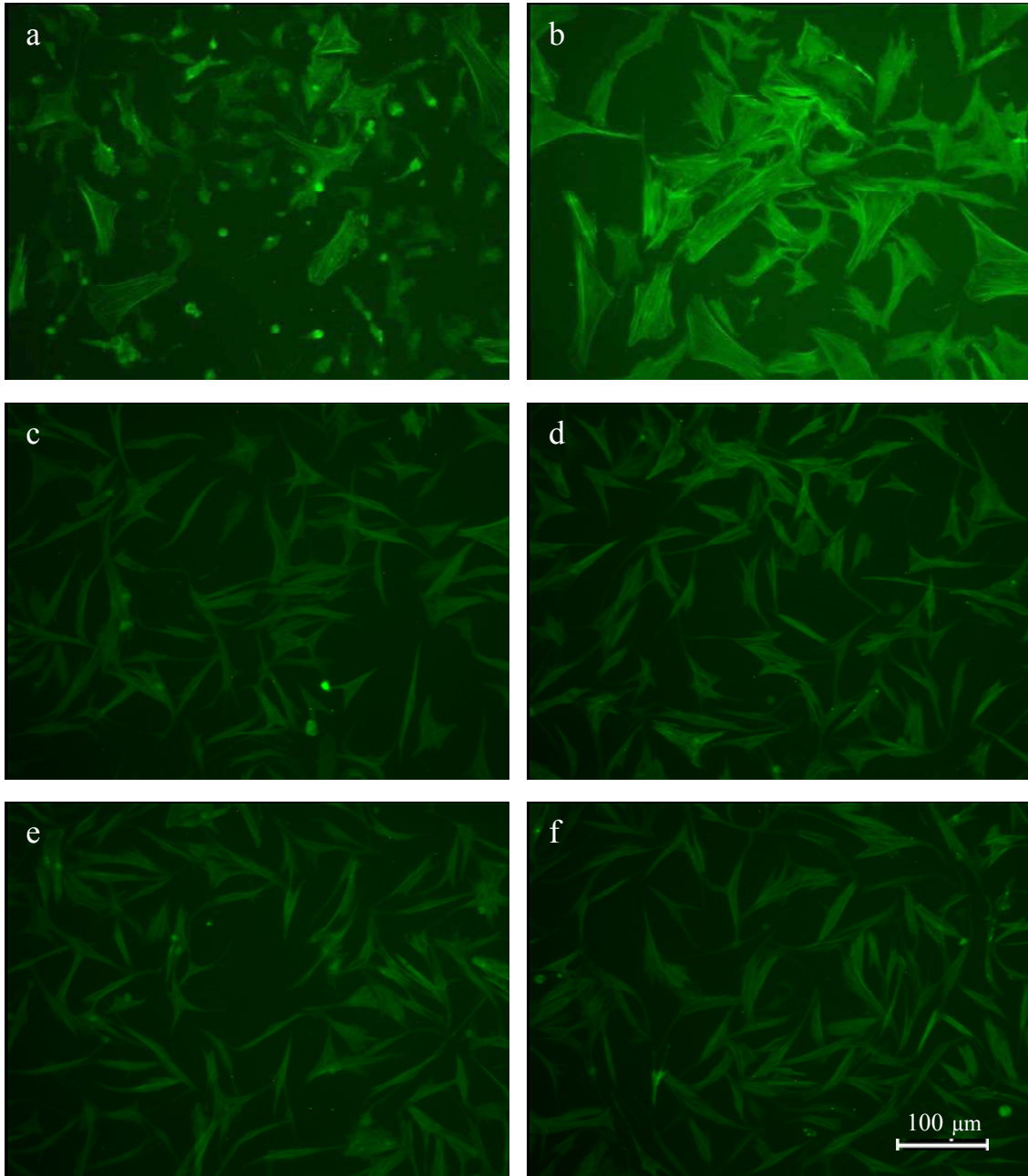


Abbildung 4: Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden über 48 Stunden mit Isoproterenol stimuliert und anschließend mit Phalloidin-FITC gefärbt. Die gleichzeitige Behandlung mit Proteasominhibitoren reduzierte die induzierte Hypertrophie.
a: unbehandelte Kontrolle, b: 10 μ M Isoproterenol, c: 10 μ M Isoproterenol + 5 nM Bortezomib, d: 10 μ M Isoproterenol + 7,5 nM Bortezomib, e: 10 μ M Isoproterenol + 10 nM Bortezomib; f: 10 μ M Isoproterenol + 50 nM MG132

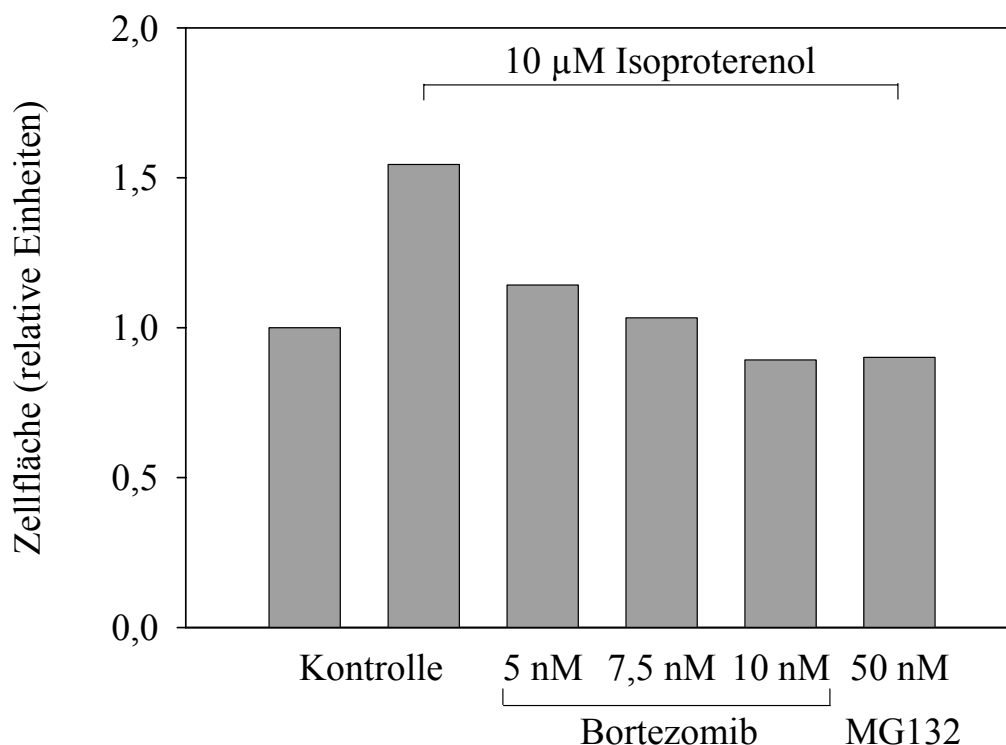


Abbildung 5: Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden über 48 Stunden mit Isoproterenol stimuliert. Die dadurch induzierte Hypertrophie der Zellen konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib dosisabhängig verringert werden (je Behandlung wurden mindestens zehn Sichtfelder morphometrisch analysiert und die Werte gemittelt; die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert).

4.1.3 Die Supprimierung des hypertrophen Zellwachstums durch Bortezomib war mit einer verminderten Expression von kardialen Hypertrophie-Markergenen assoziiert

Hypertrophierte neonatale Rattenkardiomyozyten zeigen – teilweise in Abhängigkeit von dem hypertrophen Stimulus - ein verändertes Genexpressionsmuster, das mittels quantitativer Real-Time-RT-PCR veranschaulicht werden kann. Der anti-hypertrophe Effekt des Proteasominhibitors Bortezomib sollte zusätzlich zu der Verringerung der Zellfläche auch durch eine reduzierte mRNA-Expression kardialer Hypertrophie-Markergene nachzuweisen sein. Dazu wurden die Genexpressionen von ANP und α -MHC herangezogen.

Die nRC wurden über 48 Stunden mit 10 μ M Isoproterenol stimuliert und gleichzeitig mit 5 - 10 nM Bortezomib bzw. 50 nM MG132 behandelt. Wie in Abbildung 6 dargestellt, erhöhte Isoproterenol die relative mRNA-Expression von ANP bzw. α -MHC um das zweieinhalb- bzw. dreifache der unbehandelten Kontrollen. Die gleichzeitige Behandlung mit Bortezomib reduzierte dosisabhängig sowohl die Genexpression von ANP als auch von α -MHC. Die relative mRNA-Expression von ANP wurde durch 10 nM Bortezomib in etwa auf die Expressionswerte der unbehandelten Kontrolle reduziert. Die Genexpression von α -MHC wurde schon durch die geringste Konzentration des Proteasominhibitors (5 nM) auf

Werte unterhalb derer der unbehandelten Kontrollen reduziert. Durch die Zugabe von 10 nM Bortezomib wurde die Expression von α -MHC auf etwa ein Zehntel der unbehandelten Kontrollen reduziert. Der Proteasominhibitor MG132 supprimierte die relative mRNA-Expression von ANP und α -MHC im Vergleich zu Bortezomib weniger deutlich.

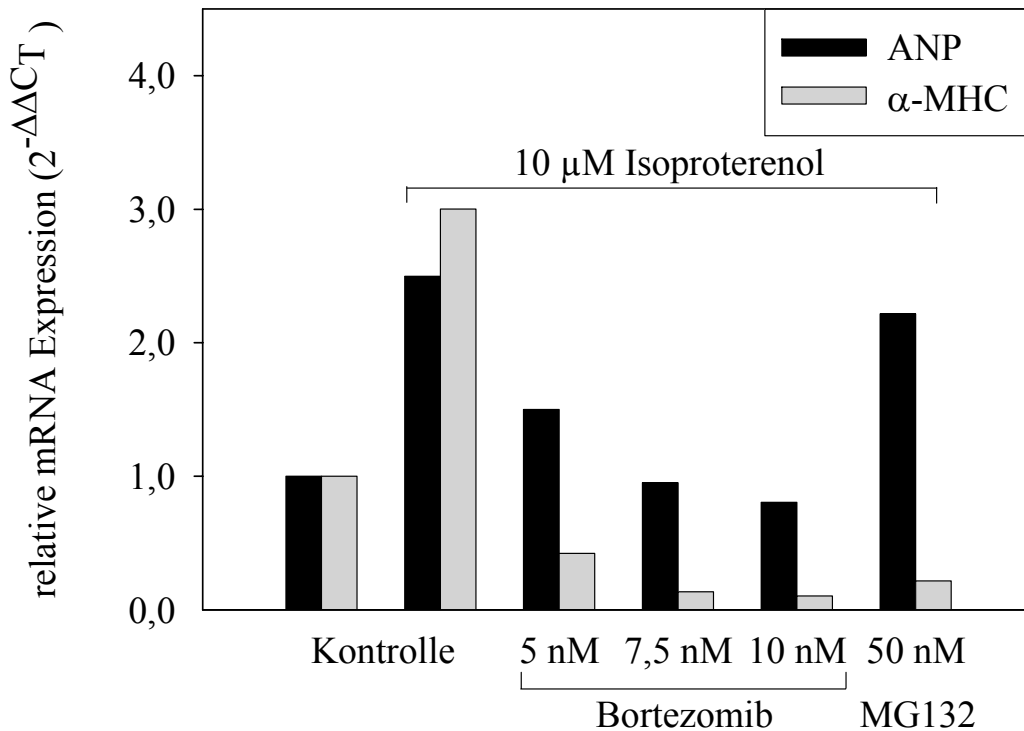


Abbildung 6: Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden über 48 Stunden mit Isoproterenol stimuliert. Die dadurch induzierte Erhöhung der relativen mRNA-Expression der kardialen Hypertrophie-Markergene ANP und α -MHC konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib dosisabhängig verringert werden (quantitative Real-Time-RT-PCR, vergleichende Schwellenwert-Methode).

4.1.4 Die partielle Inhibition des Proteasoms hatte keinen Einfluss auf die Viabilität von nRC

Um toxische Nebenwirkungen des Proteasominhibitors Bortezomib auszuschließen, wurde die Viabilität von neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht. Dazu wurde nach einer Färbung mit Trypanblau eine Zellzählung durchgeführt. Tote Zellen inkorporieren den Farbstoff und lassen sich dadurch von vitalen ungefärbten Zellen unterscheiden. Der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl wurde ermittelt. Anschließend wurden die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungen auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Nach 48-stündiger Behandlung von nRC mit dem β -adrenergen Isoproterenol konnte kein Einfluss auf die Viabilität der Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 7). Die gleichzeitige Behandlung mit Bortezomib verminderte die Viabilität nicht bzw. nur geringfügig. Des Weiteren konnte kein Einfluss von MG132 auf die Zellviabilität beobachtet werden.

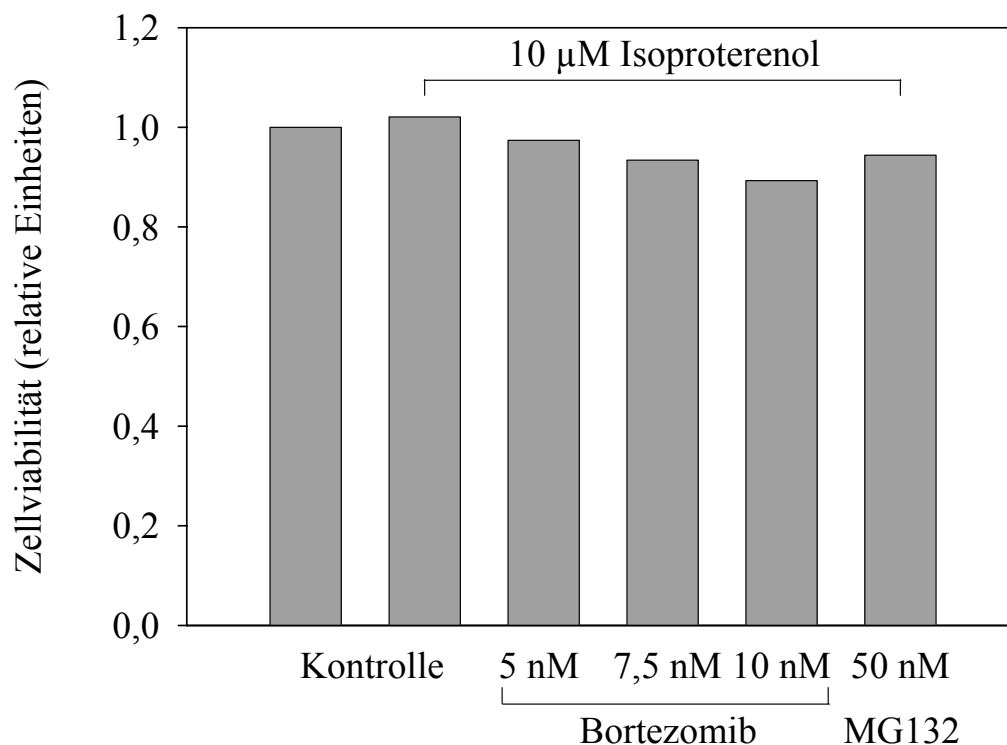


Abbildung 7: Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden über 48 Stunden mit Isoproterenol stimuliert. Die gleichzeitige Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib hatte keinen bzw. nur einen geringfügigen Einfluss auf die Zellviabilität (die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungen wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert).

4.2 Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Hypertonie-induzierte kardiale Hypertrophie in der Dahl Salz-sensitiven Ratte

Um den Einfluss des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf eine Hypertonie-induzierte kardiale Hypertrophie zu untersuchen, wurde das Tiermodell der Dahl Salz-sensitiven Ratte verwendet. Diese Tiere entwickeln unter der Fütterung einer Diät mit 4 % Natriumchlorid eine ausgeprägte Hypertonie und in Folge dessen eine kardiale Hypertrophie.

Nacheinander wurden zwei grundsätzlich ähnlich aufgebaute Versuche durchgeführt. Während die Ratten der Kontroll-Gruppe eine Standard-Diät erhielten, wurde an die Tiere der Placebo- und Bortezomib-Gruppe eine Diät mit 4 % NaCl verfüttert. Den Ratten der Bortezomib-Gruppe wurde außerdem zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von acht Wochen in dem ersten Versuch bzw. siebeneinhalb Wochen in dem zweiten Versuch, der Proteasominhibitor Bortezomib injiziert. Die verabreichte Dosis von 50 µg/kg KG wurde intraperitoneal injiziert und konnte als niedrig dosiert betrachtet werden. Laut Literatur waren keine unerwünschten Nebenwirkungen zu erwarten (siehe 2.4.3). Den Tieren der Placebo-Gruppe wurde statt Bortezomib eine 0,9%ige Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Die letzte Injektion wurde den Tieren 24 Stunden vor der Euthanasie verabreicht.

Des Weiteren wurden in regelmäßigen Abständen Allgemeinbefinden, Körpergewicht und systolischer Blutdruck kontrolliert.

In dem ersten Versuch sollte die Charakterisierung und Etablierung des Tiermodells der Dahl Salz-sensitiven Ratte erfolgen. Schwerpunktmäßig wurden die kardialen Veränderungen infolge der Fütterung einer Salzdiät und der gleichzeitigen Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib untersucht. Im Zuge der Blutdruckmessungen wurde eine geringfügige Verringerung der Hypertonie in den Bortezomib-behandelten Ratten festgestellt. Um den zugrunde liegenden Effekt genauer zu untersuchen, wurden in dem ersten Versuch zusätzlich Proben der thorakalen Aorta für Expressionsanalysen entnommen. Außerdem wurde ein zweiter, grundsätzlich ähnlich aufgebauten Versuch durchgeführt. In diesem sollte zum einen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nachgewiesen werden. Zum anderen sollte aufgrund der in dem ersten Versuch festgestellten Blutdruckveränderungen eine Untersuchung der Vasoreaktivität von isolierten Rattenaorten erfolgen. Der zweite Versuch unterschied sich von dem ersten durch einen zusätzlichen Messpunkt des Blutdrucks in der dritten Woche und durch eine Verkürzung der Versuchsdauer auf siebeneinhalb, statt acht Wochen. Diese Verkürzung erfolgte aufgrund der in dem ersten Versuch festgestellten erhöhten Morbidität und Mortalität der Placebo-behandelten Tiere, insbesondere in der letzten Versuchswoche.

4.2.1 Bortezomib reduzierte die Morbidität und Mortalität hypertensiver DSSR

Die Fütterung einer Salzdiät über acht bzw. siebeneinhalb Wochen führte wie erwartet bei allen Tieren zu der Entwicklung einer Hypertonie und daraus resultierender Hypertrophie des Herzens (siehe 4.2.6.1 und 4.2.5). In dem ersten Versuch hatte dies bei allen Tieren der Placebo-Gruppe ein deutlich reduziertes Allgemeinbefinden (z. B. reduziertes Explorations- und Komfortverhalten) und/oder den Verlust von Körpergewicht, insbesondere in der letzten Versuchswoche, zur Folge (siehe Tabelle 4). Bei den Tieren der Bortezomib-Gruppe wurde im ersten Versuch kein Tier diesbezüglich auffällig (siehe Abbildung 8). Nur in der Placebo-Gruppe starben insgesamt drei Tiere vor Versuchsende in der fünften bzw. siebten Versuchswoche. Ursächlich hierfür könnten ein Apoplex oder Herzinfarkt gewesen sein. Ein weiteres Placebo-Tier zeigte in der sechsten Woche Symptome eines möglichen Apoplexes (z. B. Manegebewegungen, Kopfschiefhaltung), erholte sich aber innerhalb weniger Tage. Wegen einer Lungenfibrose wurde ein anderes Tier der Placebo-Gruppe nicht mit in die Auswertung einbezogen. In der Kontroll-Gruppe wurde eine Ratte wegen zunehmender Dyspnoe (mediastinales B-Zell Lymphom) vorzeitig euthanasiert.

Damit ergaben sich für den ersten Versuch die folgenden auswertbaren Tierzahlen:

- Kontroll-Gruppe mit 10 Ratten
- Placebo-Gruppe mit 7 Ratten
- Bortezomib-Gruppe mit 11 Ratten

Auch in dem zweiten Versuch zeigten Tiere der Placebo-Gruppe ein deutlich reduziertes Allgemeinbefinden und verloren an Körpergewicht. Allerdings waren davon nicht mehr alle Tiere wie in dem ersten Versuch betroffen. Diesmal zeigten auch zwei bzw. drei Bortezomib-Tiere ein reduziertes Allgemeinbefinden und den Verlust von Körpergewicht in den letzten Versuchstagen. Eine Ratte dieser Versuchsgruppe wurde in der fünften Versuchswoche tot aufgefunden. Je ein Tier der Placebo- und Bortezomib-Gruppe zeigten die oben genannten Symptome eines Apoplexes, erholten sich jedoch wieder. In der Placebo-Gruppe musste ein Tier wegen anhaltender Anorexie, Kachexie und Dehydratation vor Versuchsende euthanasiert werden. Ein weiteres Tier dieser Gruppe wurde wegen einer *post mortem* festgestellten Hepatitis nicht mit in die Auswertung einbezogen.

Daraus resultieren folgende auswertbare Tierzahlen für den zweiten Versuch:

- Kontroll-Gruppe mit 11 Ratten
- Placebo-Gruppe mit 9 Ratten
- Bortezomib-Gruppe mit 10 Ratten

Tabelle 4: DSSR (Kontrolle) wurden über acht (Versuch 1 = V 1) bzw. siebeneinhalb (Versuch 2 = V 2) Wochen mit einer Salzdiät gefüttert und mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib oder Kochsalzlösung (Placebo) behandelt. Aufgrund der salzinduzierten Hypertonie und kardialen Hypertrophie starben vor allem Placebo-Tiere bzw. mussten vor Versuchsende aufgrund einer Anorexie/Kachexie euthanasiert werden (a). Aufgrund von Sekundärerkrankungen wurden drei Tiere nicht mit in die Auswertung einbezogen (b = mediastinaler Tumor; c = Lungenfibrose; d = Hepatitis). Die verbleibenden ausgewerteten Tiere wurden insbesondere in der Placebo-Gruppe durch ein reduziertes Allgemeinbefinden und Körpergewicht auffällig.

	Kontrolle		Placebo		Bortezomib	
	V 1	V 2	V 1	V 2	V 1	V 2
Gruppengröße	11	11	11	11	11	11
gestorbene Ratten	0	0	3	1 (a)	0	1
ausgeschlossene Ratten	1 (b)	0	1 (c)	1 (d)	0	0
eingeschlossene Ratten	10	11	7	9	11	10
reduziertes Körpergewicht	0	0	7	3	0	3
reduziertes Allgemeinbefinden	0	0	5	2	0	2



Abbildung 8: Dahl Salz-sensitive Ratten wurden über acht bzw. sieben und einhalb Wochen mit einer salzreichen Diät (4% NaCl) gefüttert. Zusätzlich wurde der niedrig dosierte Proteasominhibitor Bortezomib (oberes Bild) oder Kochsalzlösung (unteres Bild) injiziert. Die Abbildungen zeigen die Tiere in Narkose, kurz vor der Euthanasie. Man beachte bei dem Tier der Placebo-Gruppe das glanzlose Fell, die Muskelatrophie im Schulter- und Oberschenkelbereich und die rötliche Verfärbung im medialen Augenwinkel. Hierbei handelt es sich um das Sekret der Harderschen Drüsen, das infolge des reduzierten Putzverhaltens nicht mehr von der Ratte entfernt wurde.

4.2.2 Der Proteasominhibitor verhinderte die Körpergewichtsabnahme hypertensiver DSSR

Um Rückschlüsse auf den Gesundheitszustand und das Allgemeinbefinden der Ratten ziehen zu können, wurde eine wöchentliche Gewichtsbestimmung vorgenommen.

Zu Beginn der Versuche wogen die Tiere zwischen 200 g und 230 g. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Körpergewichten der drei verschiedenen Versuchsgruppen bestand nicht.

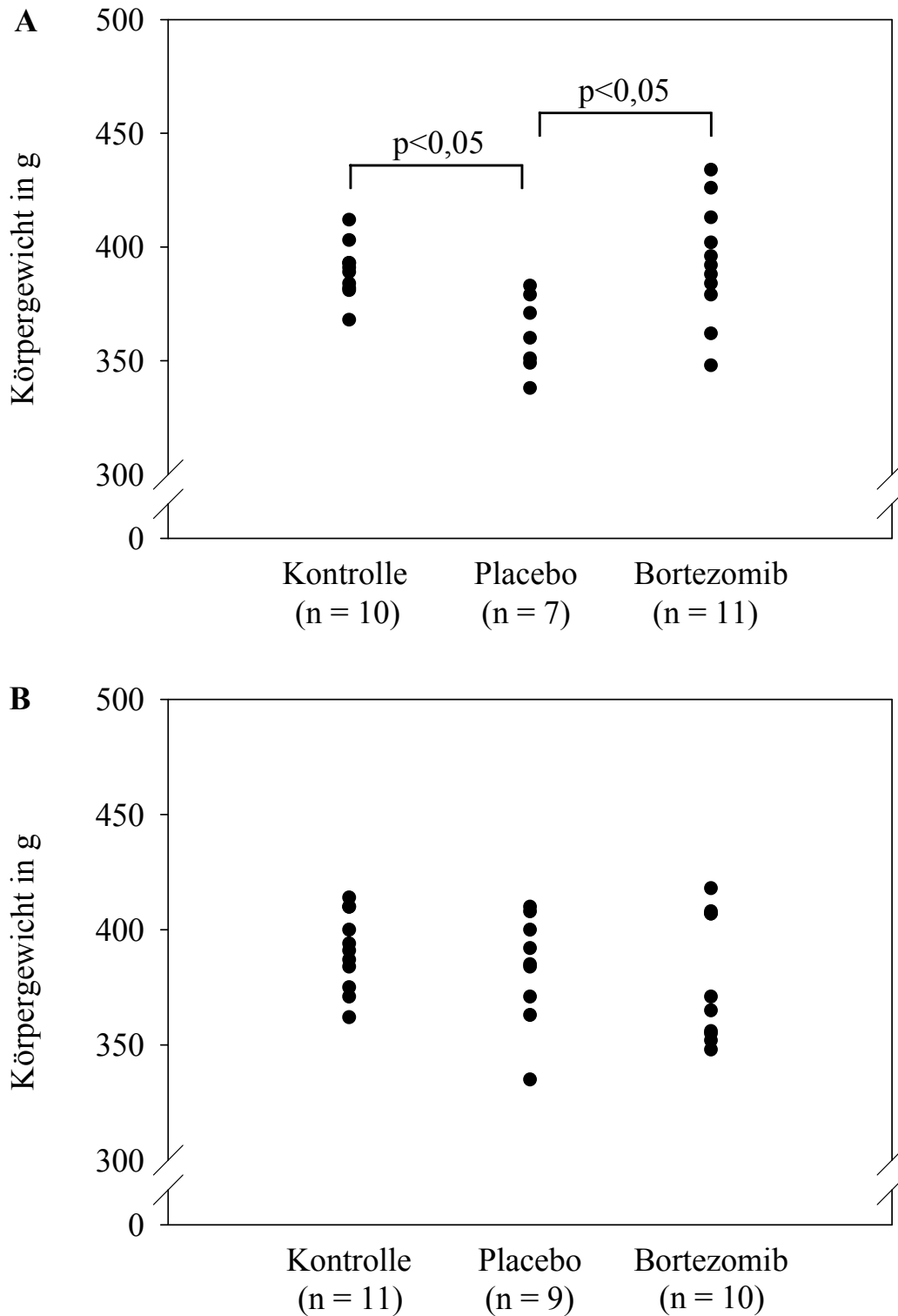


Abbildung 9: Dargestellt sind die Körpergewichte von DSSR am Ende des ersten (A) bzw. des zweiten (B) Versuchs. In dem ersten Versuch führte die Fütterung einer Salzdiät über acht Wochen zu einer signifikanten Verringerung des Körpergewichts der Placebo-Tiere im Vergleich zu den Kontroll- und Bortezomib-Tieren. Am Ende des sieben- und einhalb Wochen dauernden zweiten Versuchs konnten keine Unterschiede festgestellt werden (t-Test).

In dem ersten Versuch waren die bei Versuchsende festgestellten Körpergewichte (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Placebo-behandelten Ratten (361,6 g \pm 16,7 g) signifikant geringer als die der Tiere in der Kontroll- (389,6 g \pm 12,2 g) und Bortezomib-Gruppe (393,1 g \pm 25,6 g) (siehe Abbildung 9 A). Die Ursache hierfür war ein Verlust an Körpergewicht bei den Ratten der Placebo-Gruppe in den letzten beiden Versuchswochen. Die Bortezomib-Gruppe unterschied sich in dem Körpergewicht nicht von der Kontroll-Gruppe.

In dem zweiten Versuch mit einer verkürzten Versuchsdauer von siebeneinhalb Wochen konnte zwischen den Körpergewichten der Ratten in den verschiedenen Versuchsgruppen kein Unterschied mehr festgestellt werden (Kontroll-Gruppe: 390,7 g \pm 17,0 g) (siehe Abbildung 9 B). Dies lag zum einen daran, dass im Gegensatz zu dem ersten Versuch auch Tiere der Bortezomib-Gruppe (378,7 g \pm 27,9 g) einen Gewichtsverlust in den letzten Versuchstagen erkennen ließen. Zum anderen konnte festgestellt werden, dass in der Placebo-Gruppe (383,1 g \pm 23,9 g) im Vergleich zu dem ersten Versuch nicht mehr so viele Tiere zum Versuchsende hin an Gewicht verloren.

4.2.3 Bortezomib verhinderte tendenziell die Erhöhung der relativen Organgewichte salzgefütterter DSSR

Für den Nachweis von stauungsbedingten Veränderungen der Organgewichte infolge der Salzdiät bzw. der kardialen Hypertrophie wurden die Organe nach ihrer Entnahme gewogen. Die jeweiligen Gewichte von Lunge, Leber, Milz und rechter Niere wurden auf das Körpergewicht relativiert (mg/g) und in Tabelle 5 aufgeführt.

Die Fütterung einer Salzdiät über acht bzw. siebeneinhalb Wochen führte bei den Tieren der Placebo- und Bortezomib-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe zu einem signifikant höherem relativen Gewicht von Milz und Niere. In dem ersten Versuch wies auch die Lunge der Placebo-Ratten (Median 5,05 mg/g) ein signifikant erhöhtes relatives Gewicht auf, während dies bei den Tieren, denen Bortezomib appliziert wurde (Median 4,76 mg/g), nicht beobachtet werden konnte. In diesem Versuch konnte auch ein signifikant erniedrigtes relatives Nierengewicht der Bortezomib-Tiere (Median 4,60 mg/g) im Vergleich zu den Placebo-Tieren (Median 5,24 mg/g) nachgewiesen werden. Beide Resultate ließen sich jedoch in dem zweiten Versuch nicht reproduzieren. Die relativen Lebergewichte unterschieden sich in beiden Versuchen zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant.

