

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib  
auf die Atherosklerose in der LDL-Rezeptor-defizienten Maus**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Aimara Arias  
aus Magdeburg

Datum der Promotion: 25. Juni 2017

## Zusammenfassung

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine fortschreitende inflammatorische Erkrankung der großen Blutgefäße, die morphologische Veränderungen der Intima mit Anhäufung von Lipiden, Bildung eines fibrösen Gewebes und Kalkablagerungen einschließt und zur Einengung des Gefäßlumens führt.

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist der wichtigste intrazelluläre Proteinabbaumechanismus eukaryontischer Zellen und spielt eine entscheidende Rolle im regulierten Abbau verschiedener proatherogen wirksamer Transkriptionsfaktoren. Die Proteasominhibition gilt als antiinflammatorisch wirksame Therapie und stellt demnach eine Option bei der Behandlung der Atherosklerose dar. Es ist bekannt, dass die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen in einem frühen Stadium der Atherosklerose hemmt.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung der niedrig dosierten Proteasominhibition mit Bortezomib auf die Entstehung eines fortgeschrittenen Atherosklerosestadiums in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen. Dosisfindungsstudien mit Ub<sup>G76V</sup>-GFP1 (grün fluoreszierendes Protein)-Mäusen zeigten, dass 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht ausreichen, um eine wirksame, aber nicht toxische Proteasominhibition in Mäusen hervorzurufen. Während der Entstehung fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen hatte die Behandlung mit Bortezomib keinen Einfluss auf die Plauefläche in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Genexpressionsanalysen mittels mRNA-Microarray zeigten, dass Gene mit atheroprotektivem Einfluss in diesem fortgeschrittenen Stadium unreguliert blieben, was das Ergebnis der gleich großen Plauelast in Kontroll- und Behandlungsgruppe erklärt.

Es wird diskutiert, dass die Behandlung mit Proteasominhibitoren aufgrund der unterschiedlichen Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems in den verschiedenen Atherosklerosestadien sowohl atheroprotektiv als auch proatherogen wirken kann. Die systematische Untersuchung der Wirkung proteasomaler Inhibition in einem Tiermodell könnte dabei helfen therapeutische Zeitfenster für eine antiinflammatorisch wirksame Behandlung der Atherosklerose mit Proteasominhibitoren zu identifizieren.

## Abstract

Atherosclerosis is a progressing inflammatory disease of the large blood vessels that causes accumulation of lipids, generation of a fibrous tissue and calcifications narrowing the vascular lumen. The ubiquitin-proteasome system is the most important mechanism of protein degradation in eukaryotic cells and plays a pivotal role in the regulated degradation of various proatherogenic transcription factors. Proteasome inhibition is considered an antiinflammatory therapy and therefore a therapeutic option against progression of atherosclerosis. It has been shown that low dose proteasome inhibition attenuates the development of atherosclerotic lesions in an early stage of atherosclerosis.

The present study examined the effect of low dose proteasome inhibition with bortezomib on the formation of an advanced stage of atherosclerosis in mice deficient for the LDL receptor. Dose finding studies with Ub<sup>G76V</sup>-GFP1 (green fluorescence protein) mice revealed that 50 µg bortezomib/ kg bodyweight represents a nontoxic but effective dose for proteasome inhibition in mice.

During formation of advanced atherosclerotic lesions the treatment with bortezomib showed no impact on the plaque area in LDLR<sup>-/-</sup> mice. Gene expression analysis using mRNA microarray showed that genes with atherogenic impact remained unregulated in this advanced stage explaining the result of equal plaque sizes in control and treatment group.

There is an ongoing debate about whether the treatment with proteasome inhibitors due to different ubiquitin-proteasome system activity in various stages of atherosclerosis can act atheroprotective as well as proatherogenic. Systematic investigation of the effect of proteasomal inhibition in an animal model could help to identify therapeutical windows for a potential antiinflammatory treatment of atherosclerosis.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.0</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Atherosklerose	1
1.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System	3
1.3	Das Ubiquitin-Proteasom-System in der Atherosklerose	8
1.4	Proteasominhibition in Tiermodellen der Atherosklerose	14
1.5	Zielsetzung	17
<b>2.0</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Die LDL-Rezeptor-defiziente Maus	18
2.1.1	Tierhaltung	18
2.1.2	Versuchsaufbau	19
2.1.3	Dosisfindung mithilfe von Ub <sup>G76V</sup> GFP1-Mäusen	21
2.1.4	Die Applikation von Bortezomib	27
2.1.5	Opferung	27
2.2	Die <i>En-Face</i> -Methode zur quantitativen Untersuchung atherosklerotischer Plaques in der Aorta	29
2.2.1	Aortenentnahme	29
2.2.2	Feinpräparation der Aorta	31
2.2.3	Sudan IV-Färbung	32
2.2.4	Fotografieren der Aorten	32
2.2.5	Bearbeitung der Aortenfotos	33
2.2.6	Plaquerflächenberechnung mithilfe der Schwellenwertbestimmung	34
2.3	Messung der proteasomalen Aktivität in murinem Lebergewebe	35
2.3.1	Gewebelyse	35
2.3.2	Messung der Proteasomaktivität mit fluorogenen Substraten	36
2.4	Quantitative Bestimmung von Cholesterin	37
2.4.1	Messprinzip der enzymatischen Cholesterinbestimmung	37
2.4.2	Messung des Cholesteringehalts in murinem Serum	38
2.4.3	Berechnung der Cholesterinkonzentration	39