Tabelle 5: DSSR der Placebo- und Bortezomibgruppe wurden über acht (erster Versuch) bzw. siebeneinhalb Wochen (zweiter Versuch) mit einer Salzdiät gefüttert, während die Kontrollen normales Rattenfutter erhielten. Aufgeführt sind die relativen Organgewichte (mg/g Körpergewicht) der DSSR bei Versuchsende (V = Versuch; Angabe von Median, 25% Quartil und 75% Quartil; *: $p < 0,05$ vs. Placebo; **: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; Mann-Whitney Rank Sum Test)

		Kontrolle		Placebo		Bortezomib	
		V 1	V 2	V 1	V 2	V 1	V 2
		(n = 10)	(n = 11)	(n = 7)	(n = 9)	(n = 11)	(n = 10)
Leber	Median	41,5	40,1	42,8	43,2	40,6	40,8
	25 % Quartil	39,6	39,3	39,5	40,4	38,5	39,0
	75 % Quartil	44,9	43,3	43,2	47,5	41,8	44,3
Milz	Median	2,84	2,83	3,89 **	3,47 **	3,42 **	3,71 **
	25 % Quartil	2,79	2,7	3,7	3,10	3,19	3,13
	75 % Quartil	3,15	2,9	4,33	4,83	3,97	3,88
Niere	Median	3,44	3,35	5,24 **	5,16 **	4,6 *: **	5,10 **
	25 % Quartil	3,37	3,27	4,80	4,78	4,42	4,27
	75 % Quartil	3,67	3,42	5,31	5,18	4,90	5,29
Lunge	Median	4,74	4,75	5,05 **	4,83	4,76	4,82
	25 % Quartil	4,68	4,65	4,80	4,67	4,71	4,63
	75 % Quartil	4,81	4,88	5,48	4,98	4,93	5,07

4.2.4 Bortezomib reduzierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in PBMC und Organen tendenziell

Der Nachweis der proteasomalen Inhibition durch Bortezomib erfolgte in beiden Versuchen in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). In dem ersten Versuch wurde zusätzlich in Leber, Niere und Herz die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms mit Hilfe fluorogener proteasomaler Substrate bestimmt. Deren Abbau führt zu einer Fluoreszenz, die proportional zur Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms ist. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung jeder Probe wurden auf den Mittelwert der Kontrolle normiert.

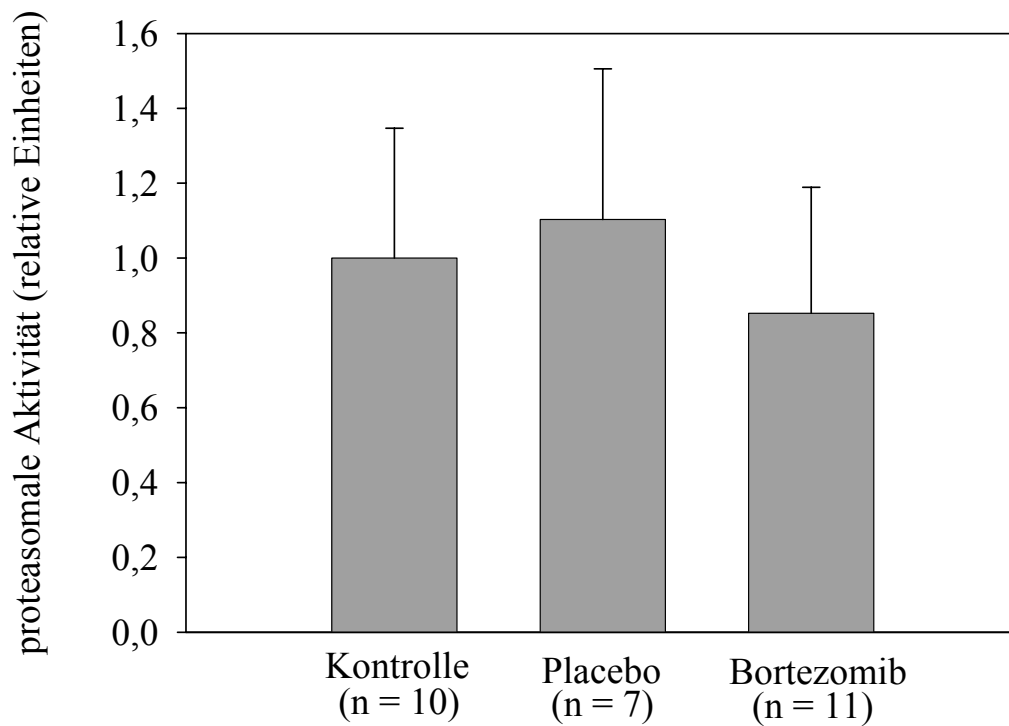
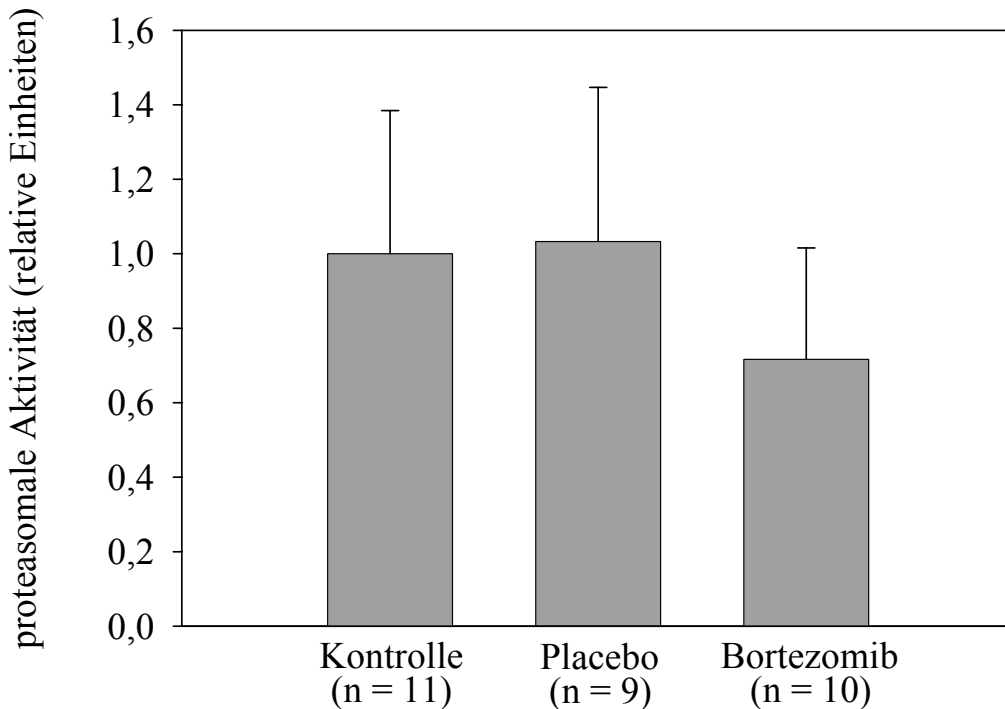
**B**

Abbildung 10: DSSR wurden über acht (A) bzw. sieben und einhalb (B) Wochen zweimal wöchentlich mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib (50 µg/kg KG, i.p.) behandelt. 24 Stunden vor der Euthanasie und Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms in den PBMC erfolgte die letzte Injektion. Die tendenzielle Verringerung der proteasomalen Aktivität in Bortezomib-behandelten Ratten war in beiden Versuchen nicht signifikant (Die Ergebnisse wurden auf den Mittelwert der Kontrollen normiert. (A) Mann-Whitney Rank Sum Test; (B) t-Test).

Aus Abbildung 10 A wird ersichtlich, dass die Behandlung von hypertensiven Dahl Salz-sensitiven Ratten mit dem Proteasominhibitor Bortezomib über acht Wochen in dem ersten Versuch im Vergleich zu den Placebo-Tieren zu einer tendenziellen (-23 %), aber nicht signifikanten Verringerung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in PBMC führte. Zwischen den Tieren der Placebo-Gruppe und den Kontrolltieren gab es keinen Unterschied in der ChTL Aktivität des Proteasoms.

Die Behandlung mit Bortezomib über siebeneinhalb Wochen in dem zweiten Versuch führte im Vergleich zu den Placebo-Tieren ebenfalls zu einer verminderten Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in den PBMC von hypertensiven DSSR (siehe Abbildung 10 B). Hier war der Effekt zwar deutlicher (-31 %), aber noch immer nicht signifikant. Auch dieser Versuch ergab keine Unterschiede in der proteasomalen Aktivität zwischen den Placebo-Tieren und den Kontrollen.

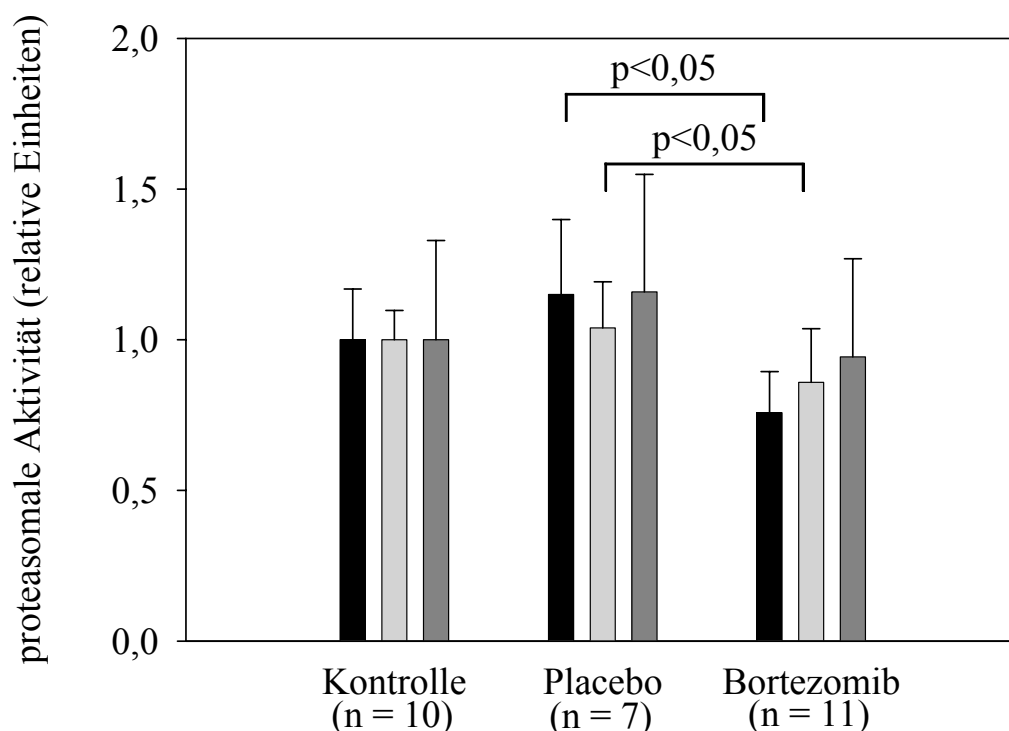


Abbildung 11: Die Behandlung hypertensiver DSSR mit Bortezomib über acht Wochen reduzierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in Leber und Niere signifikant und im Herzen tendenziell im Vergleich zu den Placebo-Ratten (schwarz: Leber; hellgrau: Niere, dunkelgrau: Herz; die Ergebnisse wurden auf den Mittelwert der Kontrolle normiert; Mann-Whitney Rank Sum Test).

Die Untersuchung der proteasomalen Aktivität erfolgte außerdem in Leber-, Nieren- und Herzgewebe von DSSR des ersten Versuchs (siehe Abbildung 11). Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib führte im Vergleich zu den Placebo-Tieren zu einer signifikanten Verringerung der proteasomalen Aktivität in der Leber um 34 %. Auch in den Nieren konnte eine signifikante Reduzierung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität um 17 % nachgewiesen werden. Die Abnahme der proteasomalen Aktivität in den Herzen der

Bortezomib-behandelten Tiere um 19 % erreichte nicht das Signifikanzniveau. Die Tiere der Placebo-Gruppe zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung der proteasomalen Aktivität in allen drei Organen (Leber + 15 %, Niere + 4 %, Herz + 16 %).

4.2.5 Einfluss des niedrig-dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf das Herz Dahl Salz-sensitiver Ratten

Die Hypertonie-induzierten Auswirkungen und der Einfluss des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf das Herz von Dahl Salz-sensitiven Ratten wurden mit verschiedenen Methoden untersucht. Der grundlegende Nachweis einer kardialen Hypertrophie erfolgte durch die Bestimmung der absoluten und relativen Herzgewichte. Des Weiteren erfolgten die mikroskopische Untersuchung der Myozytengröße und die molekularbiologische Analyse der Genexpression eines kardialen Hypertrophie-Markergens. Die Untersuchung fibrotischer Veränderungen erfolgte mikroskopisch durch eine Messung des Bindegewebsanteils und molekularbiologisch durch die Analyse der Genexpression eines kardialen Fibrose-Markergens.

4.2.5.1 Bortezomib reduzierte das Herzgewicht hypertensiver DSSR

Für den Nachweis einer kardialen Hypertrophie infolge einer Salz-induzierten Hypertonie wurden die Parameter Herzgewicht und das auf Körpergewicht (HG/KG) bzw. Tibialänge (HG/TL) relativierte Herzgewicht bestimmt.

Die Fütterung einer Salzdiät über acht Wochen in dem ersten Versuch resultierte in der Placebo- und der Bortezomib-Gruppe in einem signifikant höheren Herzgewicht (MW \pm SD) im Vergleich zu den Kontrolltieren (1,38 g \pm 0,07 g) (siehe Abbildung 12 A). Die Herzgewichte der Tiere, die Bortezomib erhielten (1,61 g \pm 0,06 g), unterschieden sich nicht signifikant von denen der Placebo-Gruppe (1,65 g \pm 0,1 g). Die Salzdiät induzierte bei den Placebo-Tieren eine Erhöhung des Herzgewichtes um 20 % bzw. um 17 % bei den Bortezomib-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren.

In dem zweiten Versuch über siebeneinhalb Wochen induzierte die Fütterung einer Salzdiät ebenfalls ein signifikant erhöhtes Herzgewicht in der Placebo- und der Bortezomib-Gruppe (MW \pm SD) (siehe Abbildung 12 B) im Vergleich zu den Kontrolltieren (1,34 g \pm 0,07 g). Im Gegensatz zu dem ersten Versuch ließ sich jedoch bei den Tieren, die den Proteasominhibitor Bortezomib (1,58 g \pm 0,08 g) erhielten, ein signifikant niedrigeres Herzgewicht als bei den Placebo-Tieren (1,69 g \pm 0,06 g) nachweisen. Die Ratten der Placebo-Gruppe wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren ein um 26 % erhöhtes Herzgewicht auf, die Tiere der Bortezomib-Gruppe nur ein 18 % schwereres Herz.

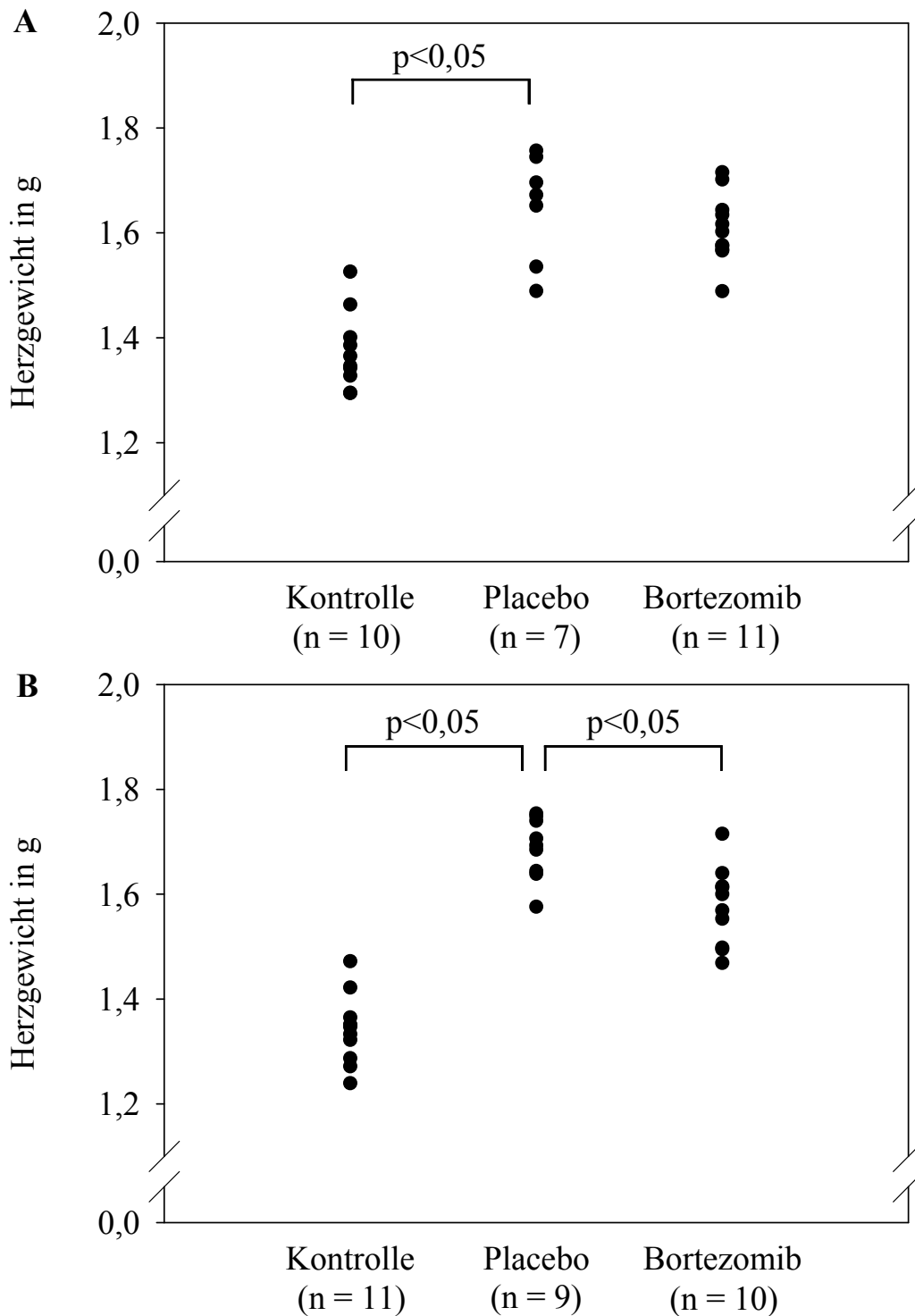


Abbildung 12: Die Fütterung einer Salzdiät über acht (A) bzw. siebeninhalb Wochen (B) führte bei DSSR zu einer signifikanten Erhöhung des Herzgewichts in der Placebo-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen. Der niedrig dosierte Proteasominhibitor Bortezomib hatte in dem ersten Versuch (A) keinen signifikanten Einfluss auf das Herzgewicht im Vergleich zu den Tieren der Placebo-Gruppe. In dem zweiten Versuch (B) reduzierte Bortezomib das Herzgewicht signifikant (t-Test).

Der Hypertrophieparameter HG/KG (MW \pm SD) setzt das Herzgewicht in Relation zu dem Körpergewicht. In dem ersten Versuch über acht Wochen zeigten sich auch hier signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollratten (3,5 mg/g \pm 0,18 mg/g) und den hypertensiven Ratten der beiden Salzdiätgruppen (siehe Abbildung 13 A). Weil die Tiere der Placebo-Gruppe bei Versuchsende ein signifikant geringeres Körpergewicht als die Bortezomib-Tiere aufwiesen, wurden die Unterschiede in der Ausbildung der kardialen Hypertrophie zwischen Placebo-Gruppe (4,56 mg/g \pm 0,19 mg/g) und Bortezomib-Gruppe (4,1 mg/g \pm 0,19 mg/g) im Vergleich zu dem absoluten Herzgewicht deutlich (siehe Abbildung 12). Die Fütterung der Salzdiät führte bei den Placebo-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer Zunahme des HG/KG um 30 % bzw. um 17 % bei den Bortezomib-Tieren.

Auch in dem zweiten Versuch ergaben sich signifikante Unterschiede im Herzgewicht/Körpergewicht (MW \pm SD) zwischen den Kontrolltieren (3,4 mg/g \pm 0,14 mg/g) und den hypertensiven Ratten der Placebo- und Bortezomib-Gruppe (siehe Abbildung 13 B). Der Unterschied zwischen den Tieren der Placebo-Gruppe (4,4 mg/g \pm 0,3 mg/g) und den Bortezomib-Tieren (4,2 mg/g \pm 0,4 mg/g) war zwar tendenziell vorhanden, erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Wie in dem ersten Versuch nahm das HG/KG im Vergleich zu den Tieren der Kontroll-Gruppe bei den Placebo-Ratten um 29 % zu. Das auf das Körpergewicht relativierte Herzgewicht der Bortezomib-Tiere stieg in diesem Versuch jedoch um 24 %.

Um die Normierung auf eine weniger variable Bezugsgröße als das Körpergewicht zu ermöglichen, wurden außerdem die Tibialängen der einzelnen Ratten vermessen und zu dem Herzgewicht in Relation gesetzt (HG/TL). Die Tibialängen zeigten aufgrund des gleichen Alters der Tiere keine Unterschiede und eigneten sich daher für die Normierung der Herzgewichte als nicht bzw. weniger variable Bezugsgröße. Dieser Hypertrophieparameter (MW \pm SD) wies in dem ersten Versuch abermals einen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren der Kontroll-Gruppe (34,4 mg/mm \pm 1,8 mg/mm) und denen der beiden Salzdiätgruppen auf (siehe Abbildung 14 A). Signifikant niedrigere Werte für die Tiere der Bortezomib-Gruppe (39,5 mg/mm \pm 2,0 mg/mm) im Vergleich zu den Placebo-Ratten (41,2 mg/mm \pm 2,4 mg/mm) konnten nicht nachgewiesen werden.

Der hypertrophierte Zustand von Rattenherzen der Placebo-Gruppe konnte auch in dem zweiten Versuch durch eine Erhöhung des Hypertrophieparameters Herzgewicht/Tibialänge nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14 B). Im Vergleich zu den Kontrolltieren (31,5 mg/mm \pm 1,8 mg/mm) wiesen die Placebo-Tiere (39,7 mg/mm \pm 1,5 mg/mm) eine Erhöhung um 26 % auf. Die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib reduzierte das auf die Tibialänge relativierte Herzgewicht signifikant (37,3 mg/mm \pm 1,9 mg/mm).

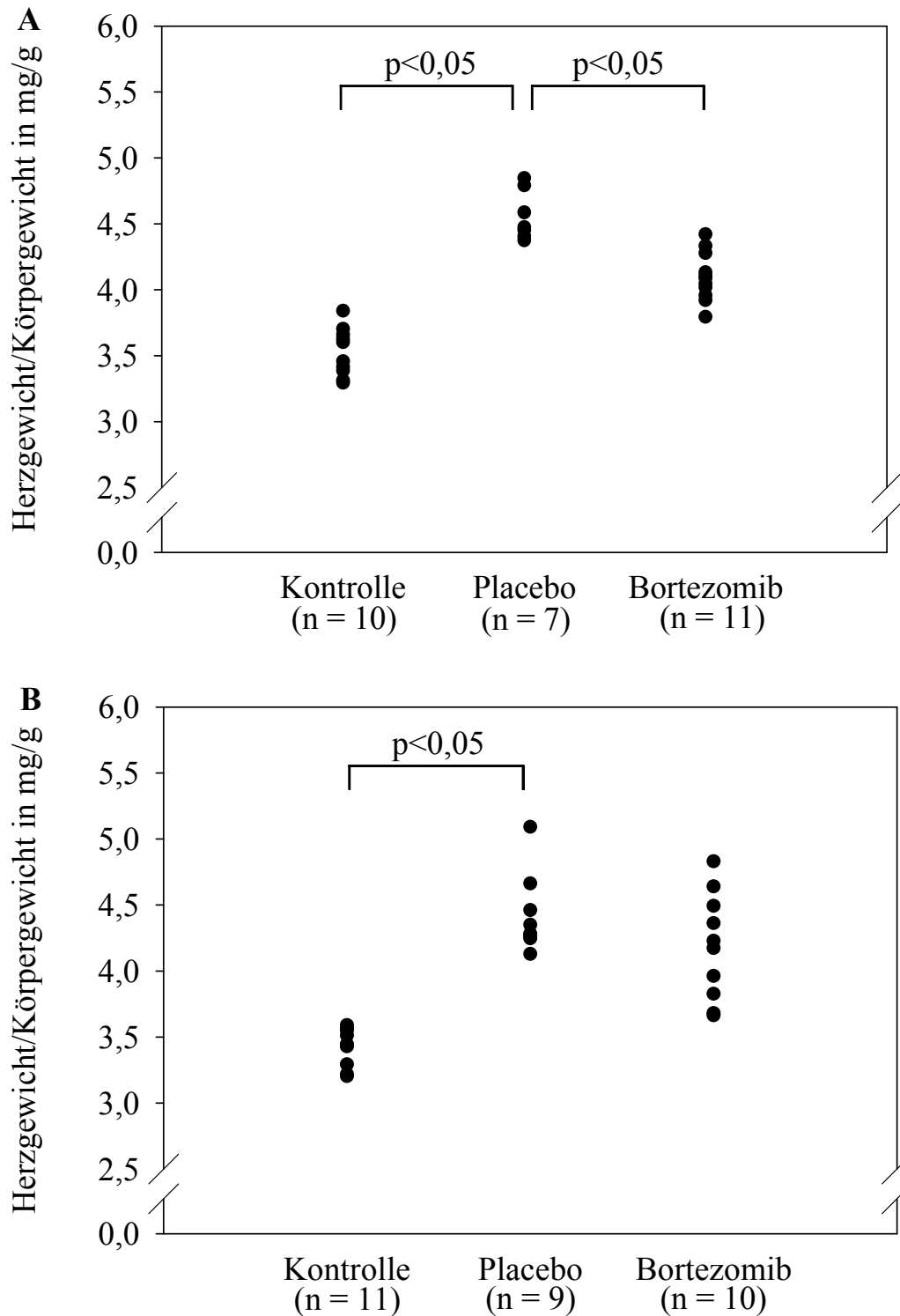


Abbildung 13: Mit Salz gefütterte hypertensive DSSR der Placebo-Gruppe entwickelten nach acht (A) bzw. sieben und a half Wochen (B) eine kardiale Hypertrophie. In beiden Versuchen konnten signifikante Unterschiede des Hypertrophieparameters Herzgewicht/Körpergewicht zwischen den Kontrolltieren und den Placebo-Tieren beobachtet werden. Die Behandlung mit niedrig dosierten Bortezomib reduzierte die kardiale Hypertrophie in dem ersten Versuch (A) signifikant, in dem zweiten Versuch (B) nur tendenziell (t-Test).

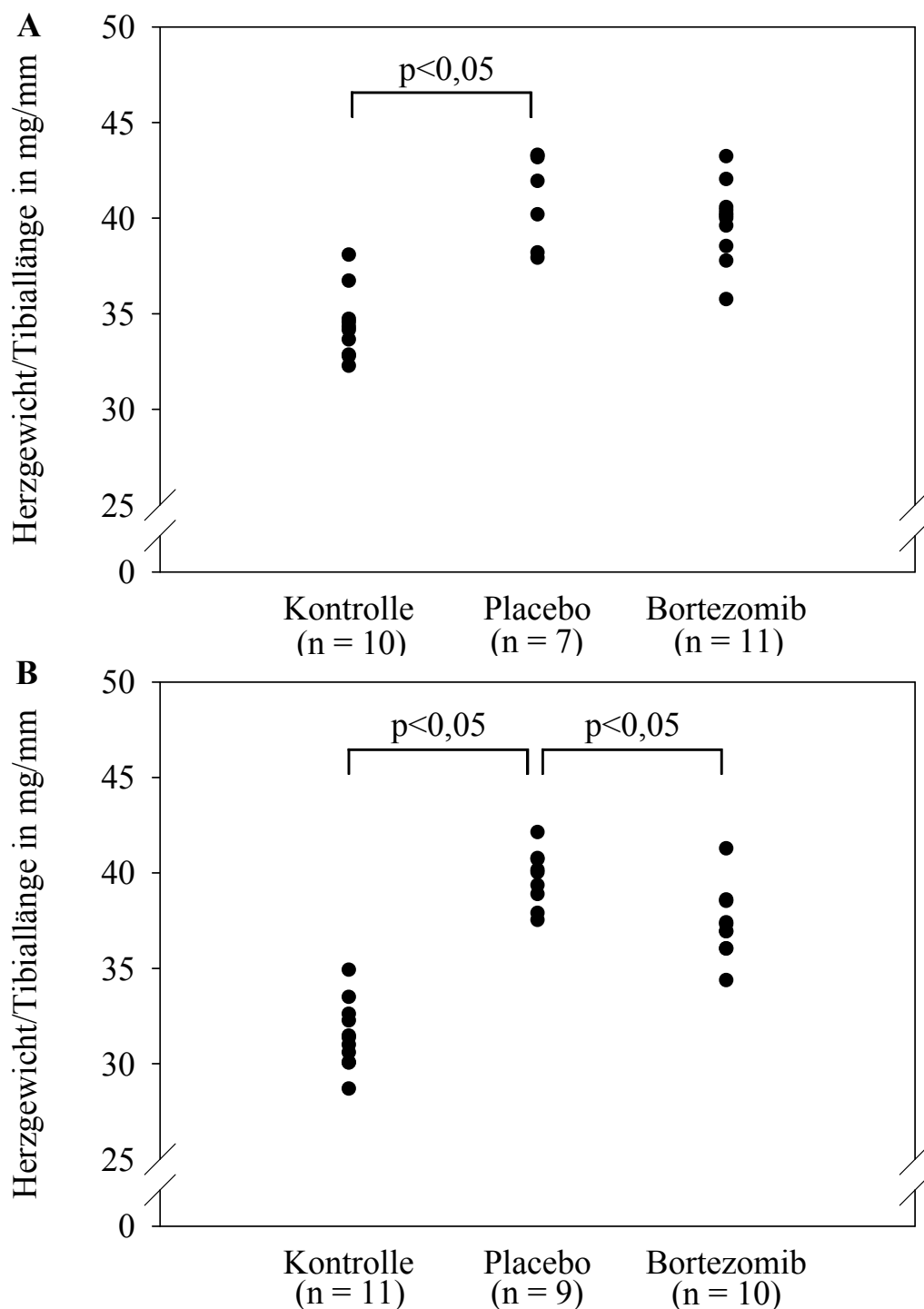


Abbildung 14: DSSR entwickelten durch die Fütterung einer Salzdiät eine Hypertonie und in Folge dessen eine kardiale Hypertrophie. Nach acht (A) bzw. siebeneinhalb (B) Wochen konnten signifikante Unterschiede des Hypertrophieparameters Herzgewicht/Tibiallänge zwischen den Kontrollen und den Placebo-Ratten beobachtet werden. In dem zweiten Versuch (B) reduzierte die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib das auf die Tibiallänge relative Herzgewicht signifikant im Vergleich zu den Placebo-Tieren (t-Test).

4.2.5.2 Die Herzen Bortezomib-behandelter DSSR waren histopathologisch unauffälliger

Die geblindete histopathologische Untersuchung der Rattenherzen des ersten Versuchs erfolgte durch Fr. Dr. med. vet. G. Wibbelt (Institut für Zoo- und Wildtierkunde, Berlin). Die mit HE bzw. Azan gefärbten Schnitte wurden insbesondere in Hinblick auf Fibroseherde, Nekrosen, Infarkte und Zellinfiltrationen untersucht. Die Auswertung erfolgte rein deskriptiv.

Die Herzen der Kontrolltiere wiesen im Gegensatz zu denen der hypertensiven DSSR der Placebo- und Bortezomib-Gruppe keine Auffälligkeiten auf. Diese Tiere zeigten histopathologische Veränderungen in Form von Fibroseherden (vermehrtes interstitielles und perivaskuläres Bindegewebe), Nekrosen (Hypereosinophilie der Kardiomyozyten, Karyolyse) sowie Zellinfiltrationen (Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen). Bei einem Tier der Placebo-Gruppe ließ sich histologisch Infarktgewebe (Nekrose, Zellinfiltrationen und faserreiches Bindegewebe) nachweisen. Alle genannten Veränderungen wurden bei den Placebo-Ratten häufiger beobachtet, als bei den Tieren der Bortezomib-Gruppe. Vier von elf untersuchten Herzen der letzteren Gruppe waren histopathologisch unauffällig. Bei den Placebo-Tieren war dies nur bei einem von sieben untersuchten Herzen der Fall.

4.2.5.3 Das reduzierte Herzgewicht war mit einer tendenziell verringerten Kardiomyozyten-Querschnittsfläche assoziiert

Bei einer Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie sollte eine Hypertrophie der Kardiomyozyten nachweisbar sein. Deshalb wurden HE-gefärbte Schnitte der Herzen von Dahl Salz-sensitiven Ratten des ersten Versuchs angefertigt und die einzelnen Kardiomyozyten in der freien Wand des linken Ventrikels morphometrisch untersucht. Bei 40-facher Vergrößerung wurden die Querschnittsflächen von mindestens zehn Kardiomyozyten pro Tier mit Hilfe einer Software berechnet. Dabei wurden nur Zellen mit angeschnittenen sichtbaren Kern und intakter Zellmembran untersucht. Die einzelnen Werte wurden gemittelt (siehe Abbildung 15). Für diese histologische Untersuchung standen in der Kontrollgruppe acht, in der Placebogruppe fünf und in der Bortezomibgruppe neun Ratten zur Verfügung.

Die Fütterung einer Salzdiät induzierte in Dahl Salz-sensitiven Ratten eine Hypertonie und in Folge dessen auch eine kardiale Hypertrophie. Diese ließ sich auch histologisch durch eine Zunahme der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche (MW \pm SD) nachweisen (siehe Abbildung 16). Sie nahm bei den Tieren der Placebo-Gruppe ($464 \mu\text{m}^2 \pm 100 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe ($314 \mu\text{m}^2 \pm 30 \mu\text{m}^2$) signifikant um 48 % zu. Durch die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib konnte die Fläche der Kardiomyozyten im Vergleich zu den Placebo-Tieren um 11 % auf $412 \mu\text{m}^2 \pm 70 \mu\text{m}^2$ reduziert werden.

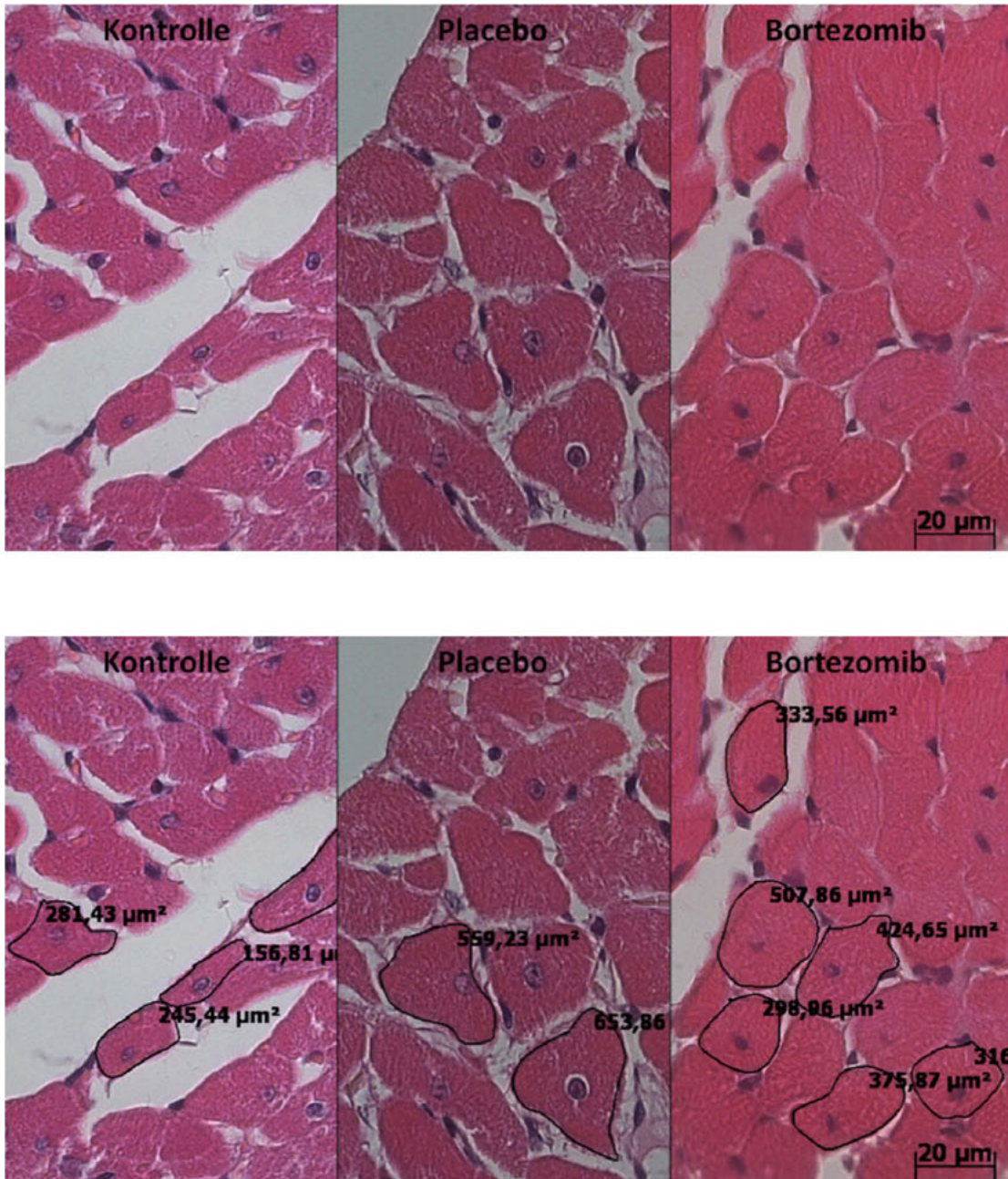


Abbildung 15: Nachdem DSSR über acht Wochen mit einer Salzdiät gefüttert wurden und dies eine Hypertonie-induzierte kardiale Hypertrophie zur Folge hatte, erfolgte deren histologischer Nachweis. Dazu wurden querschnittene Kardiomyozyten mit angeschnittenen sichtbaren Kern und intakter Zellmembran (Abbildung oben) manuell umfahren und deren Fläche mit Hilfe einer Software in μm^2 berechnet (Abbildung unten). Während in den Placebo-Ratten eine Hypertrophie der Kardiomyozyten beobachtet werden konnte, war dies in den mit Bortezomib behandelten DSSR weniger deutlich ausgeprägt (HE-Färbung, 40-fache Vergrößerung).

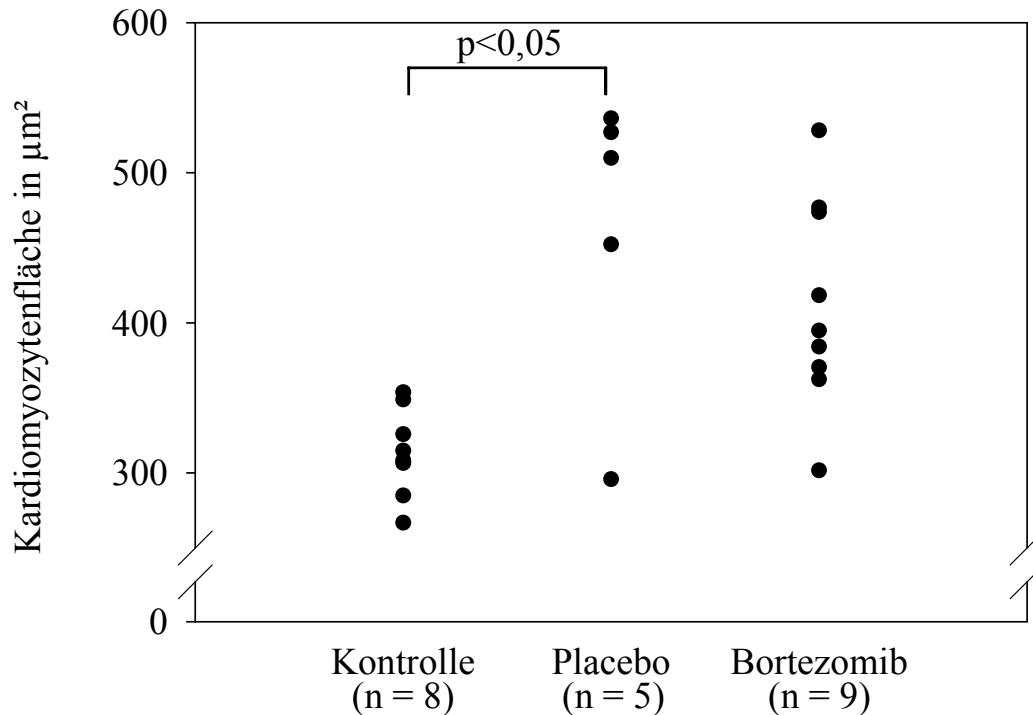


Abbildung 16: Die Fütterung einer Salzdiät über acht Wochen induzierte in DSSR eine Hypertonie und kardiale Hypertrophie. Histologisch wurde letztere durch eine Flächenmessung quergeschnittener Kardiomyozyten in der freien Wand des linken Ventrikels nachgewiesen. Die Zunahme der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche in den Placebo-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren war signifikant. Die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib reduzierte die Zellfläche geringfügig (Mann-Whitney Rank Sum Test).

4.2.5.4 Die Expression des kardialen Hypertrophie-Markergens β -MHC wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst

Hypertrophierte Kardiomyozyten von Ratten weisen ein Genexpressionsmuster auf, das dem von fetalen Kardiomyozyten ähnelt. Bei einer kardialen Hypertrophie der Ratte lässt sich in den Ventrikeln eine erhöhte Expression von *β -myosin heavy chain* (β -MHC), einer Isoform des kontraktilen Proteins Myosin, nachweisen (Izumo, 1987).

Dahl Salz-sensitive Ratten (Kontroll-Gruppe) wurden in dem ersten Versuch über acht Wochen mit einer Salzdiät gefüttert (Placebo- und Bortezomib-Gruppe) und mit dem Proteasominhibitor Bortezomib behandelt. Die salzgefütterten Tiere entwickelten eine Hypertonie-induzierte kardiale Hypertrophie und Fibrose. Die relative mRNA Expression der Myosin-Isoform β -MHC von hypertrophen Dahl Salz-sensitiven Ratten der Placebo-Gruppe in dem ersten Versuch war im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant um ca. 75 % gesteigert (siehe Abbildung 17). Des Weiteren gab es keine signifikanten mRNA Expressionsunterschiede zwischen den Placebo- und Bortezomib-behandelten Ratten.

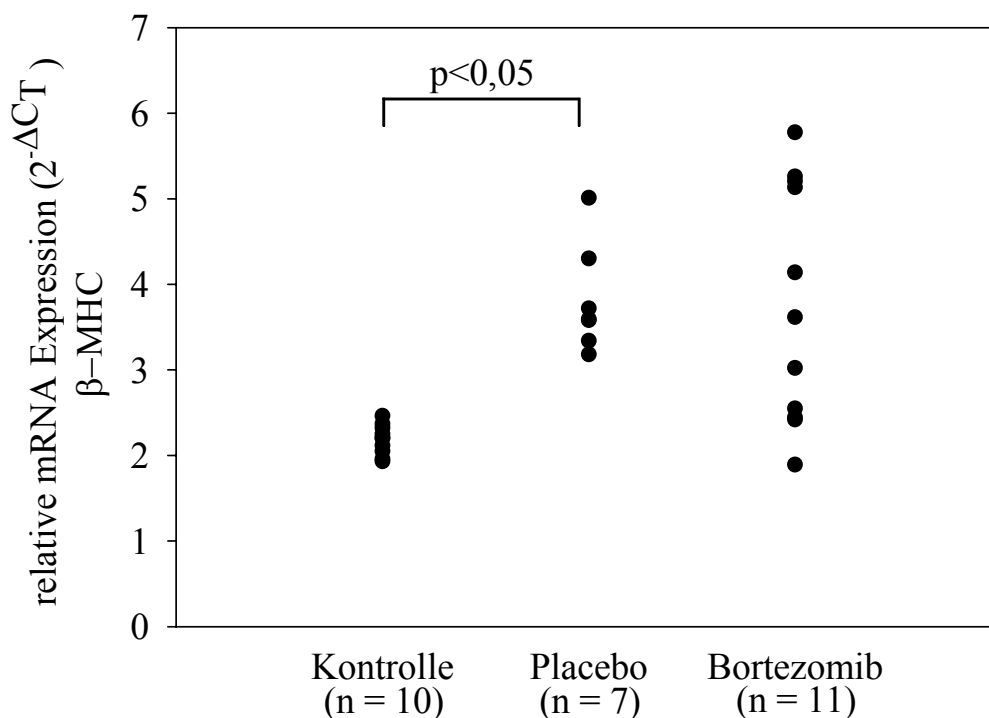


Abbildung 17: Die Untersuchung der relativen mRNA-Expression des kardialen Hypertrophie-Markergens β -MHC ließ signifikante Unterschiede zwischen den salzgefütterten hypertrophen DSSR der Placebo-Gruppe und den Kontrolltieren erkennen. Ein signifikanter Einfluss der Bortezomib-Behandlung ließ sich nicht nachweisen (quantitative Real-Time-RT-PCR; Mann-Whitney Rank Sum Test).

4.2.5.5 Das reduzierte Herzgewicht war mit einem tendenziell reduzierten Kollagenanteil assoziiert

Die Hypertonie-induzierte kardiale Hypertrophie geht mit einer Fibrosierung des Herzens einher. Für die quantitative Erfassung des Kollagenanteils in der freien Wand des linken Ventrikels salzgefütterter Dahl Salz-sensitiver Ratten (erster Versuch) erfolgte eine Azanfärbung (siehe Abbildung 18). Anschließend wurde in allen Sichtfeldern der Anteil der blaugefärbten Kollagene (interstitiell und perivaskulär) im Verhältnis zu der Gesamtfläche mit Hilfe einer Software berechnet. Für diese histologische Untersuchung standen in der Kontrollgruppe zehn, in der Placebogruppe sieben und in der Bortezomibgruppe neun Ratten zur Verfügung.

Die Ratten der Placebo-Gruppe des ersten Versuchs wiesen nach Fütterung einer salzhaltigen Diät über acht Wochen einen signifikant höheren Kollagenanteil (in % der Gesamtfläche; MW \pm SD) in der freien Wand des linken Ventrikels auf (siehe Abbildung 19). Er erhöhte sich um 43 % von 2,23 % \pm 0,62 % auf 3,20 % \pm 0,64 %. Die gleichzeitige Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib reduzierte die Zunahme des Kollagenanteils in der freien Wand des linken Ventrikels im Vergleich zu den Placebo-Tieren um 18 % auf 2,61 % \pm 0,62 %, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau.

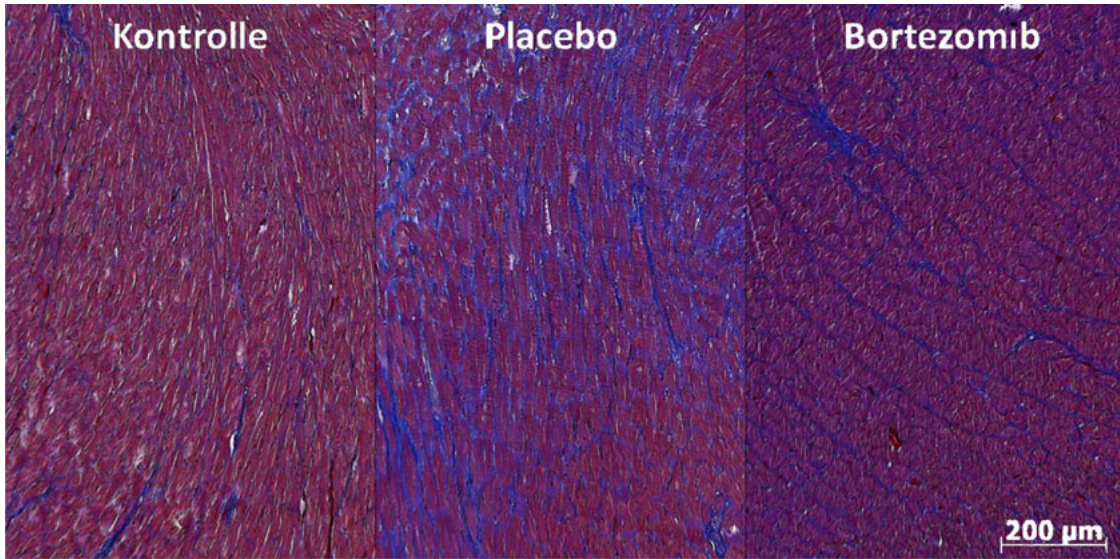


Abbildung 18: Die salzinduzierte Hypertonie von DSSR der Placebo- und Bortezomibgruppe resultierte nach acht Wochen in einer Fibrosierung des Herzgewebes, die bei den mit Bortezomib behandelten Ratten weniger deutlich ausgeprägt war. Dargestellt sind beispielhafte, 10-fach vergrößerte azangefärbte Gewebeschnitte von den linken Ventrikeln der Ratten. Die Myozyten sind rot-violett angefärbt, das Kollagen blau.

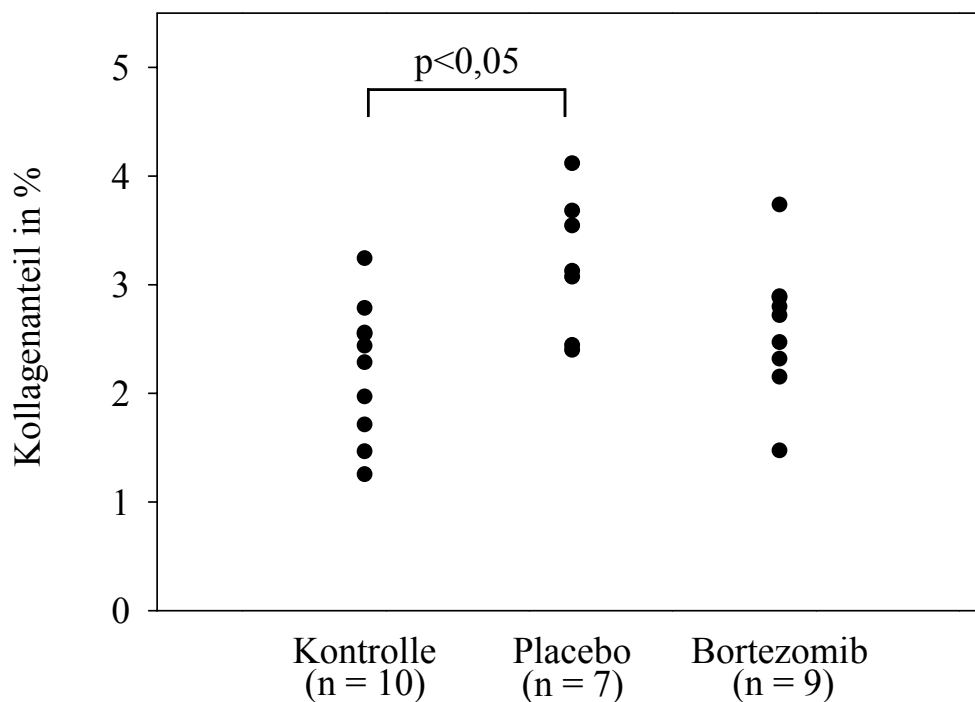


Abbildung 19: DSSR der Placebo- und Bortezomibgruppe wurden über acht Wochen mit einer Salzdiät gefüttert. Die daraufhin induzierte Hypertonie führte zu der Entwicklung einer kardialen Fibrose, die sich histologisch anhand des erhöhten Kollagenanteils in der freien Wand des linken Ventrikels nachweisen ließ. Im Vergleich zu den Placebo-Ratten wiesen die mit Bortezomib behandelten DSSR einen tendenziell reduzierten Kollagenanteil auf (t-Test).

4.2.5.6 Die Expression des kardialen Fibrose-Markergens Col IIIa1 wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst

Die Fibrosierung eines hypertrophierten Herzens kann molekularbiologisch durch eine erhöhte Genexpression von Kollagen, Typ III (a1) (COL3A1), nachgewiesen werden.

Kollagen, Typ III (a1), ein Markergen der kardialen Fibrose, wurde in den Herzen der Ratten der Placebo-Gruppe des ersten Versuchs im Vergleich zu denen der Kontrolltiere vermehrt exprimiert (siehe Abbildung 20). Die Erhöhung der relativen mRNA Expression um ca. 58 % erreichte das Signifikanzniveau. Unterschiede zwischen den Placebo-Ratten und den mit Bortezomib behandelten Tieren konnten nicht festgestellt werden.

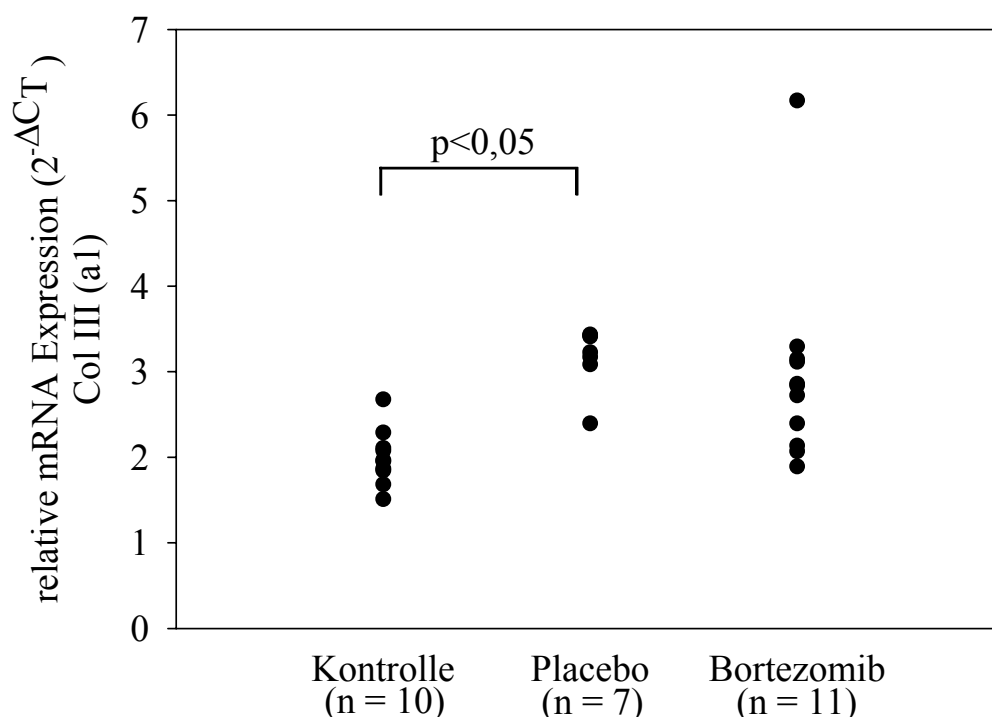


Abbildung 20: In mit Salz gefütterten Dahl Salz-sensitiven Ratten der Placebo-Gruppe ließ sich nach acht Wochen eine signifikant höhere Expression des Fibrose-Markergens Kollagen, Typ III (a1), im Vergleich zu den Kontrolltieren nachweisen. Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib ließ keinen Einfluss auf die Genexpression erkennen (quantitative Real-Time-RT-PCR; Mann-Whitney Rank Sum Test).

4.2.6 Einfluss des niedrig-dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf das Gefäßsystem Dahl Salz-sensitiver Ratten

Männliche Dahl Salz-sensitive Ratten (Kontrolle) wurden über acht bzw. siebeneinhalb Wochen mit einer Salzdiät gefüttert (Placebo) und mit dem Proteasominhibitor Bortezomib behandelt. Für den Nachweis einer Hypertonie-Entwicklung und zu der Untersuchung des Einflusses von Bortezomib wurde der systolische Blutdruck der Tiere untersucht. Des Weiteren erfolgten aufgrund der in dem ersten Versuch festgestellten Blutdruckunterschiede eine Untersuchung der Endothelfunktion isolierter Aorten und die Analyse der Genexpressionen der eNOS, des ET-1 und des VCAM-1.

4.2.6.1 Bortezomib verringerte den arteriellen Blutdruck in hypertensiven DSSR

Für den Nachweis einer Hypertonie-Entwicklung in Dahl Salz-sensitiven Ratten unter Salzdiät wurden Messungen des systolischen arteriellen Blutdruckes (SAB) in der ersten, fünften und siebten Versuchswoche, in dem zweiten Versuch zusätzlich in der dritten Versuchswoche durchgeführt. Dies erfolgte mit Hilfe der nicht-invasiven Schwanzmanschetten-Methode am wachen Tier. Pro Tier wurden drei Messungen durchgeführt, deren Ergebnisse gemittelt wurden.

In der ersten Woche des ersten Versuchs wiesen die drei Versuchsgruppen einen sich signifikant nicht unterscheidenden systolischen Blutdruck von durchschnittlich ca. 131 mmHg auf (siehe Tabelle 6). Bis zu der nächsten Messung in der fünften Woche stieg der Blutdruck in allen drei Gruppen progredient an, jedoch nicht auf das gleiche Niveau. Zwischen der fünften und siebten Versuchswoche entwickelten die Ratten in den beiden Salzdiät-Gruppen eine noch deutlichere Hypertonie.

In dem zweiten Versuch wurde eine zusätzliche Messung in der dritten Versuchswoche durchgeführt (siehe Tabelle 6). Deren Ergebnisse machten deutlich, dass der Blutdruck in allen drei Versuchsgruppen schon in den ersten Wochen deutlich stieg. Die Messungen in der fünften Versuchswoche ergaben einen weiteren Anstieg des SAB in den Tieren der beiden Salzdiät-Gruppen. Die Ratten, die eine Standarddiät erhielten, erreichten ab der dritten Woche ein Plateau. Dieser Effekt konnte in dem ersten Versuch nicht beobachtet werden. Bis zu der siebten Woche stieg der systolische Blutdruck der Placebo-Tiere wie auch in dem ersten Versuch weiter an. Dieser Effekt konnte bei den Tieren, die Bortezomib erhielten, nicht mehr beobachtet werden.

Tabelle 6: DSSR der Placebo- und Bortezomibgruppe wurden über acht (erster Versuch) bzw. siebeneinhalb Wochen (zweiter Versuch) mit einer Salzdiät gefüttert. Die daraufhin induzierte arterielle Hypertonie wurde in der ersten, dritten, fünften und siebten Woche kontrolliert. Aufgeführt sind die Messwerte des systolischen arteriellen Blutdruckes (SAB) (V = Versuch; Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen in mmHg).

	Kontrolle		Placebo		Bortezomib	
	V 1 (n = 10)	V 2 (n = 11)	V 1 (n = 7)	V 2 (n = 9)	V 1 (n = 11)	V 2 (n = 10)
1. Woche	133,1 ± 1,6	133,4 ± 9,3	133,7 ± 1,2	135,7 ± 6,5	127,2 ± 4,7	135,4 ± 6,9
3. Woche		165,1 ± 8,5		183,7 ± 12,6		177,0 ± 11,4
5. Woche	156,7 ± 11,3	164,7 ± 16,7	180,4 ± 6,8	194,5 ± 19,9	170,4 ± 17,1	197,6 ± 18,8
7. Woche	171,7 ± 8,4	158,3 ± 9,2	199,3 ± 14,0	207,4 ± 14,6	193,2 ± 7,8	191,9 ± 15,9

Die Blutdruck-Messungen in der siebten Versuchswoche des ersten Versuchs ergaben in der Bortezomib-Gruppe (193,2 mmHg \pm 7,8 mmHg) tendenziell geringere Werte als in der Placebo-Gruppe (199,3 mmHg \pm 14,0 mmHg) (siehe Abbildung 21 A). Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nicht. Die Hypertonie der Tiere, die ein Standardfutter erhielten, war deutlich weniger ausgeprägt (171,7 mmHg \pm 8,4 mmHg). Ihr systolischer Blutdruck unterschied sich signifikant von dem der Tiere der beiden Salzdiät-Gruppen.

Die Messungen in der siebten Versuchswoche des zweiten Versuchs ergaben in der Bortezomib-Gruppe (191,9 mmHg \pm 15,9 mmHg) - im Gegensatz zu dem ersten Versuch - signifikant geringere Blutdruckwerte als in der Placebo-Gruppe (207,4 mmHg \pm 14,6 mmHg) (siehe Abbildung 21 B). Wie auch in dem ersten Versuch, war die Hypertonie der Kontrolltiere (158,3 mmHg \pm 9,2 mmHg) signifikant geringer ausgeprägt, als bei den Ratten der beiden Salzdiät-Gruppen.

4.2.6.2 Der Proteasominhibitor verbesserte die beeinträchtigte Vasoreaktivität hypertensiver DSSR tendenziell

Dahl Salz-sensitive Ratten entwickeln unter einer Salzdiät innerhalb weniger Wochen eine endotheliale Dysfunktion. Sie zeichnet sich unter anderem durch eine veränderte Vasoreaktivität aus, insbesondere durch eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation. Diese kann durch die Applikation von Acetylcholin, das über eine Stimulation der endothelialen NO-Synthase in gesunden Gefäßen relaxierend wirkt, untersucht werden. Für den Nachweis einer verminderten Vasoreaktivität wurden die isolierten Aorten der DSSR des zweiten Versuchs hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Vasodilatation nach Gabe von Acetylcholin untersucht. Außerdem erfolgte eine Untersuchung der Kontraktionsfähigkeit nach Applikation von Endothelin-1. Dieses induziert über den ET_A-Rezeptor eine intrazelluläre Kalziumerhöhung und dadurch eine Vasokonstriktion. Für die Untersuchung der Vasoreaktivität standen in der Kontrollgruppe zehn, in der Placebogruppe acht und in der Bortezomibgruppe zehn Ratten zur Verfügung.

Die Fütterung einer Salzdiät führte bei den Tieren der Placebo- und Bortezomib-Gruppe zu einer verminderten endothelialen Vasoreaktivität (siehe Abbildung 22). Die Behandlung isolierter Aortenringe mit dem α_1 -Agonisten Phenylephrin induzierte eine Kontraktion, die bei den salzgefütterten Ratten deutlich weniger ausgeprägt war, als bei den Tieren der Kontroll-Gruppe. Die Aortenringe der Placebo- und Bortezomib-Tiere erreichten nur 64 % bzw. 69 % der Kontraktionskraft, die die Aortenringe der Kontrolltiere entwickelten. Die kumulative Gabe des Vasodilatators Acetylcholin führte zu einer Relaxation aller Aortenringe, allerdings im unterschiedlichen Ausmaß. Die Relaxation der Kontrolltiere war wiederum sehr deutlich ausgeprägt, während die Aorten der mit Salz gefütterten Ratten einen deutlich flacheren Verlauf der Dilatationskurve aufwiesen. Dies war bei den Placebo-Tieren auffälliger. Mit den letzten beiden Acetylcholingaben erreichten alle drei Gruppen in etwa das gleiche Dilatationsniveau. Allerdings muss man dabei beachten, dass die beiden salzgefütterten Gruppen auch eine geringere Kontraktionskraft entwickelten und deshalb insgesamt weniger relaxierten.