2.5	Microarray-Genexpressionsanalyse	39
2.6	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	40
<b>3.0</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Dosisfindung für die Applikation von Bortezomib	41
3.2	Einfluss von Bortezomib auf das Körpergewicht	42
3.3	Serumcholesterolspiegel	44
3.4	Einfluss von Bortezomib auf die Proteasomaktivität	45
3.5	Einfluss von Bortezomib auf die Plaueflächen der Aorten	47
3.6	Genexpressionsanalyse (RNA-Microarray)	50
3.6.1	Niedrig dosiertes Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Expression oxidativ wirksamer Gene	51
3.6.2	Niedrig dosiertes Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Expression (anti-)inflammatorisch wirksamer Gene	51
3.6.3	Niedrig dosiertes Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Genexpression von Transporterproteinen des reversen Cholesteroltransports	53
3.6.4	Niedrig dosiertes Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Genexpression von Kollagen und kollagenspaltenden Matrixmetalloproteinasen	53
<b>4.0</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Antiinflammatorische und antioxidative Effekte der Proteasominhibition	58
4.2	Antiinflammatorische und antioxidative Effekte von Bortezomib sind in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium nicht mehr nachweisbar	61
4.3	Der Einfluss von Bortezomib auf die Plaquestabilität	66
4.4	Bortezomib fördert die Expression der Ubiquitin C-terminalen Hydroxylase L1	68
4.5	Der Einfluss von Bortezomib auf ein spätes Atherosklerosestadium	69
4.6	Geschlechtsspezifische Unterschiede	70
4.7	Zusammenfassung und Ausblick	71

<b>Schriftenverzeichnis</b>	73
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	91
<b>Tabellenverzeichnis</b>	92
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	93
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	97
<b>Lebenslauf</b>	98
<b>Publikationsliste</b>	99
<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen</b>	99
<b>Danksagung</b>	100

# 1.0 EINLEITUNG

## 1.1 Die Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine progressive Erkrankung der großen Blutgefäße<sup>1</sup>, die aufgrund inflammatorischer Prozesse stetig fortschreitet und zu einer Einengung des Gefäßlumens führt<sup>2</sup>. Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine variable Kombination von morphologischen Veränderungen der Arterienintima, die mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen und ferner mit der Bildung eines fibrösen Gewebes mit Kalkablagerungen einhergeht sowie mit Veränderungen der Media verbunden sein kann<sup>3</sup>. Weltweit starben im Jahr 2008 rund 17,3 Millionen Menschen und europaweit mehr als vier Millionen Menschen an Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen<sup>4</sup>. Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems waren mit 342.233 (57,5 % Männer, 42,5 % Frauen) von insgesamt 852.328 Todesfällen im Jahr 2011 die häufigste Todesursache in Deutschland. Zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen fielen im Jahr 2008 450 € pro Einwohner an Kosten an. Im Vergleich zu den anfallenden Kosten zur Behandlung von Neoplasien mit 220 € pro Einwohner war dies rund das Doppelte<sup>6</sup>.

Tabelle 1.1: Risikofaktoren der Atherosklerose<sup>7, 8</sup>

<b>Beeinflussbare Risikofaktoren</b>	<b>Nicht beeinflussbare Risikofaktoren</b>
Tabakkonsum	Alter
Stress	Männliches Geschlecht
Bewegungsmangel	Menopause
Übergewicht	Familiäre Disposition
Vermindertes HDL-Cholesterin	
Erhöhtes LDL-Cholesterin	
Erhöhte Triglyceride	
Diabetes mellitus	
Arterielle Hypertonie	

Atherosklerotische Veränderungen sind bereits im frühen Jugendalter feststellbar. Die chronische Erkrankung Atherosklerose bleibt lange Zeit asymptomatisch, selbst wenn die Stenose betroffener Gefäße fortschreitet und der Blutfluss durch langsames, aber stetiges Plaquewachstum behindert wird<sup>9</sup>. Als Folgeerkrankungen sind v. a. die koronare Herzkrankheit

(KHK), die zerebrovaskuläre Insuffizienz, Thrombose oder Embolie, sowie Apoplex und Myokardinfarkt zu nennen. In vielen Fällen führt eine Plaqueruptur mit anschließenden thrombotischen Prozessen zum akuten Infarkt mit tödlichem Ausgang<sup>10</sup>, aber Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen enden nicht immer tödlich. Im Jahr 2011 wurden in Deutschland 217.294 Menschen mit der Hauptdiagnose Myokardinfarkt vollstationär im Krankenhaus behandelt, und 55.286 Menschen verstarben an einem Myokardinfarkt, davon waren 55,6 % Männer und 44,4 % Frauen<sup>6</sup>. Es ist von großer Dringlichkeit, kardiovaskuläre Erkrankungen bis ins Detail zu erforschen, um neue Therapien und Präventionsmaßnahmen entwickeln zu können. Die derzeitige medikamentöse Therapie beschränkt sich auf die Behandlung traditioneller Risikofaktoren, die in Tabelle 1.1 zusammengefasst sind.

Risikofaktoren können als mechanische, chemische und physikalische Noxen in Erscheinung treten und die Pathogenese der Atherosklerose beschleunigen. Die Beeinträchtigung des Gefäßendothels durch verschiedene Noxen führt zu endogenem oxidativen Stress, der sowohl die oxidative Modifikation von *low-density lipoprotein* (LDL) als auch die sinkende Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) zur Folge hat. Die „*response-to-injury*“ Theorie geht davon aus, dass es sich bei der Atherogenese um einen inflammatorischen Vorgang handelt<sup>1</sup>, der durch eine Schädigung des vaskulären Endothels die Entstehung atherosklerotischer Plaques initiiert.