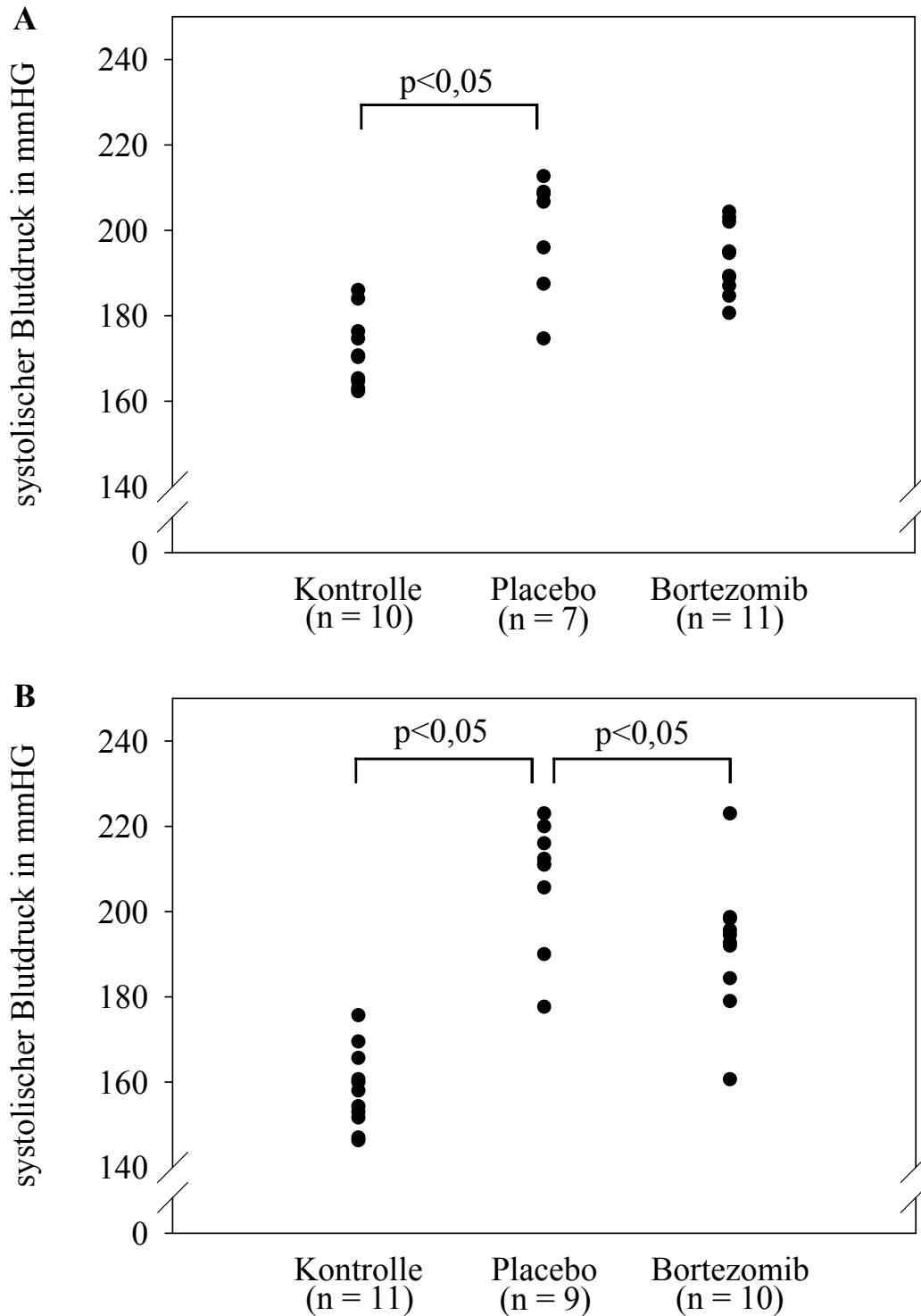


Abbildung 21: Dargestellt sind die systolischen Blutdruckwerte in der siebten Woche des ersten (A) bzw. zweiten (B) Versuchs. Die Fütterung einer Salzdiät führte bei DSSR zu einer signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks in der Placebo- und Bortezomib-Gruppe. Die zeitgleiche niedrig dosierte Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib reduzierte den Blutdruck in dem ersten Versuch tendenziell, in dem zweiten Versuch signifikant (t-Test).

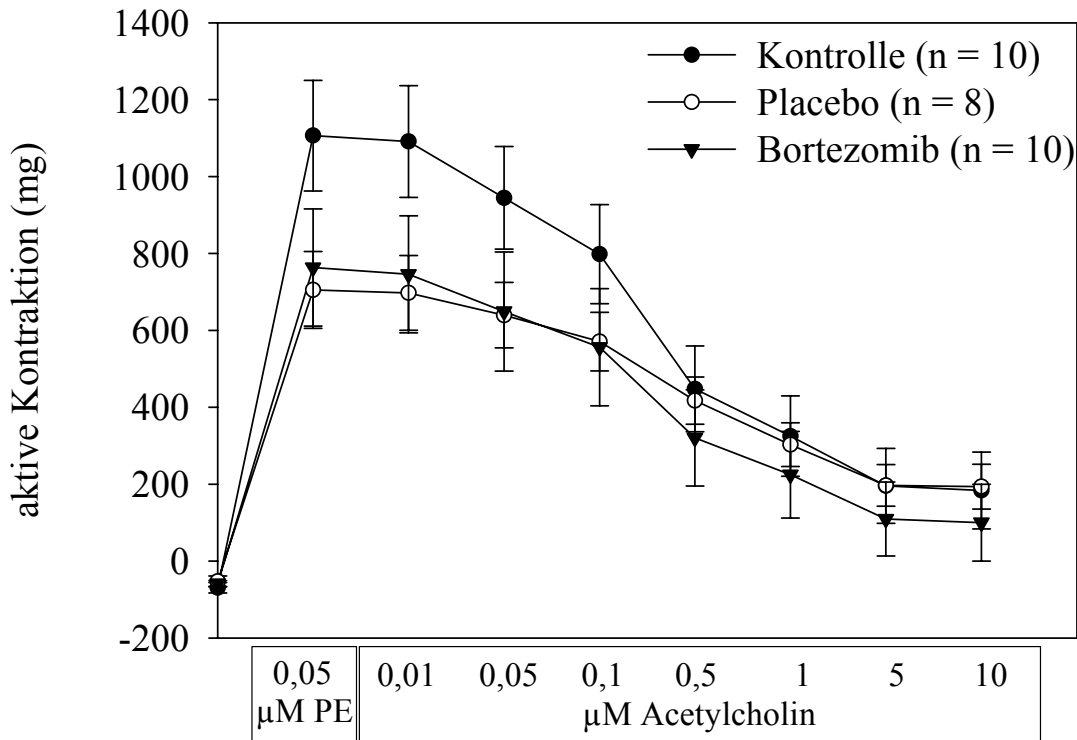


Abbildung 22: Mit Salz gefütterte Dahl Salz-sensitive Ratten der Placebo- und Bortezomib-Gruppe wiesen nach siebeneinhalb Wochen eine verminderte endotheliale Vasoreaktivität auf. Ihre Aorten kontrahierten nach der Gabe des α_1 -Agonisten Phenylephrin (PE) im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich weniger. Aufgrund dessen zeigten diese Aortenringe auch eine abgeflachte Dilationskurve in Reaktion auf Acetylcholin. Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib verbesserte die endotheliale Vasoreaktivität geringfügig (je Tier wurden zwei Ringe untersucht und deren Ergebnisse gemittelt; dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der verschiedenen Gruppen; t-Test).

Zusätzlich zu der Untersuchung der Acetylcholin-induzierten endothelabhängigen Vasodilatation wurde die Reaktion der Rattenaorten auf den Vasokonstriktor ET-1 analysiert (siehe Abbildung 23). Die isolierten Aorten der mit Salz gefütterten Tiere in der Placebo- und Bortezomib-Gruppe zeigten eine signifikant geringe Kontraktion in Antwort auf kumulative Gaben von Endothelin-1. Mit Gabe der höchsten Konzentration entwickelten die Aortenringe der Placebo-Gruppe lediglich 55 % der Kontraktionskraft, die die Kontroll-aorten entwickelten. Die Aorten der Bortezomib-behandelten Ratten entwickelten 70 % der Kontraktionskraft. Der Unterschied zwischen den Placebo- und Bortezomib-Ratten erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Diese unterschiedliche Kontraktionsfähigkeit zeigten die Aortenringe auch nach Gabe von Kaliumchlorid (Daten nicht gezeigt).

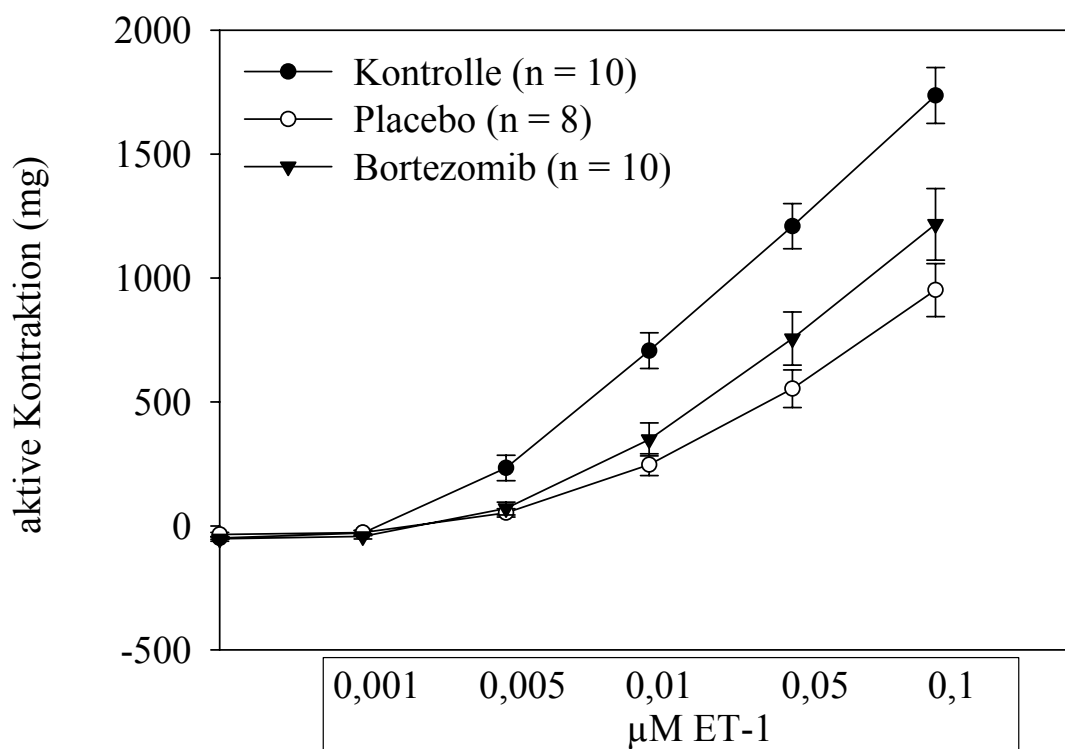


Abbildung 23: Aortenringe von salzgefütterten DSSR der Placebo- und Bortezomib-Gruppe zeigten nach siebeneinhalb Wochen eine signifikant verminderte vaskuläre Kontraktion in Antwort auf kumulative Gaben von Endothelin-1. Die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor verbesserte die Kontraktionsfähigkeit tendenziell, aber nicht signifikant (je Tier wurden zwei Ringe untersucht und deren Ergebnisse gemittelt; dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der verschiedenen Gruppen; t-Test).

4.2.6.3 Die Expression der eNOS in der Aorta wurde durch Bortezomib nicht beeinflusst

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wird in Endothelzellen exprimiert und katalysiert die Biosynthese von Stickstoffmonoxid, das die glatten Muskelzellen von Gefäßen relaxiert. Dadurch kann es zu einer Senkung des Blutdrucks beitragen.

Männliche Dahl Salz-sensitive Ratten wurden in dem ersten Versuch über acht Wochen mit einer Salzdiät gefüttert und entwickelten dadurch eine Hypertonie. Die Untersuchung der relativen mRNA Expression der eNOS in der Aorta ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Versuchsgruppen erkennen (siehe Abbildung 24).

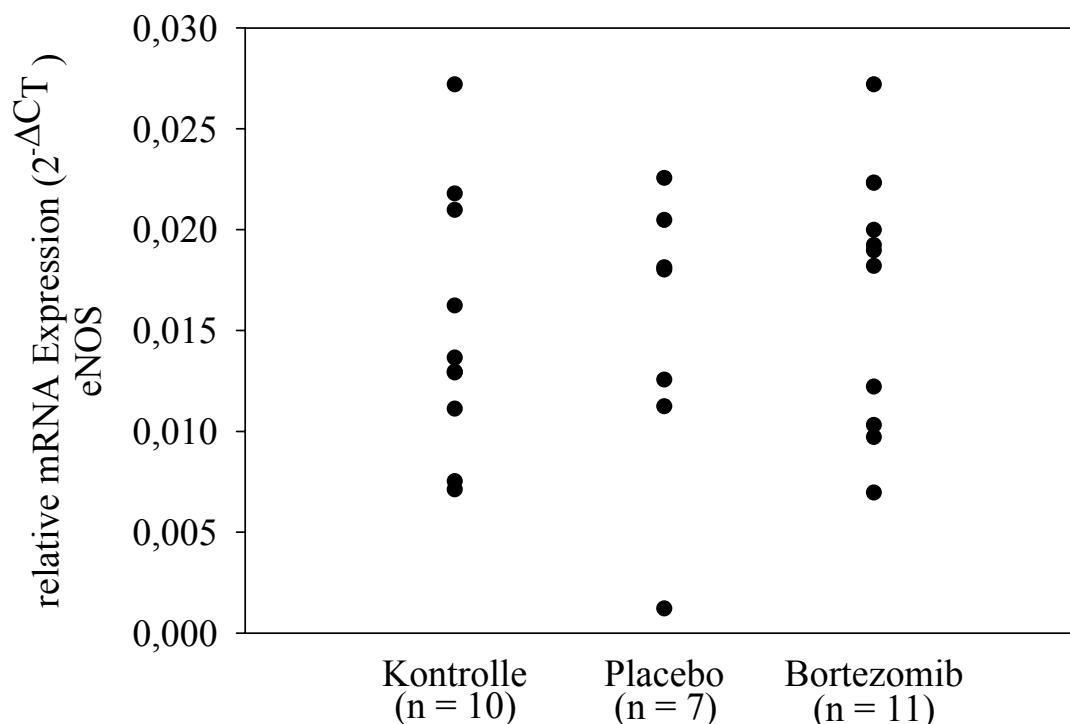


Abbildung 24: Hypertensive DSSR der Placebo- und Bortezomib-Gruppe zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede in der relativen mRNA Expression der eNOS in der Aorta nach acht Wochen Salzfütterung. Die Behandlung mit Bortezomib ließ im Vergleich zu den Placebo-Ratten keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression erkennen (quantitative Real-Time-RT-PCR; t-Test).

4.2.6.4 Der reduzierte arterielle Blutdruck Bortezomib-behandelter DSSR war mit einer tendenziell verringerten Expression von ET-1 in der Aorta assoziiert

Die erhöhte Produktion des Vasokonstriktors Endothelin-1 (ET-1) wird für die Entwicklung einer Hypertonie in Dahl Salz-sensitiven Ratten unter Salzdiät mitverantwortlich gemacht (Barton, 1998).

Die relative mRNA Expression des ET-1 wurde in den Aorten der Ratten des ersten Versuchs untersucht (siehe Abbildung 25). Die fast dreifache Erhöhung der Expression von Endothelin-1 in den Aorten der Placebo-Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren erreichte nicht das Signifikanzniveau. Die Behandlung der DSSR mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib reduzierte die relative mRNA Expression von ET-1 um ca. 40 %, erreichte aber ebenso wenig das Signifikanzniveau.

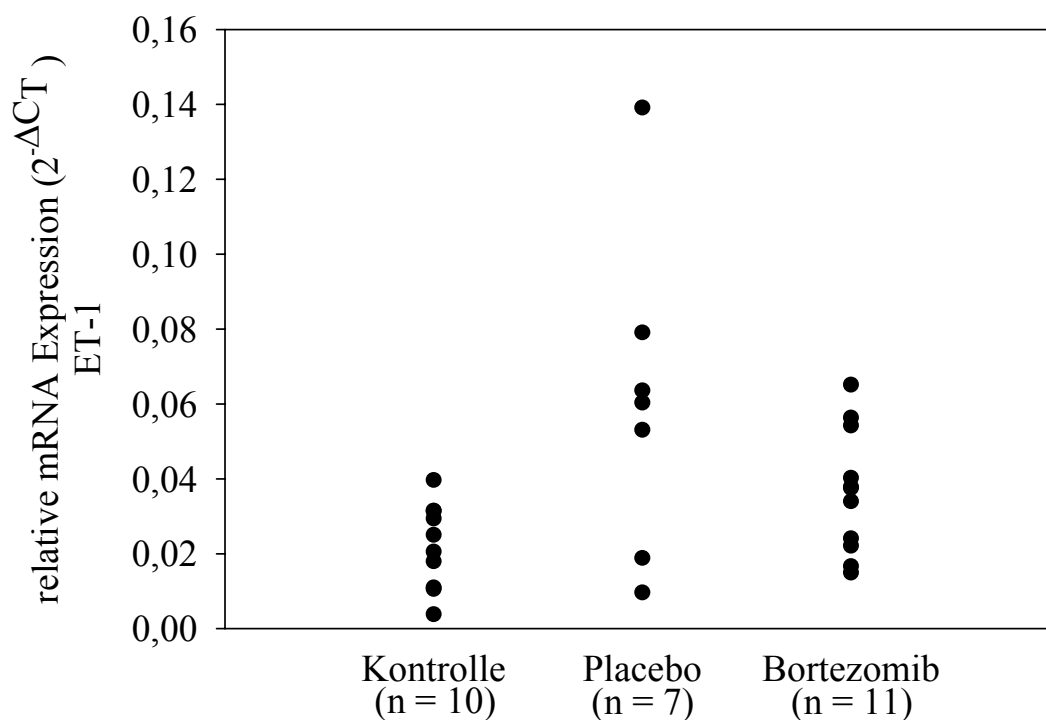


Abbildung 25: Die relative mRNA Expression des Vasokonstriktors Endothelin-1 wurde in den Aorten von Placebo-DSSR unter achttwöchiger Salzdiät im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell, aber nicht signifikant erhöht. Die Behandlung mit niedrig dosiertem Bortezomib reduzierte die Expression im Vergleich zu den Placebo-Tieren geringfügig, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau (quantitative Real-Time-RT-PCR; Mann-Whitney Rank Sum Test).

4.2.6.5 Bortezomib reduzierte die Expression des inflammatorischen Markers VCAM-1 in der Aorta hypertensiver Ratten

Das Adhäsionsmolekül *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) wird vor allem von Endothelzellen exprimiert und vermittelt die Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten während inflammatorischer Prozesse (Osborn, 1989). Diese wiederum sind in die Entwicklung und Pathogenese der Hypertonie involviert (Savoia, 2006) (Marchesi, 2008). Der Hypertonie-induzierte Anstieg der VCAM-1 Expression in der Aorta von Dahl Salz-sensitiven Ratten wurde bereits nachgewiesen (Ichihara, 2006 b). Für die Untersuchung der Genexpression von VCAM-1 standen in der Kontrollgruppe neun, in der Placebogruppe fünf und in der Bortezomibgruppe zehn Ratten zur Verfügung.

Die relative mRNA Expression des VCAM-1 wurde in den Aorten der Ratten des ersten Versuchs untersucht. Dabei konnte in den Aorten der Placebo-Tiere ein signifikanter Anstieg der VCAM-1 Expression um ca. 236 % verzeichnet werden (siehe Abbildung 26). Die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib konnte die relative mRNA Expression von VCAM-1 im Vergleich zu den Placebo-Ratten signifikant um ca. 68 % reduzieren.

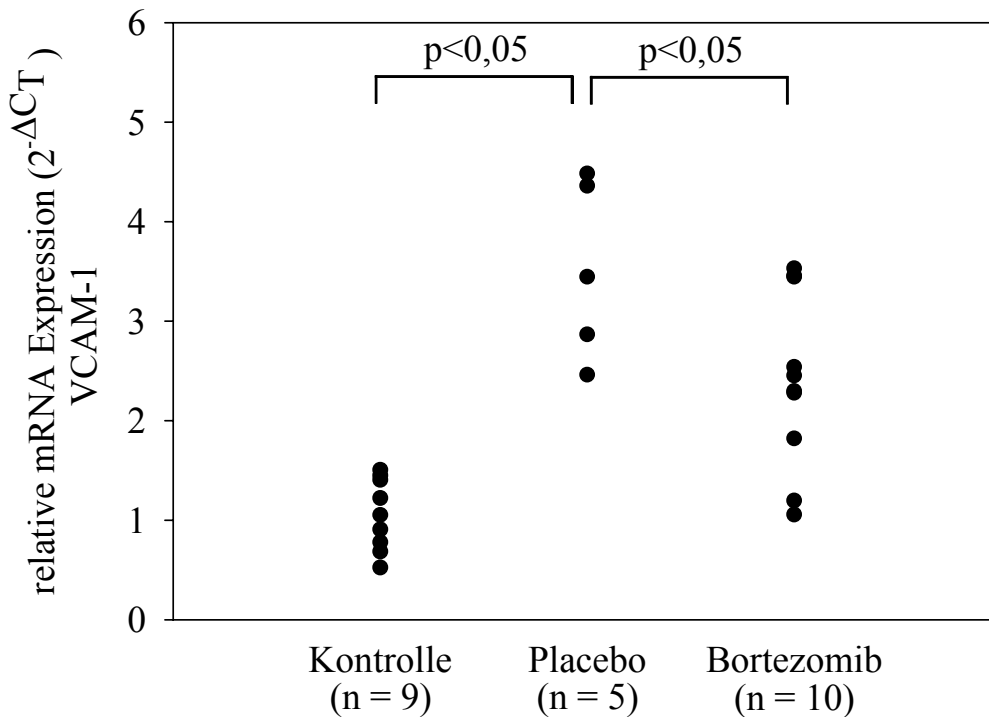


Abbildung 26: Die relative mRNA Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 wurde in den Aorten von Dahl Salz-sensitiven Ratten untersucht. Bei den salzgefütterten Placebo-Tieren konnte nach acht Wochen eine signifikante Hypertonie-induzierte Erhöhung der VCAM-1 Expression im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib reduzierte die Genexpression im Vergleich zu den Placebo-Ratten signifikant (quantitative Real-Time-RT-PCR; t-Test).

4.2.7 Die Behandlung hypertensiver DSSR mit Bortezomib induzierte keine hämatologischen oder hämatopoetischen Nebenwirkungen

Der Proteasominhibitor Bortezomib wurde männlichen DSSR in dem ersten Versuch über einen Zeitraum von acht Wochen zweimal wöchentlich intraperitoneal injiziert (50 µg/kg Körpergewicht). Um Nebenwirkungen infolge der Behandlung mit dem niedrig dosierten Bortezomib auszuschließen, wurde von jedem Tier bei Versuchsende ein großes Blutbild angefertigt. Außerdem erfolgte eine histopathologische Untersuchung von Knochenmarkbiopsien.

Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen sind in Tabelle 7 aufgeführt (MW ± SD). Die Analyse der Parameter des roten Blutbildes erbrachte Ergebnisse, die in allen drei Versuchsgruppen in dem Referenzbereich lagen und sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Lediglich der Hämoglobinwert der Placebo-Gruppe (10,6 g/dl ± 3,2 g/dl) war signifikant niedriger als der der Kontroll-Gruppe (13,9 g/dl ± 1,8 g/dl).

Innerhalb des weißen Blutbildes gab es keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, die das Signifikanzniveau erreichten. Allerdings lagen nicht alle Ergebnisse innerhalb des Referenzbereichs. Die Tiere der Kontroll-Gruppe wiesen eine Leukozytopenie bei

gleichzeitiger Eosinophilie auf. In allen Versuchsgruppen trat eine Neutrophilie (Rechtsverschiebung) und Lymphozytopenie auf.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es bezüglich des Blutbildes keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ratten der Bortezomib- und Placebo-Gruppe gab. Die niedrig dosierte Behandlung mit dem Proteasominhibitor verursachte folglich keine hämatologischen Nebenwirkungen.

Die Untersuchung der Knochenmarkbiopsien erfolgte durch ein kommerzielles Labor (VetMedLab, Ludwigsburg). Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ausgemacht. Es gab bei keinem Tier Hinweise auf eine dysplastische hämatopoetische Proliferation. Die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib verursachte folglich auch keine hämatopoetischen Nebenwirkungen.

Tabelle 7: DSSR (Kontrolle) wurden über acht Wochen mit einer Salzdiät gefüttert und mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib oder Kochsalzlösung (Placebo) behandelt. Aufgeführt sind die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen am Ende des ersten Versuchs (Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen; **: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; †: t-Test, ††: Mann-Whitney Rank Sum Test; Referenzbereiche des VetMedLab Ludwigsburg für Ratten)

	Kontrolle (n = 10)	Placebo (n = 5)	Bortezomib (n = 9)	Referenz- bereich
Hämatokrit (%), †	42,2 ± 5,3	34,0 ± 11,5	37,1 ± 11,2	32,7 – 44,8
Erythrozyten (T/l), ††	7,6 ± 0,8	5,6 ± 2,0	6,2 ± 1,9	5,5 – 9,3
Hämoglobin (g/dl), †	13,9 ± 1,8	10,6 ± 3,2 **	11,5 ± 3,6	10,6 – 15,6
Thrombozyten (G/l), †	794 ± 287	899 ± 167	779 ± 280	493 – 1124
Leukozyten (G/l), †	2,7 ± 0,8	5,8 ± 3,9	4,9 ± 2,4	3,3 – 8,7
Basophile (%), †	0,2 ± 0,4	0 ± 0	0,3 ± 0,5	0 - 1
Eosinophile (%), †	5,8 ± 3,8	3,0 ± 1,7	3,3 ± 3,1	0 – 5
Neutrophile (%), †	31,3 ± 18,5	34,0 ± 5,9	37,3 ± 18,4	3,3 – 26,6
Lymphozyten (%), ††	61,2 ± 22,4	60,3 ± 5,8	55,2 ± 20,8	68,6 – 94,5
Monozyten (%), †	1,2 ± 0,9	2,2 ± 1,3	2,0 ± 0,9	0 – 4,1

5 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten *In-vitro*-Untersuchungen in dem Zellkulturmodell der neonatalen Rattenkardiomyozyten ergaben, dass der Proteasominhibitor Bortezomib die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms deutlich, aber nur partiell hemmte. Dies war mit einer dosisabhängigen Supprimierung der Isoproterenol-induzierten Hypertrophie der Kardiomyozyten assoziiert. Die Zellfläche und die mRNA-Expressionen kardialer Hypertrophie-Markergene wurden deutlich reduziert, während kein Einfluss auf die Zellviabilität beobachtet werden konnte. Damit konnte der Beweis erbracht werden, dass der Proteasominhibitor Bortezomib in neonatalen Rattenkardiomyozyten ähnliche anti-hypertrophe Eigenschaften aufweist, wie die Proteasominhibitoren MG132 und MG262 (Dreger, 2003).

In den anschließenden *In-vivo*-Untersuchungen wurden anti-hypertrophe Effekte des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib in einer Druck-induzierten kardialen Hypertrophie festgestellt. In dem Tiermodell der Dahl Salz-sensitiven Ratte (DSSR) wurden zwei aufeinanderfolgende Versuche durchgeführt, in denen eine Salzfütterung über acht bzw. siebeneinhalb Wochen erfolgte. Der erste Versuch diente der Validierung des Modells und der Untersuchung kardialer Effekte von Bortezomib. Hier konnte Bortezomib das absolute und relative Herzgewicht im Trend reduzieren. Dieser anti-hypertrophe Effekt des Proteasominhibitors war mit tendenziell reduzierten Kardiomyozyten-Querschnittsflächen und Kollagenanteilen in dem linken Ventrikel assoziiert. Ein Einfluss auf die Hypertrophie- bzw. Fibrose-Markergene β -MHC und Col III (a1) konnte nicht beobachtet werden. Des Weiteren wurde bei der Überprüfung der salzinduzierten Hypertonie-Entwicklung in den DSSR eine tendenzielle Reduzierung des arteriellen Blutdrucks festgestellt. Um mögliche zugrunde liegende Mechanismen aufzudecken, wurden mRNA-Expressionsanalysen von eNOS, ET-1 und VCAM-1 durchgeführt. Dabei wurde eine tendenzielle Reduzierung der ET-1 Expression in den Aorten der mit Bortezomib behandelten Ratten aufgezeigt, während die Expression der eNOS nicht beeinflusst wurde. Die mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1, einem Marker der endothelialen Aktivierung im Zuge inflammatorischer Geschehnisse, wurde durch Bortezomib signifikant reduziert.

Aufgrund der erhöhten Morbidität und Mortalität der Placebo-behandelten Tiere in der letzten der acht Versuchswochen wurde ein zweiter Versuch schon nach siebeneinhalb Wochen beendet. Diese geringe Reduzierung der Versuchsdauer resultierte in einer Verringerung der Ausfälle in der mit dem Placebo behandelten Versuchsgruppe und damit in einer höheren auswertbaren Tierzahl. Hier konnte eine signifikante Reduzierung der arteriellen Hypertonie und kardialen Hypertrophie (Herzgewicht/Tibiallänge) nachgewiesen werden (Meiners, 2008 a). Eine positive Korrelation zwischen dem Blutdruck und dem Hypertrophie-Parameter Herzgewicht/Tibiallänge bestand in den einzelnen Tieren jedoch nicht, so dass von einer blutdruckunabhängigen Wirkung des Proteasominhibitors auf die kardiale Hypertrophie ausgegangen werden konnte. Außerdem erfolgte in dem zweiten Versuch eine Untersuchung der Aorten-Vasoreaktivität um die vaskulären Effekte von

Bortezomib weiter zu analysieren. Dabei konnte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Verbesserung der infolge der Salzfütterung beeinträchtigten Vasoreaktivität durch Bortezomib festgestellt werden.

Eine partielle Hemmung des Proteasoms (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms) durch Bortezomib in den Lymphozyten und im Herzen konnte auch 24 Stunden nach der letzten Injektion noch beobachtet werden.

Die Summe der protektiven kardiovaskulären Effekte in den mit Bortezomib behandelten DSSR war insbesondere in dem ersten Versuch mit einem verbesserten Allgemeinbefinden, erhöhten Körpergewicht und verringerter Mortalität assoziiert. Hämatologische und hämatopoetische Nebeneffekte des niedrig dosierten Proteasominhibitors konnten nicht beobachtet werden.