Der Verlust der endothelialen Barrierefunktion erleichtert die Retention der LDL-Partikel im Subendothelialraum. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wie z. B. *vascular adhesion molecule 1* (VCAM1) und *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM1) und die Sekretion chemotaktischer Substanzen wie *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) durch aktivierte Endothelzellen führen zur Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten, die vermehrt in die Intima migrieren können<sup>11, 12</sup>. Unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) differenzieren die eingewanderten Monozyten in der Intima zu Makrophagen<sup>13</sup>. Über den Scavenger-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche können Makrophagen fortwährend modifiziertes LDL aus dem Subendothelialraum aufnehmen und zu Schaumzellen werden. Die Plaqueentstehung wird durch die Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteinase und *reactive oxygen species* (ROS) in den eingewanderten Leukozyten weiter gefördert. Die Interaktion von Makrophagen und T-Lymphozyten induziert die Expression proinflammatorischer Zytokine, z. B. Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )<sup>14</sup>, die in der Lage sind, weitere Leukozyten zu dem entsprechenden Gefäßabschnitt zu rekrutieren. Es kommt außerdem zu einer Transformation glatter Muskelzellen von einem kontraktilen weniger proliferativ aktiven Phänotyp hin zu einem synthetischen proliferativ aktiveren Phänotyp, der in der Lage ist,

vermehrt extrazelluläre Matrix zu bilden<sup>15</sup>. Glatte Gefäßmuskelzellen migrieren aus der Media in die Intima und in den Subendothelialraum, wo sie zusammen mit der extrazellulären Matrix als fibröse Kappe Schaumzellen und extrazelluläres Lipid umschließen. Die Rekrutierung weiterer Leukozyten zusammen mit der Proliferation glatter Muskelzellen und der Synthese von Kollagen bedingt das fortschreitende Wachstum der atherosklerotischen Läsion. Verschiedene Stimuli innerhalb der Plaque, u. a. erhöhter oxidativer Stress, verzögerter Abtransport nekrotischer Zellen, erniedrigtes intrazelluläres Kalzium und erschöpfender Abbau von zellulärem Adenosintriphosphat (ATP), können die Nekrose von Gefäßzellen und eingewanderten inflammatorischen Zellen induzieren<sup>16</sup>. Unter anhaltenden inflammatorischen Bedingungen setzen Leukozyten Matrixmetalloproteinasen und Inhibitoren der Kollagensynthese frei, die eine Destabilisierung der Plaque bewirken und letztlich die Plaqueruptur zur Folge haben können<sup>17</sup>.

## 1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist das wichtigste Abbausystem intrazellulärer Proteine. Nahezu alle zum Abbau bestimmten Proteine werden durch das UPS degradiert<sup>18</sup>. Zellen ohne ein funktionierendes UPS sind nicht lebensfähig<sup>19, 20</sup>. Proteine werden im Rahmen des physiologischen Proteinturnovers entsprechend ihrer Halbwertszeit oder bei Schäden, Mutation und Synthesefehlern abgebaut. Missgefaltete oder beschädigte Proteine sind in ihrer Funktion eingeschränkt oder funktionsunfähig und können der Zelle schaden. Proteine, die fehlgefaltet oder ungefaltet sind, werden über hydrophobe Bindungsstellen von Chaperonen gebunden, um eine Aggregation dieser Proteine zu verhindern und sie gegebenenfalls wieder regelrecht zu falten. Gelingt dies nicht, werden sie als terminal missgefaltete Proteine gekennzeichnet und proteasomal abgebaut<sup>21</sup>. Die Synthese von Proteinen bringt in 30 % der Fälle defekte Substrate hervor, die über das Proteasom abgebaut werden<sup>22</sup>.

Auch wenn die Proteinqualitätskontrolle eine Hauptfunktion des UPS darstellt, geht seine Funktion im Organismus weit darüber hinaus, wie Tabelle 1.2 veranschaulichen soll.

Das UPS reguliert die Aktivität zahlreicher Proteine. Dies ist essentielle Voraussetzung für die Anpassung der Zelle an veränderte Bedingungen oder für den Ablauf definierter zellulärer Programme. Durch die Degradation von geschwindigkeitsbestimmenden Enzymen, Mediatorproteinen sowie Zellzyklus regulierenden Proteinen, wie z. B. Zyklinen, *cyclin*

*dependent kinase* (CDK)-Inhibitoren oder Zellzyklusregulatoren und Transkriptionsfaktoren, kann das UPS u. a. auf den Teilungszyklus oder die Zelldifferenzierung Einfluss nehmen<sup>23</sup>.

Tabelle 1.2: **Funktionsbereiche ausgewählter Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems** modifiziert nach Kisselev und Goldberg<sup>23</sup>

<b>Funktionsbereich</b>	<b>Substrat</b>
Inflammation	Inhibitor von kappa B (IκB), <i>Nuclear factor-kappa B-105</i> (NFκB-p105)
Antigenpräsentation <i>via major histocompatibility complex I</i> (MHC-I)	Vielzahl intrazellulärer Proteine
Regulation der Genexpression	Inhibitor von kappa B (IκB), <i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> (Nrf2), Proto-Onkoprotein jun (c-jun), Transkriptionsfaktor E2F1, β-Catenin
Proteinqualitätskontrolle	α1-Antitrypsin, <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> -Mutation ΔF508 (CFTRΔF508), Calmodulin
Apoptose	<i>BH3 interacting domain death agonist</i> (Bid), <i>B-cell lymphoma protein-2</i> (Bcl-2), <i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> (cIAP), <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> (XIAP), Caspase 3, Caspase 7
Onkogenese	Tumorsuppressor-Protein p53, Co-Faktor des Tumorsuppressor-Proteins p53 Bax Bax, Inhibitor von kappa B (IκB)
Zellzyklus	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i> (p27 <sup>Kip1</sup> ), Tumorsuppressor-Protein p21, Zykline

Das UPS kontrolliert die Konzentration bestimmter Zielproteine nicht nur direkt durch deren Proteolyse. Es gibt Hinweise darauf, dass Transkriptionsfaktoren nach Ausübung ihrer Funktion oder direkt an der Transkriptionsmaschinerie proteasomal abgebaut werden. Ubiquitinmoleküle in RNA-Polymerase II-Repressorkomplexen sowie eine periodische Assoziation von

Proteasomen an bestimmten Promotorregionen konnten nachgewiesen werden<sup>24</sup>. Proteolysevermittelte Schritte für die Freisetzung der RNA-Polymerase von Präinitiationskomplexen an den Promotoren könnten für die Begrenzung der Kopierdurchgänge und die Abschaltung der Transkriptionsmaschinerie sowie für die Reinigung der Promotoren nach Abschluss der Transkription mit verantwortlich sein<sup>24</sup>. Im Mittelpunkt des UPS steht das Proteasom, ein Enzymkomplex, der Proteine mit hoher Selektivität direkt an ihrer zellulären Wirkstätte zerstören kann<sup>25</sup>. Das 26 S-Proteasom ist eine multikatalytische Peptidase des Zytoplasmas, der perinukleären Region und des Nukleus eukaryontischer Zellen. Der Enzymkomplex ist aus einem zylindrischen Kernpartikel, dem 20 S-Proteasom (2100 kDa), und je einem 19 S-Regulatorkomplex (700 kDa) an Anfang und Ende aufgebaut. Das 20 S-Proteasom besteht aus zwei äußeren  $\alpha$ -Ringen und zwei inneren  $\beta$ -Ringen, die übereinanderliegend einen Hohlraum umschließen, in dem die Proteolyse stattfindet. Die  $\alpha$ -Ringe sind strukturgebend und die  $\beta$ -Ringe bilden das proteolytische Zentrum<sup>26</sup>. Drei der jeweils sieben Untereinheiten eines  $\beta$ -Ringes ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ) tragen die proteolytische Aktivität in Form von Threoninpeptidasen:  $\beta 1$  schneidet nach sauren Resten (*caspase-like* Aktivität),  $\beta 2$  schneidet nach basischen Resten (*trypsin-like* Aktivität) und  $\beta 5$  schneidet nach hydrophoben Resten (*chymotrypsin-like* Aktivität)<sup>27</sup>. Die Untereinheiten können konstitutiv oder induzierbar ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ ,  $\beta 5i$ ), z. B. durch Interferon  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), exprimiert werden und in jeweils unterschiedlicher Kombination charakteristische proteolytische Eigenschaften haben, d. h. spezifische Substrate gezielt abbauen<sup>28, 29</sup>. So kann sich der Organismus physiologischen Veränderungen schnell anpassen<sup>30</sup>. Die beiden äußeren  $\alpha$ -Ringe dienen als Bindeglied für den 19 S-Regulatorkomplex (PA 700), der den Zugang zum 20 S-Proteasom, der von den N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten verschlossen wird, öffnet. Über eine Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheiten unter Bindung eines 19 S-Regulatorkomplexes wird ein gerichteter Substrateintritt und Produktausgang gewährleistet. Außerdem entfaltet der 19 S-Regulatorkomplex ubiquitinierte Proteine und bereitet sie so auf die Degradation im proteolytischen Kern des Proteasoms vor. Beide Funktionen sind ATP-abhängig<sup>31</sup>.

Der selektive Abbau ausgewählter Proteine erfolgt durch eine Markierung der entsprechenden Proteine mit mindestens vier Ubiquitinmolekülen<sup>32</sup>. Beim Ubiquitinmolekül handelt es sich um ein hochkonserviertes 8 kDa schweres Polypeptid. Zu Beginn des Markierungsvorgangs aktiviert das Enzym E1 ein Ubiquitinmolekül und überträgt es unter ATP-Verbrauch auf das Ubiquitin-Transporter-Protein E2. Anschließend wird das Ubiquitinmolekül durch die Protein-Ligase E3, die das zum Abbau bestimmte Protein bindet, auf einen Lysinrest des gebundenen Proteins oder auf einen Lysinrest eines ans Protein gebundenen Ubiquitinmoleküls übertragen. Es entsteht eine Ubiquitinmolekülkette, die die Degradation des Proteins einleitet<sup>33</sup>.