5.1 Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf hypertrophierte neonatale Rattenkardiomyozyten

5.1.1 Bortezomib inhibierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in nRC ohne zytotoxische Nebeneffekte

Der Proteasominhibitor Bortezomib hemmt unter physiologischen Bedingungen vorzugsweise die Chymotrypsin-ähnliche (ChTL) Aktivität des Proteasoms (Berkers, 2005), so dass die Quantifizierung dieser Aktivität herangezogen wurde, um die proteasomale Inhibition durch Bortezomib in Isoproterenol-stimulierten nRC nachzuweisen. Unter Verwendung fluorogener Substrate konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal beobachtet werden, dass die 48-stündige Behandlung der nRC mit 5 – 10 nM Bortezomib die ChTL Aktivität um etwa die Hälfte reduzierte (siehe 4.1.1).

Des Weiteren wurde der Einfluss der partiellen Proteasominhibition auf die Zellviabilität mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung der Isoproterenol-stimulierten nRC untersucht. Dabei konnte eine leichte Dosisabhängigkeit beobachtet werden. Während die geringste Bortezomib-Dosierung (5 nM) die Zellviabilität nicht beeinflusste, konnte mit steigender Dosierung eine geringfügige Beeinträchtigung der Zellviabilität beobachtet werden (siehe 4.1.4). Auch der Proteasominhibitor MG132, der in der verwendeten Dosierung von 50 nM das Proteasom ebenfalls nur partiell hemmte, ließ in dieser wie auch schon in früheren Untersuchungen (Dreger, 2003) keine Zytotoxizität erkennen.

Anzumerken ist jedoch, dass der proteasomale Proteinabbau durch höhere Dosierungen der beiden verwendeten Proteasominhibitoren stärker gehemmt werden kann und dann auch deutliche zytotoxische Effekte induziert werden (Meiners, 2006). Dabei sind die Auswirkungen einer Proteasominhibition auf die Zellviabilität nicht nur von der Dosis des Inhibitors und damit dem Ausmaß der Hemmung abhängig, sondern auch von dem Zelltyp und dem Proliferationsstadium. Generell reagieren nicht-transformierte Zellen, vor allem nicht-proliferierende Zellen, weniger sensitiv auf eine Hemmung des Proteasoms als maligne

Zellen (Kisselev, 2001; Adams, 2004). So induzierten ähnliche und niedrigere Dosierungen von Bortezomib in diversen Zellkulturmodellen maligner Zellen eine höhere Zytotoxizität, als sie hier beobachtet werden konnte (Ling, 2003; Adams, 2004; Kelley, 2004). Für die Induktion der Apoptose in nicht-transformierten Zellen sind höhere Dosierungen des Proteasominhibitors Bortezomib notwendig (Ying, 2007; Arpinati, 2009).

5.1.2 Der Proteasominhibitor Bortezomib wirkte in nRC anti-hypertroph

Hypertrophierte Kardiomyozyten zeichnen sich vor allem durch eine Zunahme der Zellgröße und durch charakteristische Veränderungen der Genexpression aus. Um den Nachweis zu erbringen, dass der Proteasominhibitor Bortezomib anti-hypertrophe Eigenschaften aufweist, wurden diese Kennzeichen der Hypertrophie in Isoproterenol-stimulierten nRC untersucht (siehe 4.1.2 und 4.1.3).

Im Rahmen dieser Arbeit induzierte das β -adrenerge Isoproterenol ein hypertrophes Wachstum der nRC mit einer Zunahme der Zellfläche um ca. 50 %. Diese Ergebnisse ähneln denen von Dreger sowie Liao *et al.*, die unter gleichen Bedingungen sogar eine Verdopplung der Zellfläche nachweisen konnten (Dreger, 2003; Liao, 2003). Bei der Untersuchung charakteristischer Veränderungen der Genexpression im Zuge einer hypertrophen Stimulation gilt es folgendes zu beachten. Im Gegensatz zu vielen anderen hypertrophen Stimuli induziert β -adrenerges Isoproterenol in nRC nicht die β -MHC-Isoform des kontraktilen Proteins Myosin (Waspe, 1990), sondern die erhöhte Genexpression der Isoform α -MHC (Rupp, 1991). Auch in dieser Untersuchung konnte eine deutlich erhöhte mRNA-Expression für α -MHC festgestellt werden. Ähnliches gilt für das natriuretische Peptid ANP, das wenige Stunden nach dem Einsetzen hypertropher Stimuli vermehrt exprimiert wird (Knowlton, 1991). Analog zu den Ergebnissen von Morisco *et al.* (2001) verdoppelte sich die Expressionsrate von ANP in den hier untersuchten neonatalen Rattenkardiomyozyten unter der Behandlung mit 10 μ M Isoproterenol. Diese Ergebnisse waren, ebenso wie die Expressionserhöhung von α -MHC, in unserem Labor im Rahmen anderer Untersuchungen reproduzierbar (unveröffentlichte Daten).

Die zeitgleiche Behandlung der Isoproterenol-stimulierten nRC mit Bortezomib reduzierte die Zellfläche dosisabhängig und in dem gleichen Maße wie der Proteasominhibitor MG132, dessen anti-hypertrophe Eigenschaften bereits nachgewiesen wurden (Dreger, 2003). Dabei konnte die höchste Bortezomib-Konzentration die in diesem Versuch eingesetzt wurde, das hypertrophe Wachstum so deutlich supprimieren, dass das Niveau der Kontrollen erreicht wurde.

Der Nachweis anti-hypertropher Eigenschaften des Proteasominhibitors Bortezomib in nRC konnte – neben der Supprimierung einer Isoproterenol-induzierten Flächenvergrößerung – auch durch den Nachweis reduzierter mRNA-Expressionen der Hypertrophie-Markergene α -MHC und ANP erbracht werden. Auch hier ließ sich eine Dosisabhängigkeit erkennen. Bei Behandlung mit der höchsten Bortezomib-Konzentration ließ sich eine Reduzierung der mRNA-Expression von ANP auf Kontrollniveau nachweisen. Die mRNA-Expression von

α -MHC wurde sogar unter Kontrollniveau supprimiert. Der zum Vergleich in diesen Untersuchungen verwendete Proteasominhibitor MG132 suppressierte die Expressionen der beiden Hypertrophie-Marker weniger deutlich.

Diese Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass der Proteasominhibitor Bortezomib das Isoproterenol-induzierte hypertrophe Zellwachstum von nRC supprimieren kann.

5.2 Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Hypertonie-induzierte kardiale Hypertrophie in der Dahl Salz-sensitiven Ratte

5.2.1 Bortezomib inhibierte die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms in DSSR organspezifisch

DSSR wurde der niedrig dosierte Proteasominhibitor Bortezomib (50 μ g/kg KG) über acht bzw. siebeneinhalb Wochen zweimal wöchentlich intraperitoneal injiziert. Die letzte Injektion erfolgte 24 Stunden vor der Euthanasie der Tiere. Die Messung der ChTL Aktivität des Proteasoms mit Hilfe fluorogener proteasomaler Substrate erfolgte bei allen Ratten in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Bei den Ratten des ersten Versuches geschah dies auch in Leber, Niere und Herz. Dabei konnte eine tendenzielle und organspezifische Inhibition der ChTL Aktivität beobachtet werden (siehe 4.2.4).

Bortezomib hemmt unter physiologischen Bedingungen vorzugsweise die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, während die Caspase- und Trypsin-ähnlichen Aktivitäten des Proteasoms in geringem Ausmaß oder kaum gehemmt werden (Berkers, 2005). Die selektive Inhibition der ChTL Aktivität reduziert den proteasomalen Abbau je nach Substratprotein um 11 - 50 %. Eine partielle Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib, die nur die ChTL Aktivität betrifft, führt damit auch nur zu einem partiell reduzierten Abbau von Substratproteinen. Infolge dessen ist die Zytotoxizität von Bortezomib – sogar bei Verwendung als Chemotherapeutikum in hohen Dosen - limitiert (Kisselev, 2006). Die in diesem Versuch verwendete Dosis von 50 μ g/kg Körpergewicht (entspricht etwa 0,36 mg/m² Körperoberfläche) liegt außerdem weit unterhalb der Dosierung, die in der Therapie des malignen Lymphoms verwendet wird (1,3 mg/m² Körperoberfläche).

In allen untersuchten Zellen und Organen konnte im Vergleich zu den Placebo-Tieren eine tendenzielle Reduzierung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms um 17 % bis 34 % beobachtet werden, die jedoch nur in der Leber und Niere signifikant war (siehe 4.2.4). Allerdings erfolgte die Messung der ChTL Aktivität 24 Stunden nach der letzten Bortezomib-Injektion. Zu diesem Zeitpunkt ist das Ausmaß einer reversiblen proteasomalen Hemmung durch den Proteasominhibitor weitaus geringer ausgeprägt, als kurz nach seiner Applikation (Adams, 1999). Man muss also davon ausgehen, dass unmittelbar nach der Injektion von Bortezomib eine stärkere proteasomale Inhibition vorlag, als man 24 Stunden später messen konnte.

Die unterschiedliche Hemmung der ChTL Aktivität in den verschiedenen Organen lässt sich durch verschiedene Fakten erklären. Zum einen wurde Bortezomib in dieser Untersuchung intraperitoneal appliziert und unterliegt damit einem First-pass-Metabolismus. Damit erreicht der Proteasominhibitor in der Leber eine höhere Konzentration und induziert eine deutlichere Hemmung als in anderen Organen. Je nach Applikationsart können sich die Proteasomaktivitäten bei Gabe der gleichen Dosis eines Inhibitors in den verschiedenen Organen unterscheiden (Kumarapeli, 2005; Lindsten, 2003; Lindsten, 2006). Allerdings erfolgt auch bei intravenöser Applikation eine unterschiedliche Verteilung von Bortezomib in den verschiedenen Organen, die sich auf das Ausmaß der proteasomalen Hemmung auswirkt. Während in der Niere und insbesondere in der Leber sehr viel Bortezomib nachgewiesen werden kann, ist dies in den PBMC und im Herzen eher weniger der Fall (Adams, 1999). Deshalb war in der vorliegenden Arbeit in Leber und Niere der DSSR auch noch 24 Stunden nach der letzten Bortezomib-Injektion eine signifikante Hemmung der ChTL Aktivität nachweisbar. Außerdem weist die molekulare Zusammensetzung des Proteasoms organspezifische Unterschiede auf. In Folge dessen differieren die proteolytischen Aktivitäten und der Einfluss von Proteasominhibitoren (Gomes, 2009; Kloss, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit stand natürlich die Bortezomib-induzierte Proteasominhibition im Herzen der DSSR im Mittelpunkt des Interesses. Die tendenzielle Reduzierung der ChTL Aktivität um ca. 19 % erreichte jedoch – aus den genannten Gründen - nicht das Signifikanzniveau. Eine weitaus stärkere Inhibition der ChTL Aktivität (Reduzierung um ca. 80 %) durch Epoxomicin im Herzen konnten Depre *et al.* und Hedhli *et al.* in einem murinen Modell der Drucküberlastungs-induzierten kardialen Hypertrophie nachweisen (Depre, 2006; Hedhli, 2008). Der zu den Peptid-Epoxyketonen gehörende Proteasominhibitor Epoxomicin hemmt – ähnlich wie das Peptid-aldehyd Bortezomib – hochspezifisch die ChTL Aktivität des Proteasoms (Meng, 1999). Allerdings ist unklar, welchen Zeitabstand Depre *et al.* und Hedhli *et al.* zwischen den letzten Injektionen und der Euthanasie wählten. Aufgrund der deutlichen Hemmung kann man vermuten, dass die Messungen der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivitäten im Gegensatz zu der hier vorliegenden Untersuchung, kurz nach den letzten Injektionen erfolgten und ein direkter Vergleich der Ergebnisse damit nicht möglich ist. Sollte die Messung der ChTL Aktivität jedoch ebenfalls nach etwa 24 Stunden erfolgt sein, ist bei der beobachteten Reduzierung der ChTL Aktivität um ca. 80 % kritisch anzumerken, dass bei einer derartigen proteasomalen Inhibition in einer anderen *In-vivo*-Untersuchung toxische Nebenwirkungen beobachtet werden konnten (Lindsten, 2003).

Meiners *et al.* konnten *in vitro* in Folge einer verminderten proteasomalen Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen eine erhöhte mRNA-Expression von Genen feststellen, die für proteasomale Untereinheiten kodieren. Daraus resultierte eine kompensatorische *de novo* Synthese von Proteasomen (Meiners, 2003). Dieser positive autoregulatorische Feedback-Mechanismus dürfte jedoch in diesen Untersuchungen keine Rolle gespielt haben. Zum einen muss man davon ausgehen, dass sich diese *In-vitro*-Ergebnisse nicht Eins zu Eins *in vivo* übertragen lassen, weil die Regulation im Organismus komplexer sein dürfte. Außerdem wurde der Proteasominhibitor mehrmals appliziert, so dass auch eventuell neu synthetisierte Proteasomen durch eine erneute Injektion von Bortezomib inhibiert wurden.

5.2.2 Bortezomib wirkte in DSSR anti-hypertroph

Nachdem die deutliche anti-hypertrophe Wirkung des Proteasominhibitors Bortezomib in kultivierten nRC nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Situation in dem Tiermodell der Dahl Salz-sensitiven Ratte weniger eindeutig dar. Die Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und der Kollagenanteil in dem linken Ventrikel waren nur tendenziell verringert. Dennoch wurde das absolute und relative Herzgewicht (HG/TL) tendenziell (erster Versuch) bzw. signifikant (zweiter Versuch) reduziert, möglicherweise aufgrund einer Summierung der anti-hypertrophen und anti-fibrotischen Effekte. Ein Einfluss auf die Hypertrophie- bzw. Fibrose-Markergene β -MHC und Col III (a1) konnte nicht beobachtet werden.

Parallel zu dieser Arbeit untersuchten mehrere Arbeitsgruppen unter Verwendung verschiedener Tiermodelle und Proteasominhibitoren die Auswirkungen einer proteasomalen Hemmung auf die kardiale Hypertrophie. Sie konnten deutlichere anti-hypertrophe Effekte beobachten, inhibierten das Proteasom jedoch auch stärker und wählten einen sehr kurzen Versuchszeitraum (Depre, 2006; Hedhli, 2008; Stansfield, 2008). Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Versuchsbedingungen und Ergebnisse dieser Untersuchungen und der vorliegenden. Im Folgenden soll auf die einzelnen Aspekte näher eingegangen werden.

5.2.2.1 Bortezomib reduzierte das Herzgewicht hypertensiver DSSR

Dahl Salz-sensitive Ratten entwickeln unter der Fütterung einer salzhaltigen Diät innerhalb weniger Wochen eine ausgeprägte Hypertonie. Diese induziert eine progressive linksventrikuläre Hypertrophie und Fibrose sowie weitere Endorganschäden (Rapp, 1985).

Mit Hilfe der Parameter Herzgewicht, Herzgewicht/Körpergewicht und Herzgewicht/Tibiallänge kann man das Ausmaß einer kardialen Hypertrophie quantifizieren. In den Placebo-Gruppen beider Versuche konnte im Vergleich zu den nicht mit Salz gefütterten Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung des Hypertrophie-Parameters Herzgewicht/Körpergewicht um ca. 30 % festgestellt werden (siehe 4.2.5.1). Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit anderen Untersuchungen in diesem Tiermodell der Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie (Zhou, 2004; Wendt, 2007; Wendt, 2009).

Der Hypertrophie-Parameter Herzgewicht/Körpergewicht stößt jedoch an die Grenzen seiner Aussagefähigkeit, sobald sich das Körpergewicht der miteinander zu vergleichenden Gruppen signifikant unterscheidet. Dies war in dem ersten Versuch der Fall und deshalb wurde als eine weitere, weniger variable Bezugsgröße die Tibiallänge der Ratten herangezogen. Diese zeigte aufgrund des gleichen Entwicklungszustands der Tiere keine signifikanten Längenunterschiede und eignete sich besser als nicht variable Bezugsgröße.

Tabelle 8: Vergleich der Versuchsbedingungen und Ergebnisse von Veröffentlichungen, die den Einfluss einer Proteasominhibition auf die kardiale Hypertrophie *in vivo* untersuchten (im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren)

	Fechner	Depre, 2006	Hedhli, 2008	Stansfield, 2008
Tiermodell	DSSR	TAC; Maus	TAC; Maus	Isoproterenol; Maus
Proteasominhibitor	Bortezomib	Epoxomicin	Epoxomicin	PS-519
Prävention/Regression	Prävention	Prävention	Regression	Prävention + Regression
Applikationsdauer	52 bzw. 56 Tage	5 Tage	7 Tage	7 Tage
Applikationszyklus	zweimal wöchentlich	täglich	täglich	täglich
Herzgewicht	tendenziell bis signifikant reduziert	signifikant reduziert	signifikant reduziert	signifikant reduziert
Kardiomyozyten- Querschnittsfläche	tendenziell reduziert	signifikant reduziert	signifikant reduziert	signifikant reduziert
Hypertrophie- Markergene	nicht beeinflusst (β -MHC)	nicht untersucht	nicht untersucht	signifikant reduziert (β -MHC, BNP)
kardiale Fibrose	tendenziell reduziert	nicht untersucht	signifikant reduziert	nicht untersucht
ChTL Aktivität im Herzen	tendenziell reduziert	signifikant reduziert	signifikant reduziert	nicht untersucht
kardiale Funktion	nicht untersucht	nicht beeinträchtigt	verbessert	nicht untersucht
Apoptose von Kardiomyozyten	nicht untersucht	nicht untersucht	reduziert	nicht untersucht
Nebenwirkungen der Proteasominhibition	nicht beobachtet	nicht genannt	nicht beobachtet	nicht genannt
Morbidität und Mortalität	verbessert	nicht genannt	nicht genannt	nicht genannt

Die über siebeneinhalb Wochen andauernde Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib, der das Proteasom nur partiell hemmte (siehe 4.2.4), konnte in dem zweiten Versuch die Entwicklung einer Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie in Dahl Salz-sensitiven Ratten signifikant reduzieren (Herzgewicht, Herzgewicht/Tibiallänge). In dem ersten Versuch konnte aufgrund der geringeren Anzahl der Tiere und der größeren Streuung der Ergebnisse nur eine tendenziell verringerte kardiale Hypertrophie nachgewiesen werden, die Unterschiede zwischen den Bortezomib- und Placebo-Tieren erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau.

Diese Ergebnisse ähneln denen von Depre *et al.* (2006) und Stansfield *et al.* (2008). Erstere konnten in einem murinen Modell der Drucküberlastungs-induzierten kardialen Hypertrophie zum ersten Mal zeigen, dass durch die kurzfristige Hemmung der proteasomalen Aktivität die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie vollständig verhindert werden kann. In diesem Modell wird durch die Konstriktion der thorakalen Aorta die Nachlast erhöht und dadurch innerhalb weniger Tage eine linksventrikuläre Hypertrophie induziert. Die gleichzeitig zu der Konstriktion durchgeführte tägliche Behandlung mit dem intraperitoneal applizierten Proteasominhibitor Epoxomicin (ein Peptid-Epoxyketon) über fünf Tage reduzierte die Entwicklung der Hypertrophie (Herzgewicht/Tibiallänge) signifikant, dabei wurde sogar das Niveau der gesunden Kontrollen erreicht (Depre, 2006).

In einem druckunabhängigen Tiermodell konnte die Entwicklung einer Isoproterenol-induzierten Hypertrophie (Herzgewicht/Körpergewicht) ebenfalls durch einen Proteasominhibitor gehemmt werden. Auch in diesem murinen Modell erfolgte nur eine kurzfristige tägliche intraperitoneale Behandlung mit dem Lactacystin-Abkömmling PS-519, die simultan zu der adrenergen Stimulation durch Isoproterenol durchgeführt wurde (Stansfield, 2008).

In den Hypertrophie-Modellen von Depre *et al.* und Stansfield *et al.* konnte darüber hinaus durch die kurzfristige tägliche Gabe der jeweiligen Proteasominhibitoren eine schon bestehende kardiale Hypertrophie teilweise bzw. vollständig revertiert werden (Hedhli, 2008; Stansfield, 2008).

Das Depre *et al.* und Stansfield *et al.* deutlichere anti-hypertrophe Effekte beobachten konnten als dies in hypertensiven DSSR der Fall war, lässt sich durch das Ausmaß der proteasomalen Inhibition erklären. Die beiden zuerst genannten applizierten ihre jeweiligen Proteasominhibitoren täglich, maximal eine Woche lang. Im Gegensatz dazu erfolgte die Applikation von niedrig-dosiertem Bortezomib in den DSSR zweimal wöchentlich über bis zu acht Wochen. Diese intermittierende Proteasominhibition durch Bortezomib erlaubt einen längeren Applikationszyklus, weil die proteasomale Aktivität zwischen zwei Gaben das Grundniveau erreichen kann. Dies ist aufgrund der zentralen Rolle des Proteasoms bzw. UPS in einer Vielzahl von zellulären Prozessen von enormer Wichtigkeit. Im Gegensatz dazu wird eine tägliche Applikation von Bortezomib nur schlecht vom Organismus toleriert (Bross, 2004). Ähnliches dürfte für die tägliche Applikation von Epoxomicin und PS-519 gelten. Des Weiteren wurde für die DSSR bewusst eine Dosis gewählt, die keine toxischen Nebenwirkungen von Bortezomib erwarten ließ (Bross, 2004) und die letztendlich auch

nicht beobachtet wurden (siehe 4.2.7). Die Wahl der Dosis wurde durch die Tatsache vereinfacht, dass Bortezomib – im Gegensatz zu Epoxomicin und PS-519 - ein bereits zugelassenes Medikament ist, für das ausführliche toxikologische Untersuchungen vorliegen. Das entsprechend niedrig-dosierte Bortezomib hemmte die Chymotrypsin-ähnliche (ChTL) Aktivität des Proteasoms im Herzen nur partiell und ließ aufgrund dessen deutliche anti-hypertrophe Effekte vermissen. Im Gegensatz dazu verwendeten Depre *et al.* eine offensichtlich hohe Dosis des Proteasominhibitors Epoxomicin, der die ChTL Aktivität deutlich inhibierte und dadurch die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie signifikant supprimierte. Ob dies mit unerwünschten Nebenwirkungen einherging, kann aufgrund fehlender Angaben der Autoren nicht nachvollzogen werden (Depre, 2006). Möglicherweise war die Versuchsdauer von sieben Tagen auch zu kurz, um toxische Nebenwirkungen zu beobachten. Ähnliches gilt möglicherweise für die Untersuchungen von Stansfield *et al.* Letztendlich wurde die proteasomale Aktivität in dieser Untersuchung jedoch nicht analysiert, so dass nur vermutet werden kann, dass auch hier das Proteasom deutlich inhibiert wurde (Stansfield, 2008).

5.2.2.2 Das Herzgewicht wurde trotz nicht signifikanter anti-fibrotischer und anti-hypertropher Effekte signifikant reduziert

Die Zunahme der absoluten und relativen Herzgewichte von hypertensiven DSSR war sowohl mit einem hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten (siehe 4.2.5.3), als auch mit der Induktion einer kardialen Fibrose (siehe 4.2.5.5) assoziiert. Die Behandlung der Ratten mit dem niedrig-dosierten Proteasominhibitor Bortezomib ging mit einem tendenziell reduzierten hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten und mit einem ebenso im Trend reduzierten Kollagenanteil in dem linken Ventrikel einher. Das Herzgewicht der mit Bortezomib behandelten DSSR war trotz dieser beiden nicht signifikanten Ergebnisse tendenziell bzw. signifikant reduziert, möglicherweise aufgrund der Summe beider Effekte.

Eine Hypertonie-induzierte Hypertrophie der Herzen von DSSR ließ sich histologisch anhand der vergrößerten Querschnittsflächen von Kardiomyozyten nachweisen (siehe 4.2.5.3). Die dabei beobachtete signifikante Flächenzunahme um ca. 50 % im Vergleich zu den gesunden Kontrollen entspricht weitestgehend ähnlichen Untersuchungen in dem Tiermodell der DSSR (Ichihara, 2006 a) und auch in anderen Ratten-Hypertrophie-Modellen (Pfaff, 2003; Louhelainen, 2009; Wong, 2010).

Die morphometrische Untersuchung der Kardiomyozyten erfolgte in den Rattenherzen des ersten Versuchs. Hier konnte - wie bereits erwähnt - im Gegensatz zu dem zweiten Versuch aufgrund der geringeren Tierzahl und der größeren Streuung der Ergebnisse kein signifikanter Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf den Hypertrophie-Parameter Herzgewicht/Tibiallänge nachgewiesen werden. Dementsprechend waren die Kardiomyozyten-Querschnittsflächen von den mit Bortezomib behandelten Ratten zwar tendenziell kleiner (+ 31 % im Vergleich zu den Kontrollen), unterschieden sich aber nicht signifikant von den Placebo-Ratten (+ 47 % im Vergleich zu den Kontrollen). Übereinstimmend mit den signifikant verringerten Herzgewichten konnten Depre *et al.* und Stansfield *et al.* in ihren Untersuchungen auch histologisch nachweisen, dass die Hemmung

des Proteasoms die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie verhinderte. In ihren Hypertrophie-Modellen konnte durch die Behandlung mit den Proteasominhibitoren Epoxomicin bzw. PS-519 die Querschnittsfläche der Kardiomyozyten signifikant auf das Niveau der Kontrollen reduziert werden (Depre, 2006; Stansfield, 2008). Zusätzlich zu dem bereits diskutierten Ausmaß der proteasomalen Hemmung hatte möglicherweise auch die schnelle Entwicklung der kardialen Hypertrophie in diesen beiden Tiermodellen einen Einfluss auf die Wirkung der Proteasominhibition.

Neben dem hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten induzierte die chronische Hypertonie auch eine kardiale Fibrose in den DSSR. Histologisch konnte in dem ersten Versuch in den linken Ventrikeln hypertensiver DSSR eine Zunahme der interstitiellen und perivaskulären Kollagene um ca. 43 % nachgewiesen werden (siehe 4.2.5.5.) Ein Vergleich mit bisherigen Untersuchungen in DSSR wird durch eine nicht erfolgte, separate Erfassung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose, wie sie in der Literatur häufiger zu finden ist, erschwert. Des Weiteren geht diese Untersuchungsmethode mit einer gewissen Subjektivität einher, die Vergleiche mit anderen Studien zumindest bei Verwendung von Absolutwerten, beeinträchtigt. Tendenziell waren die relativen Ergebnisse (Veränderung in %) jedoch mit anderen Untersuchungen in DSSR vergleichbar (Ichihara, 2006 a; Wendt, 2007; Kato, 2008; Wendt, 2009). Der genannten Subjektivität wurde durch eine verblindete Auswertung Rechnung getragen.

Entsprechend dem tendenziell reduzierten relativen Herzgewicht in den mit Bortezomib behandelten DSSR in dem ersten Versuch wurde auch der Anteil der kollagenen Fasern in den linken Ventrikeln nur im Trend (- 18 %) reduziert. In einem murinen Regressionsmodell der kardialen Hypertrophie infolge einer thorakalen Aortenkonstriktion (TAC) konnten Hedhli *et al.* zeigen, dass der Proteasominhibitor Epoxomicin die Kollagenakkumulation um ca. 75 % reduzierte. Dieser deutliche anti-fibrotische Effekt war auch hier wieder mit einem signifikant reduzierten Herzgewicht assoziiert (Hedhli, 2008). Ebenso konnte unsere Arbeitsgruppe in dem Tiermodell der spontan hypertensiven Ratte (SHR) zeigen, dass der Proteasominhibitor MG132 den Kollagenanteil in den linken Ventrikeln der Ratten signifikant reduzierte (-38 %). Dies war jedoch ohne signifikanten Einfluss auf das relative Herzgewicht (Meiners, 2004).

Sowohl zu der hier vorliegenden Arbeit als auch zu denen von Depre *et al.* und Stansfield *et al.* muss man jedoch folgendes kritisch anmerken. Die möglichen proapoptotischen Effekte einer proteasomalen Hemmung sind bekannt (siehe 2.4.2). Deshalb muss man in Betracht ziehen, dass die verminderten Herzgewichte unter Proteasominhibition nicht nur aus dem reduzierten hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten und den anti-fibrotischen Effekten resultierten, sondern auch Folge einer gesteigerten Kardiomyozyten-Apoptose gewesen sein könnten. In der hier vorliegenden Untersuchung gab es weder histologische noch klinische Hinweise (reduziertes Allgemeinbefinden infolge einer kardialen Dysfunktion) auf eine gesteigerte Apoptose. Außerdem hemmte die verwendete niedrige Dosis des Proteasominhibitors Bortezomib das Proteasom nur partiell, so dass laut Literatur (Meriin, 1998; Meiners, 2006) keine gesteigerte Apoptose zu erwarten war. Ein endgültiger Beweis dieser

Hypothese bleibt jedoch aus, weil keine entsprechenden molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten. Ähnliches gilt für die Untersuchungen von Stansfield *et al.* (Stansfield, 2008). Auch die Arbeitsgruppe von Depre blieb in ihrer ersten Untersuchung den Beweis schuldig, dass durch den Proteasominhibitor Epoxomicin keine Apoptose in hypertrophen Kardiomyozyten induziert wurde (Depre, 2006). Spätere Untersuchungen mit diesem Inhibitor in dem gleichen Tiermodell zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall war und die Hypertrophie-assoziierte Apoptose durch Epoxomicin sogar vermindert werden konnte (Hedhli, 2008).

5.2.2.3 Die Expressionen von Hypertrophie- und Fibrose-Markergenen wurden durch Bortezomib nicht beeinflusst

Die Expressionsraten verschiedener Gene können als Hypertrophie- bzw. Fibrose-Marker herangezogen werden und ermöglichen eine Quantifizierung auf molekularer Ebene. In der Druck-induzierten kardialen Hypertrophie der DSSR konnte allerdings kein Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Expressionsraten von β -MHC und Kollagen Typ III (a1) beobachtet werden (siehe 4.2.5.4 und 4.2.5.6).

Der bei den nRC verwendete Hypertrophie-Marker α -MHC konnte in dem *In-vivo*-Modell der DSSR nicht verwendet werden, weil er während einer Druck-induzierten kardialen Hypertrophie in Ratten vermindert exprimiert wird. In diesem Fall gilt in den Ventrikeln adulter Ratten die Reexpression der fetalen Myosin-Isoform β -MHC als Hypertrophie-Marker (Izumo, 1987).

In den hypertrophen Ventrikeln der Placebo-Ratten des ersten Versuchs erfolgte der Nachweis einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von β -MHC. Ähnliche Veränderungen konnten sowohl in DSSR (Ichihara, 2006 a) (Ichihara, 2006 b) als auch in verschiedenen Tiermodellen der Druck-induzierten kardialen Hypertrophie beobachtet werden (Mercadier, 1981).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss von Bortezomib auf die Expression von β -MHC beobachtet werden. Im Gegensatz dazu reduzierte der Proteasominhibitor PS-519 in einer Isoproterenol-induzierten kardialen Hypertrophie nicht nur das relative Herzgewicht, sondern supprimierte auch die Expression von β -MHC auf das Niveau der gesunden Kontrollen (Stansfield, 2008). Wie jedoch die Arbeit von Sárman *et al.* zeigt, muss die Supprimierung einer kardialen Hypertrophie in Ratten nicht immer mit einer reduzierten Expression von β -MHC einhergehen (Sárman, 2007).