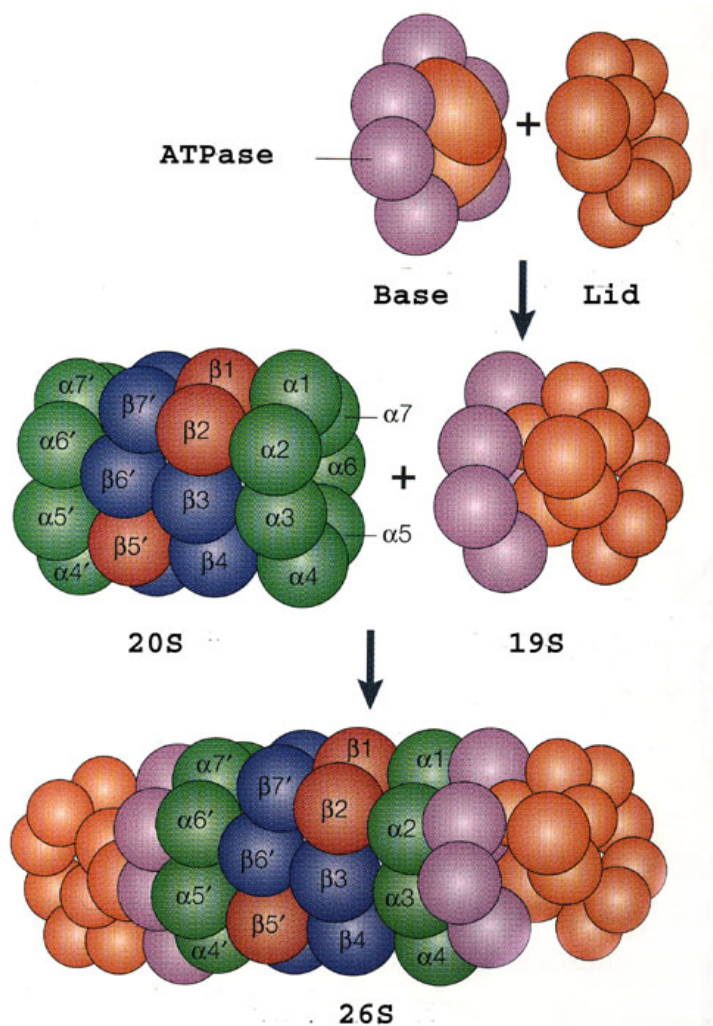


Abbildung 1.1: **Aufbau des 26 S-Proteasoms**<sup>30</sup>. Das 20 S-Proteasom besteht aus 28 Untereinheiten, die sich in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gliedern. Zusammen bilden sie vier heptamere Ringe und formen einen Zylinder. Das 26 S-Proteasom wird aus dem 20 S-Proteasom und dem 19 S-Regulatorkomplex gebildet, der dem 20 S-Proteasom von beiden Seiten aufsitzt. Der 19 S-Regulatorkomplex besteht aus Base- und Lid-Komponenten (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Peter-Michael Klotzel und der Nature Publishing Group).

Es ist anzunehmen, dass in eukaryontischen Zellen hunderte verschiedene E3-Protein-Ligasen existieren, die durch bestimmte Degradationssignale der Proteine eine Ubiquitinierung derselben gewährleisten<sup>23</sup>. Bevor die polyubiquitinierten Proteine dem Abbau zugeführt werden, erfolgt die Abspaltung der Ubiquitin-Markierung, und die freien Ubiquitinmoleküle stehen wieder zur Kennzeichnung anderer Proteine bereit<sup>34</sup>.

Lange Zeit war die komplexe Funktion des Proteasoms unklar und konnte erst mithilfe synthetisch hergestellter Proteasominhibitoren aufgeklärt werden. Im Verlauf der letzten Jahre wurden diese zum Medikament weiterentwickelt<sup>23</sup>. Der Großteil bekannter Proteasominhibitoren



sind direkte Inhibitoren, die an den Substratbindestellen der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten binden. Andere Proteasominhibitoren treten in Verbindung mit den  $\alpha$ -Untereinheiten und beeinflussen so die Durchlässigkeit hin zum katalytischen Zentrum des Proteasoms. Zu den direkten Proteasominhibitoren gehören Peptidvenylsulfone, Nicht-Peptide (z. B. Lactacystin), Salinosporamide A und B, Peptidepoxyketone, TMC-95, Boronate und Peptidaldehyde. Sie bilden reversible kovalente Hemiacetalbindungen mit den Hydroxylgruppen des Threonins an den katalytischen Untereinheiten aus. Bortezomib (Velcade<sup>®</sup>) gehört zu den Boronaten und ist sowohl stabil als auch hochselektiv<sup>35</sup>. Während Peptidaldehyde zusätzlich Serin- und Cysteinproteasen hemmen, zeichnen sich Boronate außerdem durch eine höhere Wirksamkeit im Vergleich zu den Peptidaldehyden aus<sup>23</sup>. Dies sind Gründe für die Wahl von Bortezomib in der vorliegenden Arbeit. In genügend hoher Dosierung sind diese Proteasominhibitoren in der Lage alle drei katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten zu blockieren. Bereits die Hemmung der *chymotrypsin-like* Aktivität reicht aber aus, um den Großteil des Proteinabbaus zu hemmen<sup>18</sup>. *In vitro* und *in vivo* kann man zwischen den verschiedenen Proteasominhibitoren einen unterschiedlichen Inhibitionsgrad der katalytischen Untereinheiten beobachten, je nachdem wie gut sie an die Bindestellen passen<sup>36</sup>. Die niedrig dosierte reversible Hemmung des Proteasoms mit Bortezomib führte in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen (LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse) unter Hochcholesteroldiät zu einer verminderten Proteasomaktivität von 67,2 %, gemessen in Leberlysaten<sup>37</sup>. Bortezomib findet bereits klinische Anwendung als Zytostatikum bei der Behandlung des multiplen Myeloms<sup>38</sup>. Die Adhäsion maligner Myelomzellen an Stromazellen des Knochenmarks triggert die Transkription und Sekretion von Zytokinen (Interleukin 6, *insulin-like growth factor*, *vascular endothelial growth factor*), die sowohl die Proliferation der Zellen des multiplen Myeloms induzieren, als auch die durch Chemotherapie herbeizuführende Apoptose der Tumorzellen verhindern<sup>39, 40</sup>. Der Proteasominhibitor Bortezomib hemmt die Adhäsion der Zellen des multiplen Myeloms an Stromazellen des Knochenmarks und blockiert die Sekretion multipler Zytokine. Die Proliferation und die Arzneimittelresistenz der Krebszellen des multiplen Myeloms sind an die Aktivität des Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B gekoppelt. Bortezomib reguliert die NF $\kappa$ B-Aktivierung herunter und erhöht dadurch die zytotoxische Wirkung einer Chemotherapie<sup>41</sup>. Verschiedene Tumorzelllinien zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Reaktion auf einzelne Proteasominhibitoren, obwohl die *chymotrypsin-like* Aktivität des Proteasoms gleichstark gehemmt wird. So sind beispielsweise die Zellen des multiplen Myeloms dem Proteasominhibitor Bortezomib sehr zugänglich<sup>42, 43</sup>. Bortezomib und Carfilzomib, Proteasominhibitoren der zweiten Generation, sind von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen<sup>35</sup>. Bortezomib ist außerdem von

der FDA für die Therapie des Mantelzellymphoms zugelassen<sup>44</sup>. Dabei handelt es sich um hämatologische Tumorerkrankungen. Präklinische Studien zeigten vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung solider Tumoren mit Bortezomib, allerdings konnten in klinischen Studien keine vergleichbaren Ergebnisse reproduziert werden. Die Monotherapie mit Bortezomib zeigte bei der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms<sup>45</sup>, des Melanoms<sup>46</sup> und des Prostatakarzinoms<sup>47</sup> keine Wirkung. Die zweite Generation von Proteasominhibitoren wie z. B. Carfilzomib, Oprozomib, Delanzomib und MLN-9708 sind selektiver und könnten in geringerer Dosis bei gleicher Wirksamkeit und weniger unerwünschten Wirkungen eingesetzt werden. Eine endgültige Entscheidung bezüglich der Wirksamkeit von Proteasominhibitoren bei der Behandlung von soliden Tumoren steht noch aus, dennoch scheint die Monotherapie mit Proteasominhibitoren nur begrenzten Erfolg zu zeigen, so dass die Entwicklung von Behandlungsstrategien im Vordergrund steht, die sowohl das Proteasom als auch andere Signalwege zum Ziel haben.<sup>48</sup> Das UPS ist in die Entstehung von zahlreichen Krankheiten involviert, dazu gehören nicht nur Tumorerkrankungen (z. B. Kolonkarzinom, Zervixkarzinom, Nierenzellkarzinom<sup>49</sup> und multiples Myelom<sup>50</sup>), sondern auch neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Morbus Alzheimer, amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Parkinson und Chorea Huntington<sup>51</sup>), Myopathien (z. B. Muskeldystrophie Typ Duchenne oder Typ Becker<sup>52</sup> und die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie<sup>53</sup>) und die Atherosklerose. In verschiedenen Stadien der Atherosklerose spielt das UPS eine entscheidende Rolle, demnach könnte die Proteasominhibition eine mögliche Therapie bei der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen. Mögliche Ansatzpunkte für die antiatherogene Wirkung des Proteasominhibitors Bortezomib werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

### **1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System in der Atherosklerose**

Bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose nehmen verschiedene biologische Prozesse, die über das UPS reguliert werden, eine entscheidende Rolle ein. Dazu gehören der Vorgang der Inflammation, der Proliferation und der Apoptose. Somit ist das UPS potentieller Angriffspunkt für neue Therapieansätze bei der Prävention und Behandlung von Atherosklerose. Die Dysfunktion und Aktivierung des Endothels, die sich pathophysiologisch als ansteigender oxidativer Stress und Entzündungszeichen präsentieren, kennzeichnen den Beginn der Atherosklerose<sup>54, 55</sup>. Die verminderte Fähigkeit zur Vasorelaxation als Ausdruck der

endothelialen Dysfunktion steht in direktem Zusammenhang mit NO als zentralem Molekül. Eine sinkende NO-Produktion und der vermehrte Verbrauch von NO vor Ankunft an dessen physiologischen Wirkstätten führen zum Abfall der NO-Bioverfügbarkeit im Gefäß. In den sogenannten Caveolae, kolbenförmigen Invaginationen der Plasmamembran, befindet sich, blockiert in seiner Funktion durch das Caveolae-Membranprotein Caveolin 1, die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die als Hauptquelle für NO gilt. Endothelzellen unter Behandlung mit Proteasominhibitoren zeigen einen Anstieg der *De-novo*-Synthese von NO und einen erhöhten intrazellulären eNOS-Spiegel ohne eine gleichzeitig veränderte Expression von Caveolin 1<sup>56</sup>. Dem Anstieg der eNOS-Aktivität parallel zur Verbesserung der Endothelfunktion könnte demzufolge eine stöchiometrische Verschiebung zwischen eNOS und Caveolin 1 mit relativ weniger eNOS in hemmender Verbindung mit Caveolin 1 zu Grunde liegen. Die Auflösung der hemmenden Verbindung von eNOS mit Caveolin 1 und die anschließende eNOS-Aktivierung findet unter physiologischen Bedingungen bei übermäßiger  $Ca^{2+}$ -/ Calmodulin- und Akt-induzierter Phosphorylierung von eNOS statt<sup>57</sup>. Im Gegensatz dazu führt die Dephosphorylierung von eNOS durch die Proteinphosphatase 2A zu einer verminderten eNOS-Aktivität. Die Translokation der Proteinphosphatase 2A aus dem Zytosol in die Zellmembran und die dort mögliche Bindung zu eNOS folgt auf die Ubiquitinierung der Proteinphosphatase hin<sup>58</sup>. Die eNOS-Aktivität ist weiterhin abhängig von der Verfügbarkeit des enzymatischen Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH4). Die proteasomale Degradation von Guanosin 5-Triphosphat-Cyclohydrolase (GTPCH) unter hyperglykämischen Bedingungen, wie bei Diabetes mellitus, führt zu einem Absinken der Bioverfügbarkeit von BH4<sup>59</sup>. Unter oxidativem Stress entsteht vermehrt 4-Hydroxynonenal (4-HNE), das die Aktivität und das Vorkommen von GTPCH über den proteasomalen Abbau ebenfalls vermindern kann und darüber auch einen Abfall von BH4 zur Folge hat. Ohne BH4 bildet eNOS Superoxidanionen anstatt NO. Dieser Vorgang wird als eNOS-Entkopplung bezeichnet und bewirkt eine schnell sinkende NO-Bioverfügbarkeit, weil kein NO mehr produziert wird und vorhandenes NO durch vermehrte Superoxidanionen zu Peroxynitrit umgewandelt wird<sup>60, 61</sup>. Das Enzym *soluble guanyl cyclase* (sGC), welches die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen vermittelt, wird ebenfalls durch das UPS reguliert. sGC wird im Zytosol durch NO aktiviert und ist verantwortlich für die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). cGMP führt über verschiedene Mechanismen zur Relaxation von glatten Gefäßmuskelzellen, also zur Vasodilatation. Das Proteasom reguliert über die Degradation nach Ubiquitinierung durch den C-Terminus des Hsc70-interagierenden Proteins (CHIP) das Vorkommen von sGC in