Der Nachweis einer kardialen Fibrose in den salzgefütterten DSSR der Placebo-Gruppe konnte neben dem histologisch erhöhten Kollagenanteil außerdem molekularbiologisch durch die signifikant erhöhte mRNA-Expression von Kollagen Typ III (a1) im Herzen erbracht werden (siehe 4.2.5.6). Auch diese Ergebnisse entsprechen in ihrem Ausmaß der Literatur (Guo, 2006; Ichihara, 2006 a; Kato, 2008).

Im Gegensatz zu den im Trend reduzierten histologischen Ergebnissen konnte bei der Expression von Kollagen Typ III (a1) kein Unterschied zwischen den Placebo- und den

Bortezomib-Ratten festgestellt werden. Möglicherweise waren Veränderungen der Expression eines anderen Kollagens für den tendenziell reduzierten Kollagenanteil im linken Ventrikel verantwortlich. So konnte in den bereits erwähnten Untersuchungen von Hedhli *et al.* und Meiners *et al.* neben einer signifikant reduzierten Kollagenakkumulation in den Herzen von TAC-Mäusen oder SHR auch eine signifikant verringerte Expression von Kollagen Typ I während einer Proteasominhibition beobachtet werden. Eine reduzierte Expression wurde außerdem für Kollagen Typ III und die Matrixmetalloproteinase MMP 2 nachgewiesen (Meiners, 2004) (Hedhli, 2008). MMP sind in Umbauvorgänge im Rahmen des kardialen Remodelings involviert, aus denen ein schlechter vernetztes Kollagengerüst und eine verminderte strukturelle Integrität der Kardiomyozyten resultieren (Spinale, 2000). In die transkriptionelle Regulierung mehrerer MMP ist u. a. der Transkriptionsfaktor NF- κ B involviert (Han, 2001), dessen Aktivität wiederum – auch in kardialen Fibroblasten - durch die Hemmung des Proteasoms inhibiert wird (Palombella, 1994; Meiners, 2004). In mehreren Tiermodellen konnte die gehemmte Aktivierung von NF- κ B mit einer reduzierten kardialen Fibrose in Zusammenhang gebracht werden (Frantz, 2006; Sárman, 2007; Hedhli, 2008).

5.2.2.4 Mögliche Mechanismen der anti-hypertrophen Wirkung einer Proteasominhibition

Nachdem anti-hypertrophe Effekte des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib in dieser Untersuchung aufgezeigt werden konnten, stellt sich die Frage nach möglichen zugrunde liegenden Mechanismen.

Zunächst einmal erscheint es naheliegend, dass die anti-hypertrophen Effekte von Bortezomib mittelbar auf die mäßige anti-hypertensive Wirkung des Proteasominhibitors zurückzuführen sind (siehe 4.2.6.1). Allerdings konnte in den mit Bortezomib behandelten Ratten keine positive Korrelation zwischen Blutdruck und dem Hypertrophieparameter Herzgewicht/Tibiallänge nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daraus kann man schlussfolgern, dass der Proteasominhibitor Bortezomib die kardiale Hypertrophie in DSSR durch blutdruckunabhängige Mechanismen supprimierte.

Eine Beeinflussung der kardialen Hypertrophie ist jedoch möglicherweise durch weitere mittelbare Effekte der Proteasominhibition möglich. So konnte in dieser Untersuchung die bereits bekannte anti-inflammatorische Wirkung (Campbell, 1999; Pye, 2003) infolge einer proteasomalen Hemmung exemplarisch anhand der reduzierten Expression von VCAM-1 in den Aorten der mit Bortezomib behandelten DSSR bestätigt werden (siehe 4.2.6.5). Die anti-inflammatorische Wirkung des Proteasominhibitors Bortezomib zeichnet sich außerdem durch eine reduzierte Freisetzung von pro-inflammatorischen Stimuli aus (z. B. TNF- α) (van der Heijden, 2009), die bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine entscheidende Rolle spielen (Palombella, 1994). NF- κ B induziert die Expression von Genen, die an der Regulation des Zellwachstums und des Zellzyklus beteiligt sind und gilt als prohypertroph (Li, 2004). Eine reduzierte Aktivität von NF- κ B war in verschiedenen Tiermodellen mit der Prävention bzw. Regression einer kardialen Hypertrophie infolge einer

proteasomalen Hemmung assoziiert (Hedhli, 2008; Stansfield, 2008) und spielte eventuell auch in der hier vorliegenden Untersuchung in DSSR eine partielle Rolle.

Eine Supprimierung der kardialen Hypertrophie wurde wahrscheinlich auch durch die anti-oxidative Wirkung von Bortezomib vermittelt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), z. B. Superoxid, werden durch zahlreiche hypertrophe Stimuli (z. B. Angiotensin II, ET-1) vermehrt gebildet (Sugden, 2006) und unterstützen die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie durch die Aktivierung von NF- κ B (Li, 2004) und pro-hypertropher Signalmediatoren wie die ERK 1/2 (Sugden, 2006). Im Anschluss an diese Arbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe eine reduzierte Superoxidbildung und damit ein verringerter oxidativer Stress in den Aorten der mit Bortezomib behandelten DSSR nachgewiesen. Außerdem waren Marker des oxidativen Stresses im Serum der Tiere erniedrigt (Ludwig, 2009). Weitere *In-vitro*-Untersuchungen ergaben, dass die partielle Hemmung des Proteasoms neonatale Rattenkardiomyozyten vor oxidativen Stress schützen kann, indem die Expressionen von anti-oxidativen Enzymen erhöht und weniger ROS gebildet werden (Dreger, 2009). Daher wäre es naheliegend, ähnliche anti-oxidative Effekte in den Herzen der mit Bortezomib behandelten DSSR zu erwarten und diese partiell für die anti-hypertrophe Wirkung des Proteasominhibitors verantwortlich zu machen.

Neben diesen indirekten anti-hypertrophen Effekten der Proteasominhibition auf die kardiale Hypertrophie der DSSR werden in der Literatur weitere Mechanismen diskutiert, die an der Prävention einer pathologischen kardialen Hypertrophie durch die unmittelbare Wirkung auf die Kardiomyozyten beteiligt sind und hier kurz dargestellt werden sollen. Dabei erscheint es auf den ersten Blick nicht logisch, dass durch eine Hemmung der Proteindegradation eine kardiale Hypertrophie verhindert oder sogar revertiert werden kann. Betrachtet man jedoch die vielfältigen Aufgaben des Ubiquitin-Proteasom-Systems (insbesondere die Regulierung von Transkriptionsfaktoren und des Zellzyklus) (siehe 2.3.3 und 2.4.2) wird deutlich, dass durch eine proteasomale Inhibition auch das Zellwachstum beeinflusst werden kann.

Meiners *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass das hypertrophe Wachstum von nRC, das durch verschiedene Stimuli induziert wurde, durch eine proteasomale Hemmung supprimiert werden kann. Diese Beobachtung war mit einer reduzierten Expression von Genen assoziiert, die für pro-hypertrophe Wachstums-Signalmediatoren kodieren. Dazu gehörten z. B. die Proteinkinase B und die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen 1/2 (ERK 1/2). Diese sind für die Vermittlung der mit einer kardialen Hypertrophie assoziierten Veränderungen der Genexpression und des Phänotyps außerordentlich wichtig (Sugden, 2003; Clerk, 2006). Die Autoren vermuteten, dass diese Effekte einer proteasomalen Inhibition zu einer Supprimierung des hypertrophen Wachstums von Kardiomyozyten beitragen können (Meiners, 2008 a).

Adulte Kardiomyozyten haben den Zellzyklus verlassen und sind in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert (Poolman, 1998). Man geht heute davon aus, dass hypertrophe Stimuli den Wiedereintritt von Kardiomyozyten in den Zellzyklus induzieren. Dies wird u. a. durch die erhöhte Expression von spezifischen G1-Zyklinen und ihrer assoziierten Kinasen ermöglicht (Busk, 2002; Tamamori-Adachi, 2002). Der Wiedereintritt in den Zellzyklus ist

mit einem hypertrophen Zellwachstum assoziiert (Wagner, 1999), während eine Zellteilung nach wie vor nicht möglich ist (Busk, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass das Ubiquitin-Proteasom-System an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist kann man vermuten, dass der Wiedereintritt der Kardiomyozyten in den Zellzyklus durch eine proteasomale Inhibition beeinflusst werden kann. Diese These wird durch die schon erwähnten Untersuchungen von Meiners *et al.* gestützt. Die Autoren beobachteten, dass die Hypertrophie-supprimierenden Effekte der proteasomalen Inhibition in nRC mit einer reduzierten Expression von spezifischen G1-Zyklinen und ihrer assoziierten Kinasen assoziiert war. Der damit verbundene beeinträchtigte Hypertrophie-induzierte Wiedereintritt in den Zellzyklus kann möglicherweise zu der supprimierten kardialen Hypertrophie während einer partiellen proteasomalen Hemmung beitragen (Meiners, 2008 a).

Des Weiteren ist das Proteasom über den Abbau des Inhibitorproteins I κ B unmittelbar an der Aktivierung des bereits erwähnten pro-hypertrophen Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt, während im Zuge einer proteasomalen Hemmung eine verminderte Aktivierung von NF- κ B zu verzeichnen ist (siehe 2.3.3 und 2.4.2).

5.2.3 Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf das Gefäßsystem Dahl Salz-sensitiver Ratten

Zu Beginn dieser Arbeit sollten vaskuläre Untersuchungen in DSSR in erster Linie erfolgen, um das Tiermodell zu validieren. Deshalb wurde schon im ersten Versuch - der eigentlich der Untersuchung kardialer Effekte von Bortezomib diente - eine Verlaufskontrolle der Blutdruckentwicklung durchgeführt. Dabei wurde ein tendenzieller, aber nicht signifikanter Einfluss des Proteasominhibitors auf den systolischen arteriellen Blutdruck beobachtet, der in einem zweiten Versuch das Signifikanzniveau erreichte. Um mögliche zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismen aufzudecken, wurden Aorten-Proben der DSSR molekularbiologisch (mRNA-Expressionen von eNOS, ET-1, VCAM-1) untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass Bortezomib die Expression des inflammatorischen Markers VCAM-1 signifikant und die von ET-1 tendenziell reduzierte, während kein Einfluss des Inhibitors auf die eNOS Expression beobachtet werden konnte. Außerdem wurde eine im Trend verbesserte Vasoreaktivität isolierter Aorten von Bortezomib-behandelten DSSR in einem zweiten Versuch festgestellt.

5.2.3.1 Der Proteasominhibitor wirkte in DSSR anti-hypertensiv

Die Dahl Salz-sensitive Ratte gilt als Tiermodell der genetisch determinierten Salz-sensitiven Hypertonie. Innerhalb von zwei Wochen wird durch die Fütterung einer salzhaltigen Diät ein starker Anstieg des systolischen arteriellen Blutdrucks (SAB) induziert, der bei anhaltender Fütterung dieser Diät auch noch weiter steigt (Rapp, 1985). In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen in DSSR (Barton, 1998; Cosentino, 2002; Wendt, 2007; Wendt, 2009) konnte nach der acht bzw. siebeneinhalb Wochen andauernden Fütterung einer Diät mit 4 % NaCl eine deutlich ausgeprägte arterielle Hypertonie

(SAB = 199 bzw. 207 mmHg) nachgewiesen werden, die in der normal gefütterten Kontrollgruppen (SAB = 172 bzw. 158 mmHg) nicht beobachtet werden konnte (siehe 4.2.6.1).

In dem ersten hier durchgeführten Versuch konnte kein signifikanter Einfluss des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf die Salz-induzierte arterielle Hypertonie in DSSR festgestellt werden. Allerdings reduzierte Bortezomib in dem zweiten Versuch – möglicherweise aufgrund der schon oben diskutierten höheren Tierzahl – den SAB bei Versuchsende signifikant um 15 mmHG im Vergleich zu den Placebo-Ratten.

Die Literatur stellt sich bezüglich der blutdrucksenkenden Effekte einer Proteasominhibition kontrovers dar. Während einige Arbeitsgruppen die hier festgestellten anti-hypertensiven Effekte bestätigten, konnten andere keinen Einfluss von Proteasominhibitoren auf den Blutdruck in hypertensiven oder normotensiven Tiermodellen beobachten. In dem Rattenmodell der Desoxy-Corticosteron-Acetat-Salz-induzierten Hypertonie konnte der Proteasominhibitor PSI die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie wesentlich deutlicher supprimieren, als in der hier durchgeführten Untersuchung (Reduktion des SAB um 54 mmHg) (Takaoka, 1998). Auch in einem murinen Modell der durch Angiotensin-II induzierten Hypertonie konnte der Proteasominhibitor MG132 den SAB signifikant reduzieren (Xu, 2009). Außerdem kann eine Hypotonie relativ häufig als Nebenwirkung von Bortezomib in der Therapie maligner Erkrankung in der Humanmedizin beobachtet werden (Orlowski, 2002) (Papandreou, 2004). Im Gegensatz dazu beobachteten Meiners *et al.* in spontan hypertensiven Ratten keine anti-hypertensiven Effekte von MG132 (Meiners, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Proteasominhibitor PSI auf den Blutdruck normotensiver Schweine keinen Einfluss hat (Chade, 2005). In Anbetracht der Tatsache, dass die genannten Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen mit teilweise unterschiedlichen Proteasominhibitoren erfolgten, erklären sich möglicherweise die divergierenden Ergebnisse. Die verschiedenen Tiermodelle der Hypertonie unterscheiden sich in ihren molekularen Charakteristika. So kann man z. B. in DSSR - im Gegensatz zu SHR - einen erhöhten Proteingehalt des Vasokonstriktors ET-1 in den Gefäßen beobachten (Larivière, 1993; Barton, 1998), der durch die Hemmung des Proteasoms beeinflusst werden kann (siehe 5.2.3.4).

5.2.3.2 Bortezomib verbesserte die beeinträchtigte Vasoreaktivität hypertensiver DSSR tendenziell

Das Endothel ist, neben weiteren Aufgaben, vor allem für die Regulierung des Gefäßtonus und damit des Blutdrucks verantwortlich. Dazu werden sowohl Vasodilatoren als auch Vasokonstriktoren von dem Endothel sezerniert. Kann das Endothel seine Funktionen nicht mehr uneingeschränkt ausüben, spricht man von einer endothelialen Dysfunktion. Um diese zu diagnostizieren wird insbesondere die Bestimmung der endothelabhängigen Vasodilatation herangezogen. Intaktes Endothel sezerniert bei einer Stimulation durch Acetylcholin Stickstoffmonoxid (NO), das durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) synthetisiert wird (Furchgott, 1980; Palmer, 1987; Palmer, 1989). NO wiederum relaxiert über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und die Reduzierung des intrazellulären Kalziumspiegels die glatten Muskelzellen der Gefäßwand und induziert dadurch eine

Blutdrucksenkung (Murad, 1987). Eine beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation resultiert zum einen aus einer erhöhten Produktion von Vasokonstriktoren (Bakker, 1997) und zum anderen aus einer reduzierten Bioverfügbarkeit von NO. Diese ist vor allem auf eine verminderte Bildung von NO durch die eNOS (infolge ihrer reduzierten Expression und Aktivität) oder einem beschleunigten Abbau von NO zurückzuführen. Letzterer erfolgt durch reaktive Sauerstoffspezies, die NO zu vasoinktiven Metaboliten wie Nitrit und Nitrat abbauen (Cai, 2000). Eine erhöhte Produktion von ROS (z. B. Superoxid) wird durch laminare Scherkräfte induziert, die mit einer arteriellen Hypertonie assoziiert sind und eine endotheliale Dysfunktion induzieren (Chiu, 1997; Somers, 2000).

Eine beeinträchtigte endothelabhängige Acetylcholin-induzierte Vasodilatation isolierter Aortenringe von hypertensiven Dahl Salz-sensitiven Ratten wurde 1987 zum ersten Mal von Lüscher *et al.* beschrieben (Lüscher, 1987). Gleiche Ergebnisse in diesem Tiermodell der Salz-induzierten Hypertonie erbrachten sowohl die hier vorliegende Arbeit (siehe 4.2.6.2) als auch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Barton, 1998; Cosentino, 2002; Zhou, 2004).

Ein Vergleich der endothelabhängigen Vasodilatation von Aorten der drei verschiedenen Behandlungsgruppen gestaltete sich jedoch schwierig. In der Literatur hat es sich bei der graphischen Darstellung der Vasodilatation durchgesetzt, die maximale Kontraktionskraft der isolierten Aorten auf Phenylephrin als 100 % anzusehen und die Vasodilatation dazu in Relation zu bringen. Diese Art der Darstellung ist aber nicht immer sinnvoll, insbesondere wenn die Kontraktionsfähigkeit der miteinander zu vergleichenden Gruppen divergiert. Hätte man sich in dieser Arbeit für die übliche Darstellung der endothelabhängigen Vasodilatation entschieden, wäre der Eindruck entstanden, die Aorten der Bortezomib-behandelten Ratten würden am besten dilatieren. Sie hätten in Relation zu den 100 % der Phenylephrin-Kontraktion um 87 % relaxiert, während die Kontrollen nur um 83 % relaxierten (Placebo = 72 %). Die Ratten der Bortezomib-Gruppe würden also – entgegen dem physiologischen Verständnis - trotz hochgradiger arterieller Hypertonie eine bessere endothelabhängige Vasodilatation aufweisen, als die mittelgradig hypertensiven Kontrollratten. Aufgrund dieser Schwierigkeiten mit der üblichen graphischen Darstellung wurden die Absolutwerte der Vasoreaktivität isolierter Aorten dargestellt. Dabei fällt auf, dass die Aorten der beiden salzgefütterten Versuchsgruppen bei der Applikation von Phenylephrin deutlich weniger kontrahierten, als die Kontrolltiere. Bei der maximalen Vasodilatation erreichten zwar alle drei Versuchsgruppen ein ähnliches Niveau. Die größten Unterschiede in den Absolutwerten zwischen Kontraktion und Relaxation und damit die beste Vasodilatation, erreichten jedoch die Kontrolltiere. Abschließend kann man demzufolge von einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasodilatation der beiden salzgefütterten Versuchsgruppen sprechen.

Die Behandlung mit dem niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib führte zu einer tendenziell besseren Vasokonstriktion in Antwort auf Phenylephrin und einer ebenfalls tendenziellen, aber nicht signifikanten Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation in Antwort auf Acetylcholin. Damit wäre möglicherweise ein Zusammenhang zu der in dem zweiten Versuch festgestellten reduzierten Hypertonie zu erkennen.

Signifikante Verbesserungen der endothelabhängigen Vasodilatation durch eine Proteasominhibition konnte unsere Arbeitsgruppe bereits aufzeigen. Sowohl in gesunden als auch in dysfunktionellen isolierten Rattenaortenringen verbesserte die partielle Hemmung des Proteasoms durch MG132 die Relaxationsfähigkeit in Antwort auf Acetylcholin signifikant (Stangl, 2004; Meiners, 2006; Lorenz, 2009). Auch in einem Tiermodell der durch Angiotensin-II induzierten Hypertonie in Mäusen konnte der Proteasominhibitor MG132 die endothelabhängige Vasodilatation isolierter Aortenringe in Antwort auf Acetylcholin verbessern. Dies war mit einer Reduktion der Hypertonie assoziiert (Xu, 2009). Ein anderer Inhibitor des Proteasoms, MLN-273, verbesserte in einem Tiermodell der frühen Atherosklerose die ebenfalls mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert ist, die renovaskuläre endothelabhängige Vasodilatation (Chade, 2005).

Für die Regulierung des Gefäßtonus ist nicht nur eine adäquate Dilatation der Gefäße notwendig, sondern auch die Fähigkeit zur Vasokonstriktion. Deshalb wurde die Kontraktionsfähigkeit isolierter Aortenringe von DSSR nach Applikation von Endothelin-1 untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Aortenringe der Placebo-Ratten signifikant schwächer kontrahierten, als die der Kontrolltiere. Die hier erbrachten Ergebnisse stimmen auch in dieser Hinsicht mit denen der oben genannten Untersuchungen in DSSR überein (Barton, 1998; Cosentino, 2002; Zhou, 2004). Eine Erklärung für die verminderte Vasokonstriktion in Antwort auf ET-1 könnte eine Herunterregulierung der Endothelin-Rezeptoren infolge des nachgewiesenen erhöhten Proteingehaltes von Endothelin-1 in diesem Tiermodell darstellen (Barton, 1998). Diese Beobachtung konnte tendenziell auch in dieser Untersuchung gemacht werden (siehe 5.2.3.4).

Die Aorten der mit Bortezomib behandelten Ratten kontrahierten in Antwort auf ET-1 tendenziell besser, allerdings wurde auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht. Ein möglicher Zusammenhang mit der mRNA-Expression von ET-1 in der Aorta der DSSR soll später diskutiert werden (siehe 5.2.3.4).

Die in der Literatur beschriebene und hier tendenziell aufgezeigte Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation durch die partielle Hemmung des Proteasoms, resultiert möglicherweise aus der positiven Beeinflussung mehrerer pathophysiologischer Mechanismen. Wie bereits oben beschrieben, ist eine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation die Folge einer reduzierten Bioverfügbarkeit von NO und/oder einer erhöhten Produktion von Vasokonstriktoren. Beide können durch eine proteasomale Hemmung beeinflusst werden. Die Salz-induzierte Hypertonie in dem Tiermodell der DSSR ist mit einem erhöhten Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies assoziiert, die u. a. durch die Inaktivierung des Vasodilatators Stickstoffmonoxid zu der Entwicklung der arteriellen Hypertonie und der endothelialen Dysfunktion beitragen (Swei, 1997; Meng, 2002; Kushiro, 2005). Infolge der partiellen Hemmung des Proteasoms mit MG132 konnten *in vitro* erhöhte mRNA-Expressionen von anti-oxidativen Enzymen (z. B. Glutathionperoxidase-3) in endothelialen Zellen beobachtet werden. Dies schützte die Zellen vor H₂O₂-induzierten oxidativem Stress (Meiners, 2006). Die bereits beschriebene Verbesserung der Vasodilatation in dysfunktionellen isolierten Rattenaortenringen unter MG132 ging mit einer

reduzierten Superoxidbildung einher (Lorenz, 2009). Diese konnte auch im Anschluss an diese Arbeit in den Aorten der Bortezomib-behandelten Ratten nachgewiesen werden (Ludwig, 2009) und trug wahrscheinlich zu der tendenziell verbesserten endothelabhängigen Vasodilatation in den DSSR bei.

Die Bioverfügbarkeit von NO - und damit die endothelabhängige Vasodilatation - ist nicht nur von dem Abbau durch ROS, sondern außerdem von der Bildung durch die eNOS abhängig. Der Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf ihre mRNA-Expression in DSSR soll im Anschluss diskutiert werden. Das gilt des Weiteren für den Vasokonstriktor ET-1, dessen erhöhte Produktion ebenfalls eine Ursache für eine beeinträchtigte Vasodilatation sein könnte.

5.2.3.3 Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Expression der eNOS in den Aorten hypertensiver DSSR

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) katalysiert die Bildung des endothelabhängigen Vasodilatators NO aus L-Arginin, der für die Regulierung des Gefäßtonus und damit des Blutdrucks außerordentlich wichtig ist. Die Expression der eNOS in den Endothelzellen erfolgt konstitutiv, dennoch ist eine Erhöhung der Transkription durch laminare Scherkräfte, die bei einer arteriellen Hypertonie erhöht sind, möglich (Noris, 1995; Arnal, 1999). Eine Aktivierung erfolgt z. B. durch Acetylcholin und andere Agonisten über spezifische Rezeptoren und i. d. R. über eine Erhöhung des Kalziumspiegels (Arnal, 1999). Eine Steigerung der Aktivität durch laminare Scherkräfte ist ebenfalls möglich (Rizzo, 1998).

In den Aorten salzgefütterter DSSR kann - im Vergleich zu denen normal gefütterter Ratten - zum einen ein verminderter Proteingehalt und zum anderen eine reduzierte Aktivität der eNOS beobachtet werden (Hayakawa, 1997; Ni, 1999; Cosentino, 2002; Zhou, 2004). Möglicherweise resultiert aus der damit einhergehenden verminderten NO-Bioverfügbarkeit die beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation in diesem Tiermodell (siehe 5.2.3.2).

Im Gegensatz zu den in der Literatur geschilderten Ergebnissen konnte in dieser Untersuchung kein Unterschied in der mRNA-Expression der eNOS zwischen den Aorten der Kontrollen und denen der salzgefütterten Placebo-Ratten ausgemacht werden (siehe 4.2.6.3).

Des Weiteren hatte die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der eNOS in den Aorten der DSSR. Im Gegensatz dazu konnten *In-vitro*-Untersuchungen in bovinen und humanen Endothelzellen zeigen, dass die Hemmung des Proteasoms durch nicht-toxische Dosen von MG132 in einer erhöhten eNOS-Expression und -Aktivität resultierten (Stangl, 2004; Meiners, 2006). Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass der erhöhte Gehalt der eNOS aus einer Akkumulation infolge eines reduzierten Abbaus durch das Ubiquitin-Proteasom-System resultierte (Stangl, 2004). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Zellkultur ergaben die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in isolierten dysfunktionellen Rattenaortenringen – anders als erwartet – eine reduzierte mRNA-Expression und reduzierte Proteingehalte der eNOS infolge der Hemmung

des Proteasoms durch MG132. Trotzdem konnte eine Verbesserung der TNF- α -induzierten endothelialen Dysfunktion beobachtet werden, die einer reduzierten Superoxidbildung und Expression von Präpro-ET-1 zugeschrieben wurde. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Zellkultur- und Organuntersuchungen lassen sich insofern erklären, als dass komplexe Organe wie die Aorta anders auf externe Stimuli reagieren, als kultivierte Endothelzellen (Lorenz, 2009). Allerdings konnten die *In-vitro*-Ergebnisse aus der Zellkultur in verschiedenen Tiermodellen bestätigt werden. So beobachteten Chade *et al.* in einem Schweinemodell der frühen Atherosklerose nach einer mehrwöchigen Applikation des Proteasominhibitors MLN-273 einen erhöhten Proteingehalt der renalen eNOS in Zusammenhang mit einer verbesserten renovaskulären endothelabhängigen Vasodilatation (Chade, 2005). Des Weiteren wurden die neuroprotektiven Effekte des Proteasominhibitors Bortezomib in einem Schlaganfall-Tiermodell möglicherweise u. a. durch eine erhöhte mRNA-Expression der eNOS in zerebralen Endothelzellen vermittelt (Zhang, 2006). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Chade *et al.* und Zhang *et al.* konnte in der hier vorliegenden Arbeit kein Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die eNOS Expression in der Aorta beobachtet werden. Möglicherweise sind die Unterschiede durch eine organspezifische Regulierung der eNOS infolge der Hemmung des Proteasoms erklärbar.

5.2.3.4 Bortezomib reduzierte die Expression von ET-1 in der Aorta tendenziell

Endothelin-1 agiert als potenter Vasokonstriktor und ist an der Regulierung des Blutdrucks beteiligt (Yanagisawa, 1988). Es wird von Endothelzellen gebildet und abluminal sezerniert (Wagner, 1992). Über die Rezeptoren ET_A und ET_B, die beide auf glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert sind, wirkt ET-1 nicht nur vasokonstriktorisch, sondern auch proliferativ und hypertroph (Schiffrin, 2005). Aufgrund der Tatsache, dass ROS potente Stimulatoren der Endothelin-1-Synthese in Endothelzellen darstellen (Kähler, 2000), soll an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Salz-induzierte Hypertonie in DSSR mit einem erhöhten oxidativen Stress assoziiert ist (Swei, 1997; Meng, 2002; Kushi, 2005).

Die erhöhte Produktion von ET-1 in den Gefäßen und Nieren von salzgefütterten DSSR resultiert in einer Erhöhung des vaskulären Widerstands und wird für die Entwicklung der Hypertonie in diesem Tiermodell mitverantwortlich gemacht (Barton, 1998; Schiffrin, 2005). Im Vergleich zu normal gefütterten weisen mit Salz gefütterte DSSR einen vierfach erhöhten Proteingehalt von ET-1 in der Aorta auf. Möglicherweise werden aufgrund dessen weniger ET-1-Rezeptoren in den glatten Muskelzellen der Gefäße exprimiert. Daraus resultiert eine verminderte Vasoreaktivität isolierter Aorten dieser Ratten nach Applikation von ET-1 (Barton, 1998) (siehe Abbildung 23).

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde im Vergleich zu den Kontrollratten eine dreifach erhöhte mRNA-Expression des Vasokonstriktors ET-1 in den Aorten der Placebo-Ratten festgestellt (siehe 4.2.6.4). Diese Erhöhung erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Dennoch soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die hier vorliegenden Ergebnisse denen von Barton *et al.* in ihrer Aussage ähneln. Auch hier ging die tendenzielle

Erhöhung von ET-1 in den Aorten mit einer tendenziell verminderten Vasokonstriktion nach Applikation von ET-1 in den isolierten Aortenringen einher (siehe 5.2.3.2).

Die Behandlung salzgefütterter DSSR mit dem Proteasominhibitor Bortezomib reduzierte die Expression von ET-1 in den Aorten im Vergleich zu den Placeboratten um ca. 40 %. Jedoch wurde auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht. Allerdings konnten sowohl *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Untersuchungen bestätigen, dass eine Hemmung des Proteasoms mit einem reduzierten Gehalt von ET-1 einhergeht. Nicht-toxische Dosen des Proteasominhibitors MG132 konnten die Expression von ET-1 in humanen Endothelzellen signifikant reduzieren (Meiners, 2006). Eine Verbesserung der TNF- α -induzierten endothelialen Dysfunktion in isolierten Rattenaortenringen infolge einer nicht-toxischen Proteasominhibition ging mit einer reduzierten mRNA-Expression von Präpro-ET-1 einher (Lorenz, 2009). Beide Untersuchungen beobachteten des Weiteren eine erhöhte Expression antioxidativer Enzyme bzw. eine reduzierte Superoxidbildung. Die Reduzierung von ET-1 war also mit einer Reduzierung des oxidativen Stresses assoziiert, der einen potenten Stimulator der ET-1-Synthese darstellt (Kähler, 2000). In vaskulären Endothelzellen konnte eine verminderte mRNA-Expression von Präpro-ET-1 und die reduzierte Sezernierung von ET-1 nach Applikation des Proteasominhibitors PSI beobachtet werden (Ohkita, 2002). Der Inhibitor supprimierte in Ratten die Entwicklung einer Desoxy-Corticosteron-Acetat-Salz-induzierten Hypertonie (Takaoka, 1998). Dieser anti-hypertensive Effekt der Proteasominhibition war mit einem verminderten ET-1-Gehalt in der Aorta assoziiert (Okamoto, 1998). Des Weiteren konnte in den schon beschriebenen Untersuchungen von Chade *et al.* eine reduzierte mRNA-Expression von Präpro-ET-1 in der Niere und weniger zirkulierendes ET-1 im Blut nachgewiesen werden. Diese, nach mehrwöchiger Applikation des Proteasominhibitors MLN-273 erbrachten Ergebnisse, waren mit einer verbesserten renovaskulären endothelabhängigen Vasodilatation assoziiert und nach Meinung der Autoren zumindest teilweise dafür verantwortlich (Chade, 2005).

5.2.3.5 Anti-inflammatorische Effekte von Bortezomib in dem Gefäßsystem hypertensiver DSSR

Hypertonie-induzierte vaskuläre Schäden gehen mit geringgradigen inflammatorischen Prozessen einher. Diese wiederum sind in die Entwicklung und Pathophysiologie der Hypertonie involviert (Savoia, 2006; Marchesi, 2008). Ein frühes Ereignis inflammatorischer Prozesse stellt die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten dar, die durch Adhäsionsmoleküle stimuliert werden (Weber, 1994; Kalogeris, 1999). Das zu den Adhäsionsmolekülen gehörende vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) wird durch Zytokin-aktivierte Endothelzellen auf deren Zelloberfläche exprimiert. Es vermittelt insbesondere die Rekrutierung von zirkulierenden Lymphozyten und deren Adhäsion an Endothelzellen in inflammatorisch geschädigten Gebieten (Osborn, 1989).

VCAM-1 wird nicht nur auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert, sondern auch von ihnen freigesetzt, so dass es als lösliches zirkulierendes VCAM-1 im Blut nachweisbar ist (Pigott, 1992). Hier stellt es einen Marker der endothelialen Aktivierung dar und reflektiert die VCAM-1-Expression in dem Gefäßsystem (Nakai, 1995). Auch in dem Blut

hypertensiver Patienten ist ein erhöhter Gehalt an löslichen VCAM-1 nachweisbar (DeSouza, 1997; Malmqvist, 2002).

Die mit einer arteriellen Hypertonie assoziierten laminaren Scherkräfte induzieren in vaskulären Zellen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, z. B. Superoxid (Chiu, 1997). ROS wiederum induzieren die Expression von VCAM-1 in vaskulären Endothelzellen (Marui, 1993). Möglicherweise ist daran der durch Zytokine aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt (Marui, 1993; Weber, 1994).

Die Salz-induzierte Hypertonie in DSSR ist nachweislich mit einem erhöhten oxidativen Stress, also der chronisch erhöhten Produktion von ROS, assoziiert (Swei, 1997; Meng, 2002; Kushiro, 2005). Wie hier gezeigt werden konnte, geht dies mit einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von VCAM-1 in den Aorten mit Salz gefütterter DSSR im Vergleich zu den normal gefütterten Kontrollratten einher (siehe 4.2.6.5). Auch Viel *et al.* konnten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von VCAM-1 in den Aorten salzgefütterter DSSR im Vergleich zu normotensiven braunen Norweger-Ratten beobachten (Viel, 2010).

Die Behandlung salzgefütterter DSSR mit dem Proteasominhibitor Bortezomib ging im Vergleich zu den Placebo-Ratten mit einer signifikant reduzierten mRNA-Expression von VCAM-1 in den Aorten einher. In Anbetracht der Tatsache, dass VCAM-1 einen Marker der endothelialen Aktivierung aufgrund inflammatorischer Geschehnisse darstellt (Nakai, 1995) kann man daraus schlussfolgern, dass die partielle Hemmung des Proteasoms mit anti-inflammatorischen Effekten einherging. Dies könnte auch eine Erklärung für die geringfügigen anti-hypertensiven Eigenschaften von Bortezomib darstellen, weil inflammatorische Prozesse in die Entwicklung und Pathophysiologie der Hypertonie involviert sind (Savoia, 2006; Marchesi, 2008).

Die verminderte mRNA-Expression von VCAM-1 ist möglicherweise auf einen reduzierten oxidativen Stress infolge der niedrig dosierten Proteasominhibition zurückzuführen, wie er bereits *in vitro* beobachtet werden konnte (Meiners, 2006). In im Anschluss an diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte ein reduzierter Superoxidgehalt in den Aorten der Bortezomib-behandelten Ratten nachgewiesen werden (Ludwig, 2009). Die verminderte Expression von VCAM-1 durch verschiedene Proteasominhibitoren in vaskulären Endothelzellen konnte auch schon *in vitro* beobachtet werden (Cobb, 1996; Kalogeris, 1999; Ludwig, 2009).

5.2.4 Die kardiovaskuläre Protektion des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib in DSSR war mit einer reduzierten Morbidität und Mortalität assoziiert

Die mit Salz gefütterten Dahl Salz-sensitiven Ratten der Placebo-Gruppe entwickelten innerhalb weniger Wochen eine ausgeprägte Hypertonie und in deren Folge eine kardiale Hypertrophie und Fibrose. Dieses gravierende Krankheitsbild war mit einer erhöhten Morbidität (äußerte sich z. B. als reduziertes Allgemeinbefinden und Gewichtsverlust) und

Mortalität assoziiert (siehe 4.2.1 und 4.2.2). Ob das reduzierte Körpergewicht der Placebo-Ratten auf eine reduzierte Futteraufnahme aufgrund des beeinträchtigten Allgemeinbefindens zurückzuführen ist, wurde nicht überprüft. Möglicherweise ist der insbesondere in dem ersten Versuch festgestellte Gewichtsverlust, der auch in anderen Untersuchungen in mit Salz gefütterten DSSR beobachtet werden konnte (Cosentino, 2002; Wendt, 2007; Wendt, 2009), auf die mit diesem Tiermodell assoziierten renalen Läsionen zurückzuführen (Rapp, 1985). Diese wurden im Zuge dieser Arbeit nicht eingehender untersucht. Dennoch gibt das signifikant erhöhte Nierengewicht der Placebo-Ratten einen Hinweis auf deren hyperplastisches Wachstum (siehe 4.2.3). Dieses resultiert aus einer gesteigerten renalen Exkretion infolge der erhöhten Natriumchlorid- und Wasseraufnahme (Churchill, 1992; Tsunooka, 1997).

Der niedrig dosierte Proteasominhibitor Bortezomib induzierte in salzgefütterten DSSR anti-hypertensive und anti-hypertrophe Effekte die in ihrer Summe in einer kardiovaskulären Protektion resultierten. In Folge dessen konnte im Vergleich zu den mit einem Placebo behandelten Ratten eine verringerte Morbidität und Mortalität beobachtet werden (siehe Tabelle 4). Während von den 22 Placebo-Ratten beider Versuche insgesamt vier Tiere starben, war dies nur bei einem von 22 mit Bortezomib behandelten Tieren der Fall. Außerdem zeigten von den eingeschlossenen 16 Placebo-Ratten insgesamt sieben Tiere ein reduziertes Allgemeinbefinden. Im Gegensatz dazu waren nur zwei von einundzwanzig Bortezomib-Ratten auffällig. Ein signifikant erhöhtes Körpergewicht der Bortezomib-Ratten im Vergleich zu den Placebo-Ratten konnte in dem ersten Versuch festgestellt werden (siehe 4.2.2). Ursächlich war insbesondere eine Gewichtsabnahme der Placebo-Ratten in den letzten Versuchstagen. Ein erhöhtes Körpergewicht der Bortezomib-Ratten aufgrund von stauungsbedingten Ödemen kann deswegen ausgeschlossen werden.

Die Applikation von 50 µg Bortezomib/kg Körpergewicht (entspricht ~ 0,36 mg/m² Körperoberfläche) lag deutlich unter der beschriebenen maximal tolerierten Dosis von 0,6 mg/m² in Ratten (Bross, 2004). Damit übereinstimmend konnten - neben den positiven Einflüssen des niedrig dosierten Proteasominhibitors Bortezomib auf Morbidität und Mortalität salzgefütterter DSSR - keine unerwünschten Nebenwirkungen infolge der Behandlung beobachtet werden. Es traten weder hämatologische noch hämatopoetische Veränderungen in den mit Bortezomib behandelten Dahl Salz-sensitiven Ratten auf (siehe 4.2.7).

5.3 Eignung des Tiermodells

Die Dahl Salz-sensitive Ratte stellt ein Tiermodell der Salz-sensitiven Hypertonie dar. Die Tiere entwickeln unter einer Salzdiät innerhalb weniger Wochen eine ausgeprägte Hypertonie und in Folge dessen eine Hypertonie- bzw. Druck-induzierte konzentrische kardiale Hypertrophie (Rapp, 1985). Die relativ schnelle Entwicklung der Hypertrophie ermöglicht einen kurzen Untersuchungs- und Behandlungszeitraum. Außerdem sind bis auf die Fütterung der Salzdiät keinerlei Interventionen wie Injektionen oder chirurgische

Eingriffe notwendig. Aufgrund dieser Vorteile wurde das Tiermodell der DSSR für die hier vorliegende Untersuchung ausgewählt.

In Folge der systemisch vorliegenden arteriellen Hypertonie in den DSSR ist es jedoch schwierig zu beurteilen, ob die insbesondere in dem zweiten Versuch beobachteten anti-hypertrophen Effekte des niedrig dosierten Proteasominhibitors aus einer unmittelbaren kardialen Wirkung resultierten oder der moderaten Reduzierung des arteriellen Blutdrucks zuzuschreiben waren (siehe 5.2.2.4). Allerdings bestand in den einzelnen Tieren keine positive Korrelation zwischen dem Blutdruck und dem Hypertrophieparameter Herzgewicht/Tibiallänge. Demzufolge kann man davon ausgehen, dass der Proteasominhibitor direkte anti-hypertrophe Effekte auf die Kardiomyozyten und anti-fibrotische Effekte auf die kardialen Fibroblasten ausübte. Um dies jedoch abschließend verifizieren zu können, müsste ein blutdruckunabhängiges Tiermodell verwendet werden, das keine systemische Druckerhöhung induziert, sondern nur eine lokale Druckerhöhung in dem Herzen bzw. linken Ventrikel. Dazu gehört das Tiermodell der transversalen Aortenkonstriktion (TAC) in Mäusen, das eine druckinduzierte kardiale Hypertrophie in Folge einer Konstriktion in dem Bereich des Aortenbogens simuliert (Rockman, 1991). Aufgrund der Tatsache, dass es sich hier um ein mechanisches Modell handelt, treten keine unerwünschten Nebenwirkungen auf, die eventuell mit pharmakologisch-induzierten kardialen Hypertrophien (z. B. Isoproterenol-induziert) assoziiert sind (Stanton, 1969; Friehs, 2008).

5.4 Eignung des Versuchsregimes

Während in der hier vorliegenden *In-vitro*-Untersuchung in neonatalen Rattenkardiomyozyten sehr deutliche anti-hypertrophe Effekte des Proteasominhibitors Bortezomib aufgezeigt werden konnten, stellten sich die Ergebnisse der *In-vivo*-Untersuchungen in Dahl Salz-sensitiven Ratten weniger eindeutig dar. Sicherlich trägt dazu zum einen die Tatsache bei, dass sich die Regulationsmechanismen zwischen Zellen und komplexen Organismen unterscheiden. Dennoch konnten andere Arbeitsgruppen *in vivo* beobachten, dass die Hemmung des Proteasoms die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie deutlich supprimieren und sogar revertieren kann (Depre, 2006; Hedhli, 2008; Stansfield, 2008). Dass sich das Ausmaß der anti-hypertrophen Effekte zwischen dieser Untersuchung in DSSR und denen von Depre *et al.*, Hedhli *et al.* und Stansfield *et al.* unterscheidet, lässt sich dadurch erklären, dass die Auswirkungen einer proteasomalen Hemmung von vielen Faktoren abhängig sind. Dazu gehören z. B. der verwendete Inhibitor und seine Dosis, Applikationsart und –dauer (Meiners, 2008 b) sowie das verwendete Tiermodell und damit unterschiedliche Genesen der kardialen Hypertrophie. Tatsächlich variierten all diese Faktoren in den verschiedenen Untersuchungen und erschwerten den Vergleich und die Beurteilung der Ergebnisse (siehe Tabelle 8). Beispielsweise wurden die DSSR zweimal wöchentlich über siebeneinhalb bzw. acht Wochen mit Bortezomib behandelt, während die anderen Arbeitsgruppen die verschiedenen Inhibitoren täglich, aber nur über fünf bis sieben Tage (Depre, 2006; Hedhli, 2008; Stansfield, 2008) injizierten. Außerdem wurde für die

Behandlung der DSSR bewusst eine niedrige Dosierung des Proteasominhibitors Bortezomib gewählt, um das Risiko der Apoptoseinduktion in Kardiomyozyten und anderen Zellen und damit die Toxizität zu minimieren. Diese intermittierende und niedrig-dosierte Behandlung der DSSR mit Bortezomib unterschied sich von den Behandlungsregimen der anderen drei Untersuchungen und reduzierte eventuell die potentiellen anti-hypertrophen Effekte des Proteasominhibitors. Allerdings konnten in den DSSR darüber hinaus auch positive Effekte in dem vaskulären System beobachtet werden. Die Summe der positiven Effekte im Herzen und Gefäßsystem der DSSR resultierte in einer kardiovaskulären Protektion und reduzierte die Morbidität und Mortalität in diesem Tiermodell der Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie.

5.5 Fazit der *In-vivo*-Untersuchungen und Perspektive des Proteasominhibitors Bortezomib für die Therapie der kardialen Hypertrophie

In der hier vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der niedrig dosierte Proteasominhibitor Bortezomib in dem *In-vitro*-Modell der neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRC) deutliche anti-hypertrophe Effekte ausübte. Dabei stellte sich Bortezomib im Vergleich zu dem Proteasominhibitor MG132 als ähnlich potent heraus. Obwohl in dem Zellkulturmodell der nRC die hypertrophe Antwort von adulten Ratten simuliert wird, kann ein *In-vitro*-Modell dem multifaktoriellen Geschehen *in vivo* nicht Rechnung tragen (Sugden, 1998). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die anti-hypertrophe Wirkung des Proteasominhibitors Bortezomib auch in Dahl Salz-sensitiven Ratten (DSSR), einem Tiermodell der Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie übersucht.

In den DSSR konnte die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie durch den niedrig dosierten Proteasominhibitor Bortezomib mäßig reduziert werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen weiterer Untersuchungen die parallel zu dieser Arbeit durchgeführt wurden (Depre, 2006; Hedhli, 2008; Stansfield, 2008). Diese Autoren konnten während einer Inhibition des Proteasoms durch verschiedene Inhibitoren deutliche anti-hypertrophe Effekte beobachten. Allerdings hemmten sie das Proteasom durch tägliche Applikationen der Inhibitoren anhaltend und möglicherweise aufgrund hoher Dosierungen auch deutlicher als in der hier vorliegenden Arbeit, in der eine intermittierende Hemmung durchgeführt wurde. Der Vorteil der niedrig dosierten und intermittierenden Proteasominhibition durch den zugelassenen Proteasominhibitor Bortezomib lag darin, dass - auch nach einer bis zu acht Wochen andauernden Applikation - toxische Nebenwirkungen ausgeschlossen werden konnten und außerdem eine vaskuläre Protektion induziert wurde. Die anti-hypertensiven, anti-inflammatorischen und im Anschluss an diese Arbeit nachgewiesenen anti-oxidativen Effekte von Bortezomib trugen in ihrer Summe nicht nur zu einer reduzierten kardialen Hypertrophie bei, sondern gingen außerdem mit einer verminderten Morbidität und Mortalität der DSSR einher.

Dennoch erscheint die beobachtete kardiovaskuläre Protektion vorerst nicht ausreichend, um in Bortezomib einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung der kardialen Hypertrophie zu sehen. Weitere Untersuchungen in einem blutdruckunabhängigen Tiermodell (z. B. TAC) mit modifizierter Dosis und Applikation (-sdauer) sollten folgen, um die anti-hypertrophe Wirkung des Proteasominhibitors Bortezomib zu verifizieren.

Dabei ist jedoch zu beachten, dass eine präventive, also andauernde Therapie der kardialen Hypertrophie durch die partielle Hemmung des Proteasoms aufgrund der zentralen Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in einer Vielzahl von zellulären Prozessen nicht in Frage kommt. Klinisch relevanter wäre die Behandlung mit einem Proteasominhibitor bei schon bestehender kardialer Hypertrophie. Allerdings kann man aus *In-vitro*-Untersuchungen von Meiners *et al.* schlussfolgern, dass bei Weiterbestehen pro-hypertropher Stimuli eine dauerhafte Therapie mit Proteasominhibitoren notwendig ist (Meiners, 2008 a). Wie schon angedeutet, dürfte dies jedoch nicht in Frage kommen. Während die genannten und die vorliegende tierexperimentellen Untersuchungen nach maximal acht Wochen Proteasominhibition anti-hypertrophe Effekte der Hemmung offenbarten, geht die langanhaltende Hemmung des Proteasoms möglicherweise u. a. mit einer Kardiotoxizität einher. In einigen klinischen Studien mit Patienten, die aufgrund einer malignen Erkrankung mit Bortezomib therapiert wurden, konnte nach langandauernder intermittierender hochdosierter Behandlung eine Herzinsuffizienz beobachtet werden (Voortman, 2006; Hacıhanefioglu, 2008). In einer weiteren Humanstudie unterschied sich die Kardiotoxizität von Bortezomib jedoch kaum von der hochdosierten Dexamethason-Gruppe (Yeh, 2009). Daher sollte das therapeutische Fenster der partiellen Proteasominhibition für die Behandlung der kardialen Hypertrophie in tierexperimentellen Langzeitstudien untersucht werden. Möglicherweise kann jedoch die kurzfristige Behandlung der kardialen Hypertrophie mit Bortezomib bzw. anderen Proteasominhibitoren in Kombination mit Antihypertonika einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen.

Eine weitere Intervention der kardialen Hypertrophie im Zusammenhang mit dem Ubiquitin-Proteasom-System ist eventuell durch die Beeinflussung der Ubiquitin-Ligasen E3 möglich. Diese vermitteln den selektiven Proteinabbau spezifischer Proteine (Hershko, 1998). So konnte z. B. die anti-hypertrophe Wirkung der E3-Ligasen Atrogin (Li, 2004) und MuRF1 (*muscle ring finger-1*) beobachtet werden (Arya, 2004). Im Gegensatz zu den Proteasominhibitoren ermöglicht die Beeinflussung bestimmter E3-Ligasen den veränderten proteasomalen Abbau von einzelnen spezifischen Proteinen.

6 Zusammenfassung

Mandy Fechner:

Der Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib (Velcade®) auf die kardiale Hypertrophie in der Dahl Salz-sensitiven Ratte

Hintergrund: Die kardiale Hypertrophie stellt einen Risikofaktor für diverse kardiovaskuläre Komplikationen, wie z. B. Herzinsuffizienz und Schlaganfall dar. Die derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten sind jedoch begrenzt, so dass ein großer Handlungsbedarf für die Entwicklung neuer Therapieverfahren besteht. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) stellt den wichtigsten nicht-lysosomalen Abbauweg intrazellulärer Proteine in eukaryotischen Zellen dar und spielt bei der Kontrolle von zahlreichen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Eine Hemmung des Proteasoms supprimierte *in vitro* die Hypertrophie von neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRC).

Ziel: In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der niedrig-dosierte Proteasominhibitor Bortezomib anti-hypertrophe Effekte in dem *In-vitro*-Modell der neonatalen Rattenkardiomyozyten und dem Tiermodell der Dahl Salz-sensitiven Ratte (DSSR) ausübt.

Methoden und Ergebnisse: Die *In-vitro*-Untersuchungen in nRC ergaben, dass Bortezomib die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms inhibierte. Dies war mit einer deutlichen Supprimierung des Isoproterenol-induzierten hypertrophen Wachstums von nRC assoziiert. So konnten sowohl eine Reduzierung der Zellfläche, als auch verringerte mRNA Expressionen der Hypertrophie-Markergene α -MHC und ANP beobachtet werden. Währenddessen konnte kein Einfluss auf die Zellviabilität ausgemacht werden.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde DSSR entweder der niedrig-dosierte Proteasominhibitor Bortezomib (50 μ g/kg KG) oder das Placebo NaCl injiziert. Die Behandlung erfolgte zweimal wöchentlich über acht (1. Versuch) bzw. siebeneinhalb Wochen (2. Versuch). Dabei konnten mäßige anti-hypertrophe Effekte von Bortezomib in der Druck-induzierten kardialen Hypertrophie festgestellt werden. Die Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und der Kollagenanteil in dem linken Ventrikel waren tendenziell verringert. Obwohl diese Effekte nicht signifikant waren, wurde das absolute und relative Herzgewicht (HG/TL) (tendenzielle bzw. signifikante Unterschiede in dem ersten bzw. zweiten Versuch) reduziert. Ein Einfluss auf die Hypertrophie- bzw. Fibrose-Markergene β -MHC und Col III (a1) konnte nicht beobachtet werden. Untersuchungen in dem vaskulären System der DSSR ergaben, dass der niedrig-dosierte Proteasominhibitor anti-hypertensiv wirkte. Der arterielle Blutdruck wurde tendenziell bzw. signifikant reduziert (1. bzw. 2. Versuch). Dies war mit einer im Trend verbesserten Vasoreaktivität in Antwort auf den Vasodilatator Acetylcholin bzw. den Vasokonstriktor ET-1 assoziiert. Weitere Analysen ergaben, dass Bortezomib die mRNA Expression des inflammatorischen Markers VCAM-1 signifikant reduzierte. Während die Expression von ET-1 tendenziell reduziert wurde, konnte kein Einfluss des Inhibitors auf die eNOS Expression beobachtet werden. Außerdem

konnten hämatologische und hämatopoetische Nebenwirkungen des Proteasominhibitors ausgeschlossen werden.

Schlussfolgerung: Der niedrig-dosierte Proteasominhibitor Bortezomib hatte eine anti-hypertrophe Wirkung auf kultivierte nRC. In hypertensiven DSSR vermittelte der niedrig-dosierte Proteasominhibitor kardiovaskulär protektive Effekte, die in ihrer Summe zu einer verminderten Morbidität und Mortalität und zu einer reduzierten kardialen Hypertrophie führten.

7 Summary

Mandy Fechner:

The Effect of the Proteasome Inhibitor Bortezomib (Velcade®) on the Cardiac Hypertrophy in Dahl Salt-Sensitive Rats

Background: The cardiac hypertrophy is a risk factor for cardiovascular complications, such as heart failure and stroke. The present therapeutic possibilities are limited, so there is urgent need for the development of new therapy approaches. The ubiquitin-proteasome-system (UPS) is the major nonlysosomal degradation pathway of intracellular proteins in eukaryotic cells. It plays an important role in the control of numerous cellular processes. Inhibition of the proteasome suppressed the hypertrophy *in vitro* of neonatal rat cardiomyocytes (nRC).

Purpose: In this study it was investigated whether the low-dose proteasome inhibitor bortezomib has anti-hypertrophic effects in the *in-vitro*-model of the neonatal rat cardiomyocytes as well as in the animal model of Dahl salt-sensitive rats (DSSR).

Methods and Results: The *in-vitro*-experiments in nRC demonstrated that bortezomib inhibits the chymotrypsin-like activity of the proteasome. This was associated with a pronounced suppression of isoproterenol-induced hypertrophic growth from nRC. Furthermore, a reduction of the cell surface, as well as decreased mRNA expression of the hypertrophic marker genes α -MHC and ANP was observed in cardiomyocytes. However, no influence on the cell viability was monitored.

In the second part of this study DSSR were injected with a low-dose of proteasome inhibitor bortezomib (50 μ g/kg body weight) or with saline as a placebo. The treatment occurred twice weekly over a period of eight weeks (1st set up) or 7.5 weeks (2st set up). Here anti-hypertrophic effects were determined through the pressure-induced cardiac hypertrophy by bortezomib. The cardiomyocyte cross-sectional area and the percent volume fraction of collagen in the left ventricle were slightly reduced. Although these effects were not significant, the absolute and relative heart weight (HW/TL) (slightly or significant differences in the 1st or 2st set up) were reduced. An influence on the hypertrophic or fibrosis marker genes β -MHC and Col III (a1) was not observed. Analysis of the vascular system from DSSR showed that low-dosed proteasome inhibition was anti-hypertensive. The arterial blood pressure was slightly or significant reduced (1st or 2st set up). This was associated with an improved vasoreactivity. Further analysis demonstrated that bortezomib reduced the mRNA expression of the inflammatory marker VCAM-1 significantly. On the other hand expression of ET-1 was slightly reduced and eNOS expression was not altered up on proteasome inhibition. In addition, hematological and hematopoietic side effects of the proteasome inhibition were nonexistent.

Conclusion: Low-dosed proteasome inhibitor bortezomib had an anti-hypertrophic effect on cultured nRC. In hypertensive DSSR the low-dosed proteasome inhibitor mediated cardiovascular protective effects resulted in a reduced morbidity and mortality as well as decreased cardiac hypertrophy.

8 Anhang

A Abkürzungsverzeichnis

ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
Ara-C	Cytosin- β -D-arabinofuranosid
BCA	Bicinchinonsäure
BNP	<i>brain natriuretic peptid</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
ChTL	Chymotrypsin-ähnlich
Col	Kollagen
C _T	Schwellenwert-Zyklus
dNTP	Desoxynukleotid Triphosphat
DSSR	Dahl Salz-sensitive Ratte
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
egr	<i>early growth response factor</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ET-1	Endothelin-1
FCS	fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HBSS	Hanks balancierte Salzlösung
HE	Hämatoxylin-Eosin
HG	Herzgewicht
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	humane Nabelschnur-Endothelzelle
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
I κ B	inhibitorisches I kappa B
KG	Körpergewicht
KH	Krebs-Henseleit
MCA	Methylcoumarin
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex

Anhang

α -MHC	<i>α-myosin heavy chain</i>
β -MHC	<i>β-myosin heavy chain</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBCS	Serum neugeborener Kälber
NF- κ B	nukleärer Faktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
nRC	neonatale Rattenkardiomyozyten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBMC	mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phenylephrin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
SAB	systolischer arterieller Blutdruck
SD	Standardabweichung
α -skA	α -skeletales Aktin
SHR	spontan hypertensive Ratte
TAC	transversale Aortenkonstriktion
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TL	Tibiallänge
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UW	<i>University of Wisconsin</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

B Literaturverzeichnis

Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A.A., Dick, L.R., Grenier, L., Klunder, J.M., Ma, Y.T., Plamondon, L., Stein, R.L. 1998. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998, 8:333-8.

Adams, J., Kauffman, M. 2004. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest.* 2004, 22:304-11.

Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., Elliott, P.J. 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999, 59:2615-22.

Arnal, J.F., Dinh-Xuan, A.T., Pueyo, M., Darblade, B., Rami, J. 1999. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci.* 1999, 55:1078-87.

Arpinati, M., Chirumbolo, G., Nicolini, B., Agostinelli, C., Rondelli, D. 2009. Selective apoptosis of monocytes and monocyte-derived DCs induced by bortezomib (Velcade). *Bone Marrow Transplant.* 2009, 43:253-9.

Artham, S.M., Lavie, C.J., Milani, R.V., Patel, D.A., Verma, A., Ventura, H.O. 2009. Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009, 52:153-67.

Arya, R., Kedar, V., Hwang, J.R., McDonough, H., Li, H.H., Taylor, J., Patterson, C. 2004. Muscle ring finger protein-1 inhibits PKC $\{\epsilon\}$ activation and prevents cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol.* 2004, 167:1147-59.

Bakker, E.N., van der Linden, P.J., Sipkema, P. 1997. Endothelin-1-induced constriction inhibits nitric-oxide-mediated dilation in isolated rat resistance arteries. *J Vasc Res.* 1997, 34:418-24.

Barry, S.P., Davidson, S.M., Townsend, P.A. 2008. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008, 40:2023-39.

Barton, M., d'Uscio, L.V., Shaw, S., Meyer, P., Moreau, P., Lüscher, T.F. 1998. ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension.* 1998, 31:499-504.

Berkers, C.R., Verdoes, M., Lichtman, E., Fiebiger, E., Kessler, B.M., Anderson, K.C., Ploegh, H.L., Ovaas, H., Galardy, P.J. 2005. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods.* 2005, 2:357-62.

Bishopric, N.H., Simpson, P.C., Ordahl, C.P. 1987. Induction of the skeletal alpha-actin gene in alpha 1-adrenoceptor-mediated hypertrophy of rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1987, 80:1194-9.

- Borissenko, L., Groll, M. 2007.** 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev.* 2007, 107:687-717.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., Murzin, A.G. 1995.** A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature.* 1995, 378:416-9.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., Schmidt, M. 1999.** The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol.* 1999, 1:221-6.
- Bross, P.F., Kane, R., Farrell, A.T., Abraham, S., Benson, K., Brower, M.E., Bradley S., Gobburu J.V., Goheer A., Lee S.L., Leighton J., Liang C.Y., Lostritto R.T., McGuinn W.D., Morse D.E., Rahman A., Rosario L.A., Verbois, S.L., Williams, G., Wang, Y.C. 2004.** Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2004, 10:3954-64.
- Bush, K.T., Goldberg, A.L., Nigam, S.K. 1997.** Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem.* 1997, 272:9086-92.
- Busk, P.K., Bartkova, J., Strøm, C.C., Wulf-Andersen, L., Hinrichsen, R., Christoffersen, T.E., Latella, L., Bartek, J., Haunsø, S., Sheikh, S.P. 2002.** Involvement of cyclin D activity in left ventricle hypertrophy in vivo and in vitro. *Cardiovasc Res.* 2002, 56:64-75.
- Cai, H., Harrison, D.G. 2000.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000, 87:840-4.
- Campbell, B., Adams, J., Shin, Y.K., Lefer, A.M. 1999.** Cardioprotective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1999, 31:467-76.
- Chade, A.R., Herrmann, J., Zhu, X., Krier, J.D., Lerman, A., Lerman, L.O. 2005.** Effects of proteasome inhibition on the kidney in experimental hypercholesterolemia. *J Am Soc Nephrol.* 2005, 16:1005-12.
- Chen, P.Y., Sanders, P.W. 1993.** Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Hypertension.* 1993, 22:812-8.
- Chiu, J.J., Wung, B.S., Shyy, J.Y., Hsieh, H.J., Wang, D.L. 1997.** Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997, 17:3570-7.
- Churchill, P.C., Churchill, M.C., Bidani, A.K. 1992.** Kidney cross transplants in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Am J Physiol.* 1992, 262:H1809-17.
- Ciechanover, A. 1994.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell.* 1994, 79:13-21.

- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L. 2000.** Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*. 2000, 22:442-51.
- Clerk, A., Aggeli, I.K., Stathopoulou, K., Sugden, P.H. 2006.** Peptide growth factors signal differentially through protein kinase C to extracellular signal-regulated kinases in neonatal cardiomyocytes. *Cell Signal*. 2006, 18:225-35.
- Cobb, R.R., Felts, K.A., Parry, G.C., Mackman, N. 1996.** Proteasome inhibitors block VCAM-1 and ICAM-1 gene expression in endothelial cells without affecting nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Eur J Immunol*. 1996, 26:839-45.
- Cosentino, F., Bonetti, S., Rehorik, R., Eto, M., Werner-Felmayer, G., Volpe, M., Lüscher, T.F. 2002.** Nitric-oxide-mediated relaxations in salt-induced hypertension: effect of chronic beta1-selective receptor blockade. *J Hypertens*. 2002, 20:421-8.
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L. 1996.** Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*. 1996, 65:801-47.
- Dahlmann, B. 2007.** Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem*. 2007, 8 Suppl 1:S3.
- Delic, J., Masdehors, P., Omura, S., Cosset, J.M., Dumont, J., Binet, J.L., Magdelénat, H. 1998.** The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF-alpha-initiated apoptosis. *Br J Cancer*. 1998, 77:1103-7.
- Depre, C., Wang, Q., Yan, L., Hedhli, N., Peter, P., Chen, L., Hong, C., Hittinger, L., Ghaleh, B., Sadoshima, J., Vatner, D.E., Vatner, S.F., Madura, K. 2006.** Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2006, 114:1821-8.
- DeSouza, C.A., Dengel, D.R., Macko, R.F., Cox, K., Seals, D.R. 1997.** Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1997, 10:1335-41.
- Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanović, S., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., Schild, H. 1998.** Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem*. 1998, 273:25637-46.
- Dreger, H. 2003.** Suppression der Hypertrophie kardialer Myozyten durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems. 2003. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Dreger, H., Westphal, K., Weller, A., Baumann, G., Stangl, V., Meiners, S., Stangl, K. 2009.** Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2009, 83:354-61.
- Dubiel, W., Ferrell, K., Rechsteiner, M. 1995.** Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. *Mol Biol Rep*. 1995, 21:27-34.