der Zelle<sup>62</sup>. Das UPS kann den Prozess der reversiblen Endotheldysfunktion auf mehreren Ebenen entscheidend mit beeinflussen.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB durch erhöhten oxidativen Stress oder proinflammatorische Stimuli ausgehend von Zytokinrezeptoren, z. B. Tumornekrosefaktor- und Interleukin-1-Rezeptor (TNFR und IL-1R), und Mustererkennungsrezeptoren, z. B. Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4)<sup>63</sup>, kann inflammatorische Signalkaskaden (TNFα- und IL-1β-Signalwege, Induktion von VCAM, ICAM, MCP-1 und C-reaktivem Protein) auslösen und ist charakteristisch für den kanonischen Aktivierungsweg von NFκB. Die Degradation von IκB, dem Inhibitor von NFκB, durch das UPS trägt entscheidend zur kanonischen Aktivierung von NFκB bei. Die katalytisch aktive IκB-Kinase β (IKKβ) und die regulatorische Untereinheit IKKγ (NEMO) des IκB-Kinase-Komplexes bewirken die Phosphorylierung von IκB<sup>64</sup>. In phosphorylierter Form vorliegend wird IκB ubiquitiniert und anschließend vom 26 S-Proteasom degradiert. Bei kanonisch aktiviertem NFκB handelt es sich überwiegend um RelA (p65), das in den Zellkern wandern kann und dort die Expression proinflammatorischer Mediatoren verstärkt<sup>63, 65</sup>. Die Freisetzung und Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB kann verhindert werden, indem der zytokinabhängige Abbau des Inhibitorproteins IκBα durch das UPS mittels Proteasominhibition blockiert wird.

Beim nicht-kanonischen Signalweg wird das Vorläuferprotein p100 durch kontrollierten Abbau zum Molekül p52. Der entscheidende Schritt in diesem Signalweg ist die Aktivierung der IκB-Kinase α (IKKα) durch die *NFκB-inducing kinase* (NIK)<sup>66, 67</sup>. IKKα phosphoryliert p100 an zwei Serinresten, woraufhin dieses polyubiquitiniert wird und anschließend in einer partiellen Proteolyse aus p100 das Molekül p52 entsteht. Dieses transloziert als Heterodimer, meist mit RelB, in den Zellkern zur Transkriptionsregulation<sup>68</sup>. Der nicht-kanonische Signalweg wird durch Mitglieder der TNF-Zytokin-Familie wie *cluster of differentiation 40 ligand* (CD40-Ligand), *B cell activating factor of the TNF family* (BAFF) und Lymphotoxin β2 induziert<sup>69</sup>.

Der Transkriptionsfaktor NFκB wird nicht nur in seiner Aktivität durch das Proteasom reguliert, auch die Bildung von NFκB erfolgt in Abhängigkeit vom Proteasom. Die p50-Untereinheit von NFκB wird durch die limitierte Proteolyse des Vorläuferproteins p105 im Proteasom synthetisiert<sup>70</sup>. Eine vollständige Blockade von NFκB-vermittelten inflammatorischen Reaktionen, wie die Expression proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle sowie die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), kann durch Proteasominhibition in Endothelzellen und Makrophagen erreicht werden. Das UPS ist als indirekter Aktivator des NFκB-Signalweges an der Atherogenese beteiligt.

Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. VCAM und ICAM) und die steigende Migration von Leukozyten in die Intima sowie die gesteigerte Anlockung von weiteren Entzündungszellen gilt als entscheidender Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose. Die Behandlung mit einem niedrig dosierten Proteasominhibitor erniedrigte die durch Hypertension induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen in der Aorta von hypertensiven Ratten, was weniger einer tatsächlich wirksamen Hemmung des Proteasoms zuzuschreiben war, als vielmehr einer Reduktion des oxidativen Stresslevels<sup>71</sup>. Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer Behandlung von hypercholesterinämischen Schweinen mit hoch dosierten Proteasominhibitoren. Die chronische Hemmung des Proteasoms *in vivo* führte in den Koronararterien dieser Tiere zu einer vermehrten Expression von VCAM1 und E-Selektin, zu einem Anstieg der Makrophagenakkumulation und zu einer Verdickung der Koronarintima. Die Kontrollgruppe, d. h. die Tiergruppe unter Normaldiät, zeigte bei der Behandlung mit Proteasominhibitoren über drei Monate eine Verschlechterung der endothelabhängigen Vasorelaxation und einen Anstieg des oxidativen Stresslevels trotz hochregulierter eNOS<sup>72</sup>. Studien zur Proteasominhibition zeigen Ergebnisse in entgegengesetzte Richtungen. Dieser Dualismus steht in Zusammenhang mit oxidativem Stress und dessen Einfluss auf die Proteasomaktivität. Ein niedriges oxidatives Stresslevel erhöht die Proteasomaktivität, und hoher oxidativer Stress hat einen hemmenden Effekt auf selbige<sup>73, 74</sup>. Umgekehrt wird der endotheliale Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress unter niedrig dosierter Proteasominhibition gestärkt, und eine hochdosierte Proteasominhibition unterstützt die Zunahme von oxidativem Stress<sup>53, 75</sup>. Die Wechselwirkungen zwischen oxidativem Stress, Inflammation und Endothelfunktion stehen unter regulativer Kontrolle des UPS, d. h. kleinste Veränderungen in der Aktivität dieses Systems können bedeutende und vor allem unterschiedliche Folgen haben<sup>76</sup>.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch das UPS reguliert wird und zur antioxidativen Abwehr der Zelle gehört, ist Nrf2. Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2* (Nrf2) wird bei geringem oxidativen Stress in Abhängigkeit vom *Kelch-like ECH associated protein 1* (Keap1) ubiquitiniert und anschließend proteasomal abgebaut<sup>77</sup>. Bei steigendem oxidativen Stress wird Keap1 selbst der proteasomalen Degradation zugeführt und infolgedessen die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 erwirkt. Dieser bindet an *antioxidant response elements* (AREs) der DNA, was die Expression von Proteinen bewirkt, die antioxidativ wirksam sind. Weiterhin wird die Expression von Proteasomuntereinheiten *via* Nrf2 hochreguliert. Das Proteasom ist somit über Nrf2 vermehrt in der Lage die Zelle vor oxidativem Stress und den schädlichen Eigenschaften missgefalteter Proteine zu schützen<sup>78</sup>.