- Elliott, P.J., Zollner, T.M., Boehncke, W.H. 2003.** Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med.* 2003, 81:235-45.
- Frantz, S., Hu, K., Bayer, B., Gerondakis, S., Strotmann, J., Adamek, A., Ertl, G., Bauersachs, J. 2006.** Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB J.* 2006, 20:1918-20.
- Frey, N., Olson, E.N. 2003.** Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003, 65:45-79.
- Friebs, I. 2008.** Proteasome inhibition in hypertrophied myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008, 295:H1373-4.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. 1980.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980, 288:373-6.
- Glennon, P.E., Sugden, P.H., Poole-Wilson, P.A. 1995.** Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Br Heart J.* 1995, 73:496-9.
- Glickman, M.H., Ciechanover, A. 2002.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002, 82:373-428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D. 1998.** A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell.* 1998, 94:615-23.
- Gomes, A.V., Young, G.W., Wang, Y., Zong, C., Eghbali, M., Drews, O., Lu, H., Stefani, E., Ping, P. 2009.** Contrasting proteome biology and functional heterogeneity of the 20 S proteasome complexes in mammalian tissues. *Mol Cell Proteomics.* 2009, 8:302-15.
- Gray, C.W., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N. 1994.** PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol.* 1994, 236:7-15.
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T., Huber, R. 2005.** Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem.* 2005, 6:222-56.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R. 1997.** Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1997, 386:463-71.
- Guo, P., Nishiyama, A., Rahman, M., Nagai, Y., Noma, T., Namba, T., Ishizawa, M., Murakami, K., Miyatake, A., Kimura, S., Mizushige, K., Abe, Y., Ohmori, K., Kohno, M. 2006.** Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of left ventricular failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats: effects of angiotensin II blockade. *J Hypertens.* 2006, 24:1097-104.
- Hacihanefioglu, A., Tarkun, P., Gonullu, E. 2008.** Acute severe cardiac failure in a myeloma patient due to proteasome inhibitor bortezomib. *Int J Hematol.* 2008, 88:219-22.

Han, Y.P., Tuan, T.L., Wu, H., Hughes, M., Garner, W.L. 2001. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 2001, 114:131-139.

Hayakawa, H., Raij, L. 1997. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension.* 1997, 29:235-41.

Hedhli, N., Lizano, P., Hong, C., Fritzky, L.F., Dhar, S.K., Liu, H., Tian, Y., Gao, S., Madura, K., Vatner, S.F., Depre, C. 2008. Proteasome inhibition decreases cardiac remodeling after initiation of pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008, 295:H1385-93.

Hershko, A., Ciechanover, A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem.* 1992, 61:761-807.

Hershko, A., Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998, 67:425-79.

Hoppe, T. 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci.* 2005, 30:183-7.

Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., Kangawa, K. 2000. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension.* 2000, 35:19-24.

Huang, B.S., Leenen, F.H. 1994. Brain "ouabain" mediates the sympathoexcitatory and hypertensive effects of high sodium intake in Dahl salt-sensitive rats. *Circ Res.* 1994, 74:586-95.

Ichihara, S., Noda, A., Nagata, K., Obata, K., Xu, J., Ichihara, G., Oikawa, S., Kawanishi, S., Yamada, Y., Yokota, M. 2006 a. Pravastatin increases survival and suppresses an increase in myocardial matrix metalloproteinase activity in a rat model of heart failure. *Cardiovasc Res.* 2006, 69:726-35.

Ichihara, S., Obata, K., Yamada, Y., Nagata, K., Noda, A., Ichihara, G., Yamada, A., Kato, T., Izawa, H., Murohara, T., Yokota, M. 2006 b. Attenuation of cardiac dysfunction by a PPAR-alpha agonist is associated with down-regulation of redox-regulated transcription factors. *J Mol Cell Cardiol.* 2006, 41:318-29.

Iwaki, K., Sukhatme, V.P., Shubeita, H.E., Chien, K.R. 1990. Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J Biol Chem.* 1990, 265:13809-17.

Izumo, S., Lompré, A.M., Matsuoka, R., Koren, G., Schwartz, K., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. 1987. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions

during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest.* 1987, 79:970-7.

Izumo, S., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. 1988. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988, 85:339-43.

Jalil, J.E., Doering, C.W., Janicki, J.S., Pick, R., Clark, W.A., Abrahams, C., Weber, K.T. 1998. Structural vs. contractile protein remodeling and myocardial stiffness in hypertrophied rat left ventricle. *J Mol Cell Cardiol.* 1998, 20:1179-87.

Jentsch, S. 1992. Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *Trends Cell Biol.* 1992, 2:98-103.

Kähler, J., Mendel, S., Weckmüller, J., Orzechowski, H.D., Mittmann, C., Köster, R., Paul, M., Meinertz, T., Münzel, T. 2000. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J Mol Cell Cardiol.* 2000, 32:1429-37.

Kalogeris, T.J., Laroux, F.S., Cockrell, A., Ichikawa, H., Okayama, N., Phifer, T.J., Alexander, J.S., Grisham, M.B. 1999. Effect of selective proteasome inhibitors on TNF-induced activation of primary and transformed endothelial cells. *Am J Physiol.* 1999, 276:C856-64.

Karin, M., Ben-Neriah, Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000, 18:621-63.

Kato, M.F., Shibata, R., Obata, K., Miyachi, M., Yazawa, H., Tsuboi, K., Yamada, T., Nishizawa, T., Noda, A., Cheng, X.W., Murate, T., Koike, Y., Murohara, T., Yokota, M., Nagata, K. 2008. Pioglitazone attenuates cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension: role of activation of AMP-activated protein kinase and inhibition of Akt. *J Hypertens.* 2008, 26:1669-76.

Kelley, T.W., Alkan, S., Srkalovic, G., Hsi, E.D. 2004. Treatment of human chronic lymphocytic leukemia cells with the proteasome inhibitor bortezomib promotes apoptosis. *Leuk Res.* 2004, 28:845-50.

Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Castillo, V., Goldberg, A.L. 1999. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell.* 1999, 4:395-402.

Kisselev, A.F., Callard, A., Goldberg, A.L. 2006. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem.* 2006, 281:8582-90.

Kisselev, A.F., Goldberg, A.L. 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001, 8:739-58.

- Kloetzel, P.M., Ossendorp, F. 2004.** Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 2004, 16:76-81.
- Kloss, A., Meiners, S., Ludwig, A., Dahlmann, B. 2010.** Multiple cardiac proteasome subtypes differ in their susceptibility to proteasome inhibitors. *Cardiovasc Res.* 2010, 85:367-75.
- Knowles, J.W., Esposito, G., Mao, L., Hagaman, J.R., Fox, J.E., Smithies, O., Rockman, H.A., Maeda, N. 2001.** Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001, 107:975-84.
- Knowlton, K.U., Baracchini, E., Ross, R.S., Harris, A.N., Henderson, S.A., Evans, S.M., Glembotski, C.C., Chien, K.R. 1991.** Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene wh. *J Biol Chem.* 1991, 266:7759-68.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., Jentsch, S. 1999.** A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* 1999, 96:635-44.
- Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L., Finley, D. 2001.** The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell.* 2001, 7:1143-52.
- Komuro, I., Katoh, Y., Kaida, T., Shibasaki, Y., Kurabayashi, M., Hoh, E., Takaku, F., Yazaki, Y. 1991.** Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J Biol Chem.* 1991, 266:1265-8.
- Kumarapeli, A.R., Horak, K.M., Glasford, J.W., Li, J., Chen, Q., Liu, J., Zheng, H., Wang, X. 2005.** A novel transgenic mouse model reveals deregulation of the ubiquitin-proteasome system in the heart by doxorubicin. *FASEB J.* 2005, 19:2051-3.
- Kushiro, T., Fujita, H., Hisaki, R., Asai, T., Ichiyama, I., Kitahara, Y., Koike, M., Sugiura, H., Saito, F., Otsuka, Y., Kanmatsuse, K. 2005.** Oxidative stress in the Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens.* 2005, S. 27:9-15.
- Kuwahara, F., Kai, H., Tokuda, K., Takeya, M., Takeshita, A., Egashira, K., Imaizumi, T. 2004.** Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation? *Hypertension.* 2004, 43:739-45.
- Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., Pickart, C.M. 2002.** A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature.* 2002, 416:763-7.

- Larivière, R., Thibault, G., Schiffrin, E.L. 1993.** Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1993, 21:294-300.
- Levy, D. 1988.** Left ventricular hypertrophy. Epidemiological insights from the Framingham Heart Study. *Drugs*. 1988, 35 Suppl 5:1-5.
- LeWinter, M.M. 2005.** Functional consequences of sarcomeric protein abnormalities in failing myocardium. *Heart Fail Rev*. 2005, 10:249-57.
- Li, H.H., Kedar, V., Zhang, C., McDonough, H., Arya, R., Wang, D.Z., Patterson, C. 2004.** Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest*. 2004, 114:1058-71.
- Li, Y., Ha, T., Gao, X., Kelley, J., Williams, D.L., Browder, I.W., Kao, R.L., Li, C. 2004.** NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004, 287:H1712-20.
- Liao, Y., Takashima, S., Asano, Y., Asakura, M., Ogai, A., Shintani, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogita, H., Tomoike, H., Hori, M., Kitakaze, M. 2003.** Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res*. 2003, 93:759-66.
- Lindsten, K., Menéndez-Benito, V., Masucci, M.G., Dantuma, N.P. 2003.** A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat Biotechnol*. 2003, 21:897-902.
- Lindsten, K., Menéndez-Benito, V., Masucci, M.G., Dantuma, N.P., Kumarapeli, A.R., Horak, K.M., Zheng, H., Wang, X. 2006.** GFP reporter mouse models of UPS proteolytic function. *FASEB J*. 2006, 20:1027.
- Ling, Y.H., Liebes, L., Jiang, J.D., Holland, J.F., Elliott, P.J., Adams, J., Muggia, F.M., Perez-Soler, R. 2003.** Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2003, 9:1145-54.
- Liu, Y., Singh, R.J., Usa, K., Netzel, B.C., Liang, M. 2008.** Renal medullary 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in Dahl salt-sensitive hypertension. *Physiol Genomics*. 2008, 36:52-8.
- Lompré, A.M., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. 1984.** Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem*. 1984, 259:6437-46.
- Lorenz, M., Wilck, N., Meiners, S., Ludwig, A., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V. 2009.** Proteasome inhibition prevents experimentally-induced endothelial dysfunction. *Life Sci*. 2009, 84:929-34.
- Louhelainen, M., Vahtola, E., Forsten, H., Merasto, S., Kytö, V., Finckenberg, P., Leskinen, H., Kaheinen, P., Tikkanen, I., Levijoki, J., Mervaala, E. 2009.** Oral

levosimendan prevents postinfarct heart failure and cardiac remodeling in diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Hypertens.* 2009, 27:2094-107.

Lowes, B.D., Minobe, W., Abraham, W.T., Rizeq, M.N., Bohlmeier, T.J., Quaife, R.A., Roden, R.L., Dutcher, D.L., Robertson, A.D., Voelkel, N.F., Badesch, D.B., Groves, B.M., Gilbert, E.M., Bristow, M.R. 1997. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest.* 1997, 100:2315-24.

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

Lüscher, T.F., Raij, L., Vanhoutte, P.M. 1987. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension.* 1987, 9:157-63.

MacLellan, W.R., Schneider, M.D. 2000. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol.* 2000, 62:289-319.

Malmqvist, K., Wallén, H.N., Held, C., Kahan, T. 2002. Soluble cell adhesion molecules in hypertensive concentric left ventricular hypertrophy. *J Hypertens.* 2002, 20:1563-9.

Marchesi, C., Paradis, P., Schiffrin, E.L. 2008. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008, 29:367-74.

Marui, N., Offermann, M.K., Swerlick, R., Kunsch, C., Rosen, C.A., Ahmad, M., Alexander, R.W., Medford, R.M. 1993. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993, 92:1866-74.

Meiners, S., Dreger, H., Fechner, M., Bieler, S., Rother, W., Günther, C., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K. 2008 a. Suppression of cardiomyocyte hypertrophy by inhibition of the ubiquitin-proteasome system. *Hypertension.* 2008, 51:302-8.

Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., Krüger, E. 2003. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem.* 2003, 278:21517-25.

Meiners, S., Hocher, B., Weller, A., Laule, M., Stangl, V., Guenther, C., Godes, M., Mrozkiewicz, A., Baumann, G., Stangl, K. 2004. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome. *Hypertension.* 2004, 44:471-7.

Meiners, S., Laule, M., Rother, W., Guenther, C., Prauka, I., Muschick, P., Baumann, G., Kloetzel, P.M., Stangl, K. 2002. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation.* 2002, 105:483-9.

- 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 Radic Biol Med.* 2006, 40:2232-41.
- Meiners, S., Ludwig, A., Stangl, V., Stangl, K. 2008 b.** Proteasome inhibitors: poisons and remedies. *Med Res Rev.* 2008, 28:309-27.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H., Elofsson, M., Sin, N., Crews, C.M. 1999.** Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 96:10403-8.
- Meng, S., Roberts, L.J. 2nd, Cason, G.W., Curry, T.S., Manning, R.D. Jr. 2002.** Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and -resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002, 283:R732-8.
- Mercadier, J.J., Lompré, A.M., Wisniewsky, C., Samuel, J.L., Bercovici, J., Swynghedauw, B., Schwartz, K. 1981.** Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1981, 49:525-32.
- Meriin, A.B., Gabai, V.L., Yaglom, J., Shifrin, V.I., Sherman, M.Y. 1998.** Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem.* 1998, 273:6373-9.
- Morisco, C., Zebrowski, D.C., Vatner, D.E., Vatner, S.F., Sadoshima, J. 2001.** Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2001, 33:561-73.
- Murad, F., Waldman, S., Molina, C., Bennett, B., Leitman, D. 1987.** Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res.* 1987, 249:65-76.
- Muratani, M., Tansey, W.P. 2003.** How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003, 4:192-201.
- Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. 1989.** Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest.* 1989, 84:1693-700.
- Nagano, M., Higaki, J., Nakamura, F., Higashimori, K., Nagano, N., Mikami, H., Ogihara, T. 1992.** Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension.* 1992, 19:708-12.
- Nakagawa, O., Ogawa, Y., Itoh, H., Suga, S., Komatsu, Y., Kishimoto, I., Nishino, K., Yoshimasa, T., Nakao, K. 1995.** Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest.* 1995, 96:1280-7.

- Nakai, K., Itoh, C., Kawazoe, K., Miura, Y., Sotoyanagi, H., Hotta, K., Itoh, T., Kamata, J., Hiramori, K. 1995.** Concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlated with expression of VCAM-1 mRNA in the human atherosclerotic aorta. *Coron Artery Dis.* 1995, 6:497-502.
- Naujokat, C., Hoffmann, S. 2002.** Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest.* 2002, 82:965-80.
- Ni, Z., Oveisi, F., Vaziri, N.D. 1999.** Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. *Hypertension.* 1999, 34:552-7.
- Noris, M., Morigi, M., Donadelli, R., Aiello, S., Foppolo, M., Todeschini, M., Orisio, S., Remuzzi, G., Remuzzi, A. 1995.** Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res.* 1995, 76:536-43.
- Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanović, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., Schild, H. 1998.** Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95:12504-9.
- Ohkita, M., Takaoka, M., Kobayashi, Y., Itoh, E., Uemachi, H., Matsumura, Y. 2002.** Involvement of proteasome in endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Jpn J Pharmacol.* 2002, 88:197-205.
- Okamoto, H., Takaoka, M., Ohkita, M., Itoh, M., Nishioka, M., Matsumura, Y. 1998.** A proteasome inhibitor lessens the increased aortic endothelin-1 content in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1998, 350:R11-2.
- Orlowski, R.Z., Stinchcombe, T.E., Mitchell, B.S., Shea, T.C., Baldwin, A.S., Stahl, S., Adams, J., Esseltine, D.L., Elliott, P.J., Pien, C.S., Guerciolini, R., Anderson, J.K., Depcik-Smith, N.D., Bhagat, R., Lehman, M.J., Novick, S.C., O'Connor, O.A., Soignet, S.L. 2002.** Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol.* 2002, 20:4420-7.
- Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., Lobb, R. 1989.** Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 1989, 59:1203-11.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. 1987.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987, 327:524-6.
- Palmer, R.M., Moncada, S. 1989.** A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, 158:348-52.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., Maniatis, T. 1994.** The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 1994, 78:773-85.

- Papandreou, C.N., Daliani, D.D., Nix, D., Yang, H., Madden, T., Wang, X., Pien, C.S., Millikan, R.E., Tu, S.M., Pagliaro, L., Kim, J., Adams, J., Elliott, P., Esseltine, D., Petrusich, A., Dieringer, P., Perez, C., Logothetis, C.J. 2004.** Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2004, 22:2108-21.
- Peters, J.M., Cejka, Z., Harris, J.R., Kleinschmidt, J.A., Baumeister, W. 1993.** Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol.* 1993, 234:932-7.
- Pfaff, D. 2003.** Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung von Narbenbildung & Kapillarisation an chronisch ischämischen Rattenherzen. 2003. Dissertation. Medizinische Klinik, Universität Würzburg.
- Phillips, J.B., Williams, A.J., Adams, J., Elliott, P.J., Tortella, F.C. 2000.** Proteasome inhibitor PS19 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2000, 31:1686-93.
- Pigott, R., Dillon, L.P., Hemingway, I.H., Gearing, A.J. 1992.** Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992, 187:584-9.
- Poolman, R.A., Brooks, G. 1998.** Expressions and activities of cell cycle regulatory molecules during the transition from myocyte hyperplasia to hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 1998, 30:2121-35.
- Pye, J., Ardeshipour, F., McCain, A., Bellinger, D.A., Merricks, E., Adams, J., Elliott, P.J., Pien, C., Fischer, T.H., Baldwin, A.S. Jr., Nichols, T.C. 2003.** Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003, 284:H919-26.
- Rapp, J.P., Dene, H. 1985.** Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension.* 1985, 7:340-9.
- Rizzo, V., McIntosh, D.P., Oh, P., Schnitzer, J.E. 1998.** In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem.* 1998, 273:34724-9.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L. 1994.** Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994, 78:761-71.
- Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., Ross, J. Jr., Chien, K.R. 1991.** Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88:8277-81.

- Rupp, H., Berger, H.J., Pfeifer, A., Werdan, K. 1991.** Effect of positive inotropic agents on myosin isozyme population and mechanical activity of cultured rat heart myocytes. *Circ Res.* 1991, 68:1164-73.
- Sármán, B., Skoumal, R., Leskinen, H., Rysä, J., Ilves, M., Soini, Y., Tuukkanen, J., Pikkarainen, S., Lakó-Futó, Z., Sármán, B., Papp, L., deChâtel, R., Tóth, M., Ruskoaho, H., Szokodi, I. 2007.** Nuclear factor-kappaB signaling contributes to severe, but not moderate, angiotensin II-induced left ventricular remodeling. *J Hypertens.* 2007, 25:1927-39.
- Savoia, C., Schiffrin, E.L. 2006.** Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006, 15:152-8.
- Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Xiao, L., Pimentel, D.R., Singh, K., Colucci, W.S. 2002.** Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002, 34:379-88.
- Schiffrin, E.L. 2005.** Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2005, 43:19-29.
- Schirmer, H., Lunde, P., Rasmussen, K. 1999.** Prevalence of left ventricular hypertrophy in a general population; The Tromsø Study. *Eur Heart J.* 1999, 20:429-38.
- Schmidt, M., Kloetzel, P.M. 1997.** Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme. *FASEB J.* 1997, 11:1235-43.
- Seufert, W., Jentsch, S. 1992.** In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J.* 1992, 11:3077-80.
- Simons, S., Scheulen, M.E., Jaehde, U. 2006.** Bortezomib. *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 2006, 131:214-8.
- Simpson, P.C., Kariya, K., Karns, L.R., Long, C.S., Karliner, J.S. 1991.** Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. *Mol Cell Biochem.* 1991, 104:35-43.
- Somers, M.J., Mavromatis, K., Galis, Z.S., Harrison, D.G. 2000.** Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation.* 2000, 101:1722-8.
- Spinale, F.G. 2007.** Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007, 87:1285-342.
- Spinale, F.G., Coker, M.L., Bond, B.R., Zellner, J.L. 2000.** Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res.* 2000, 46:225-38.
- Stangl, K., Günther, C., Frank, T., Lorenz, M., Meiners, S., Röpke, T., Stelter, L., Moobed, M., Baumann, G., Kloetzel, P.M., Stangl, V. 2002.** Inhibition of the ubiquitin-

proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 291:542-9.

Stangl, V., Lorenz, M., Meiners, S., Ludwig, A., Bartsch, C., Moobed, M., Vietzke, A., Kinkel, H.T., Baumann, G., Stangl, K. 2004. Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.* 2004, 18:272-9.

Stansfield, W.E., Tang, R.H., Moss, N.C., Baldwin, A.S., Willis, M.S., Selzman, C.H. 2008. Proteasome inhibition promotes regression of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008, 294:H645-50.

Stanton, H.C., Brenner, G., Mayfield, E.D. Jr. 1969. Studies on isoproterenol-induced cardiomegaly in rats. *Am Heart J.* 1969, 77:72-80.

Sugden, P.H., Clerk, A. 2006. Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal.* 2006, 8:2111-24.

Sugden, P.H. 2003. Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. *Circ Res.* 2003, 93:1179-92.

Sugden, P.H., Bogoyevitch, M.A. 1996. Endothelin-1-Dependent Signaling Pathways in the Myocardium. *Trends Cardiovasc. Med.* 1996, 6:87-94.

Sugden, P.H., Clerk, A. 1998. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 1998, 76:725-46.

Swei, A., Lacy, F., DeLano, F.A., Schmid-Schönbein, G.W. 1997. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension.* 1997, 30:1628-33.

Takaoka, M., Itoh, M., Hayashi, S., Kuro, T., Matsumura, Y. 1999. Proteasome participates in the pathogenesis of ischemic acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999, 384:43-6.

Takaoka, M., Okamoto, H., Ito, M., Nishioka, M., Kita, S., Matsumura, Y. 1998. Antihypertensive effect of a proteasome inhibitor in DOCA-salt hypertensive rats. *Life Sci.* 1998, S. 63:PL65-70.

Tamamori-Adachi, M., Ito, H., Nobori, K., Hayashida, K., Kawauchi, J., Adachi, S., Ikeda, M.A., Kitajima, S. 2002. Expression of cyclin D1 and CDK4 causes hypertrophic growth of cardiomyocytes in culture: a possible implication for cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 296:274-80.

Teiger, E., Than, V.D., Richard, L., Wisnewsky, C., Tea, B.S., Gaboury, L., Tremblay, J., Schwartz, K., Hamet, P. 1996. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* 1996, 97:2891-7.

Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 2000, 19:94-102.

- Tian, N., Moore, R.S., Braddy, S., Rose, R.A., Gu, J.W., Hughson, M.D., Manning R.D. Jr. 2007.** Interactions between oxidative stress and inflammation in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007, 293:H3388-95.
- Tsunooka, K., Morita, H. 1997.** Effect of a chronic high-salt diet on whole-body and organ sodium contents of Dahl rats. *J Hypertens.* 1997, 15:851-6.
- Ugai, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Takai, S., Komi, N., Chung, C.H., Tanaka, K., Ichihara, A. 1993.** Purification and characterization of the 26S proteasome complex catalyzing ATP-dependent breakdown of ubiquitin-ligated proteins from rat liver. *J Biochem.* 1993, 113:754-68.
- Unger, T., Li, J. 2004.** The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004, 5 Suppl 1:S7-10.
- van der Heijden, J.W., Oerlemans, R., Lems, W.F., Scheper, R.J., Dijkmans, B.A., Jansen, G. 2009.** The proteasome inhibitor bortezomib inhibits the release of NFkappaB-inducible cytokines and induces apoptosis of activated T cells from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2009, 27:92-8.
- van Wamel, A.J., Ruwhof, C., van der Valk-Kokshoom, L.E., Schrier, P.I., van der Laarse, A. 2001.** The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* 2001, 218:113-24.
- Viel, E.C., Lemarié, C.A., Benkirane, K., Paradis, P., Schiffrin, E.L. 2010.** Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010, 298:H938-44.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. 1999.** The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 1999, 68:1015-68.
- Voortman, J., Giaccone, G. 2006.** Severe reversible cardiac failure after bortezomib treatment combined with chemotherapy in a non-small cell lung cancer patient: a case report. *BMC Cancer.* 2006, 6:129.
- Wagner, M., Mascareno, E., Siddiqui, M.A. 1999.** Cardiac hypertrophy: signal transduction, transcriptional adaptation, and altered growth control. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, 874:1-10.
- Wagner, O.F., Christ, G., Wojta, J., Vierhapper, H., Parzer, S., Nowotny, P.J., Schneider, B., Waldhäusl, W., Binder, B.R. 1992.** Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992, 267:16066-8.
- Wakatsuki, T., Schlessinger, J., Elson, E.L. 2004.** The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci.* 2004, 29:609-17.

- Waspe, L.E., Ordahl, C.P., Simpson, P.C. 1990.** The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest.* 1990, 85:1206-14.
- Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Ströbel, M., Ziegler-Heitbrock, H.W., Weber, P.C. 1994.** Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb.* 1994, 14:1665-73.
- Wendt, N., Schulz, A., Qadri, F., Bolbrinker, J., Kossmehl, P., Winkler, K., Stoll, M., Vetter, R., Kreutz, R. 2009.** Genetic analysis of salt-sensitive hypertension in Dahl rats reveals a link between cardiac fibrosis and high cholesterol. *Cardiovasc Res.* 2009, 81:618-26.
- Wendt, N., Schulz, A., Siegel, A.K., Weiss, J., Wehland, M., Sietmann, A., Kossmehl, P., Grimm, D., Stoll, M., Kreutz, R. 2007.** Rat chromosome 19 transfer from SHR ameliorates hypertension, salt-sensitivity, cardiovascular and renal organ damage in salt-sensitive Dahl rats. *J Hypertens.* 2007, 25:95-102.
- Wong, Y.Y., Handoko, M.L., Mouchaers, K.T., de Man, F.S., Vonk-Noordegraaf, A., van der Laarse, W.J. 2010.** Reduced mechanical efficiency of rat papillary muscle related to degree of hypertrophy of cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010, 298:H1190-7.
- Xu, J., Wang, S., Wu, Y., Song, P., Zou, M.H. 2009.** Tyrosine nitration of PA700 activates the 26S proteasome to induce endothelial dysfunction in mice with angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.* 2009, 54:625-32.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T. 1988.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988, 332:411-5.
- Yeh, E.T., Bickford, C.L. 2009.** Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol.* 2009, 53:2231-47.
- Ying, W.Z., Zhang, H.G., Sanders, P.W. 2007.** EGF receptor activity modulates apoptosis induced by inhibition of the proteasome of vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol.* 2007, 18:131-42.
- York, I.A., Goldberg, A.L., Mo, X.Y., Rock, K.L. 1999.** Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev.* 1999, 172:49-66.
- Zhang, L., Zhang, Z.G., Liu, X., Hozeska, A., Stagliano, N., Riordan, W., Lu, M., Chopp, M. 2006.** Treatment of embolic stroke in rats with bortezomib and recombinant human tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost.* 2006, 95:166-73.
- Zhao, X., White, R., Van Huysse, J., Leenen, F.H. 2000.** Cardiac hypertrophy and cardiac renin-angiotensin system in Dahl rats on high salt intake. *J Hypertens.* 2000, 18:1319-26.

Zhou, M.S., Jaimes, E.A., Raij, L. 2004. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension*. 2004, 44:186-90.

Zolk, O., Schenke, C., Sarikas, A. 2006. The ubiquitin-proteasome system: focus on the heart. *Cardiovasc Res*. 2006, 70:410-21.

Zwickl, P., Kleinz, J., Baumeister, W. 1994. Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol*. 1994, 1:765-70.

C Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in

Meiners, S., Dreger, H., **Fechner, M.**, Bieler, S., Rother, W., Günther, C., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K. 2008. Suppression of cardiomyocyte hypertrophy by inhibition of the ubiquitin-proteasome system. *Hypertension*. 2008, 51:302-8.

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

publiziert.

Wilck, N., **Fechner, M.**, Arias, A., Meiners, S., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K., Ludwig, A. Attenuation of early atherogenesis in LDLR-knockout mice by proteasome inhibition (Manuskript wird eingereicht)

D Danksagung

Ich möchte auf diesem Wege all jenen danken, ohne deren Zutun, Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht hätte erstellt werden können.

Mein besonderer Dank gilt Fr. PD Dr. Silke Meiners für die Überlassung des Themas und die umfassende Betreuung, die sicherlich das Ausmaß des Notwendigen überschritt.

Herrn Prof. Dr. N.-C. Jühr möchte ich für die unkomplizierte Bereiterklärung danken, meine Dissertation von Seiten der Veterinärmedizin zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Gert Baumann, Herrn Prof. Dr. Karl Stangl und Fr. Prof. Verena Stangl danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation im kardiologischen Forschungslabor (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte) zu erstellen, sowie für ihre fortwährende Unterstützung.

Weiterhin danke ich ganz besonders Fr. Dr. Antje Ludwig für ihr stets offenes Ohr, die anregenden Diskussionen und die über diese Arbeit hinausreichende, außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an Konni Buttke, Henryk Dreger, Thomas Düsterhöft, Mario Lorenz, Susanne Metzchow, Mino Moobed, Anke Stach, Angelika Vietzke, Andrea Weller, Angelika Westphal und insbesondere Wanda Michaelis, die mir alle hilfreich mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich möchte auch allen anderen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors danken: das außergewöhnlich freundliche Arbeitsklima half über die ein oder andere Unwägbarkeit hinweg.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern der FEM, insbesondere den Tierpflegerinnen und Fr. Dr. A. Stiglic. Fr. Dr. Gudrun Wibbelt (IZW) danke ich für die histologische Diagnostik und Hr. Prof. Dr. Kreuz (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, CBF, Charité - Universitätsmedizin Berlin) für die freundliche Bereitstellung der DSSR und der Blutdruckmessanlage.

Kera Westphal möchte ich für ihre Unterstützung in der „letzten Phase“ ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Beatrix und Jörg Schnorr, ohne deren Zutun ich meine Arbeit im Kardiologischen Forschungslabor nicht begonnen hätte - aus mehr als nur einem Grund ... Danke!

Zu guter Letzt bin ich Christian Korb und meiner Familie unendlich dankbar. Ihr wart immer für mich da und habt unbeirrbar an mich geglaubt. Danke!

E Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Zeuthen, den 19.08.2010

Mandy Fechner