Die Pathophysiologie der Atherogenese in der Progressionsphase schließt die Adhäsion und Migration von Monozyten in die Gefäßintima, die Aufnahme von oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL) *via* Scavenger-Rezeptor in die eingewanderten Monozyten und deren Differenzierung zu Schaumzellen unter Abgabe von Chemotaxinen und Zytokinen ein<sup>79</sup>. Der Scavenger-Rezeptor CD36, der die Aufnahme von oxLDL vermittelt, wird durch die Proteinkinase  $C\alpha$  (PK- $C\alpha$ ) reguliert. Die Ubiquitinierung von PK- $C\alpha$  führt zum proteasomalen Abbau des Enzyms und verhindert die vermehrte Expression des *peroxisomal proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ) und darüber auch die Aktivierung von CD36 und somit das Fortschreiten der Atherosklerose<sup>80</sup>. Auch der *reverse cholesterol transport* (RCT) wird durch das UPS kontrolliert. RCT bedeutet den Abtransport von überschüssigem Cholesterin in der Zelle mithilfe von *high-density lipoprotein* (HDL) zur Leber, wo es abgebaut werden kann. Der Cholesterolefflux aus Makrophagen hinaus ist abhängig von *ATP-binding cassette transporter molecules A1* und *G1* (ABCA1 und ABCG1), und deren Expression wird durch das UPS negativ beeinflusst<sup>81</sup>. Die Proteasominhibition untermauert zwei entgegengesetzt gerichtete Prozesse. Auf der einen Seite (proatherosklerotisch) kann die Aufnahme von Cholesterin über CD36 ansteigen, und auf der anderen Seite (antiatherosklerotisch) kann der reverse Cholesteroltransport über ABCA1 und ABCG1 verstärkt werden<sup>53</sup>.

Die Hemmung der Apoptose von lipidtragenden Makrophagen mithilfe von kumulierenden Lipoproteinen mit niedriger Dichte (agLDL) unterstützt den Prozess der Schaumzellbildung. Ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym der E2-Klasse kann *aggregated low-density lipoprotein* (agLDL)-induziert exprimiert werden. Die Expression des LDL-induzierbaren Gens (LIG) begünstigt die Ubiquitinierung und Degradation des proapoptotischen Moleküls p53 in lipidtragenden Makrophagen. Der Abfall der Bioverfügbarkeit von p53 verursacht durch das UPS ist maßgebend für die Schaumzellbildung. Die Entstehung dieser Zellen fördert die Atherogenese<sup>82</sup>.

Im Zuge der fortschreitenden Atherosklerose migrieren glatte Gefäßmuskelzellen mit Ursprung in der Gefäßmedia in die Intima. Diese Gefäßumbauten, belegt eine *in vitro* Studie, bewirken eine Phänotypänderung der Gefäßmuskelzellen vom kontraktilem zum synthetischen Typ, bei der das UPS eine wichtige Rolle einnimmt<sup>83</sup>. Die Umwandlung der glatten Muskelzellen vom kontraktilem in den metabolischen Phänotyp kann verhindert werden, indem das Proteasom gehemmt wird<sup>84</sup>. Myocardin wird durch die Ubiquitinligase CHIP Ziel der proteasomalen Degradation, ist aber als Transkriptions-Koaktivator bevorzugt für die Expression von Genen für einen kontraktilem Muskelzelltyp zuständig. Eine Hemmung des UPS favorisiert demzufolge den kontraktilem Muskelzellphänotyp<sup>85</sup>. Geringe Dosen des Proteasominhibitors MG132 führen in

glatten Gefäßmuskelzellen zum Anstieg des den Zellzyklus hemmenden Zyklins p21, was eine Proliferationshemmung der Zellen zur Folge hat. In höheren Dosen verabreicht, bewirkt MG132 eine Stabilisierung von p53 und leitet die Apoptose dieser Zellen ein<sup>86</sup>. Das UPS mit seinem Einfluss auf die Zellzyklus- und Apoptoseregulation nimmt eine funktionelle Rolle bei der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen ein und hat Einfluss auf die Progression der Atherosklerose.

Inflammatorische Zellen (z. B. T-Zellen und Makrophagen) sowie Lipoproteine und Zellbruchstücke bilden zusammen den Kern atherosklerotischer Plaques, die zum Gefäßlumen hin durch eine fibröse Kappe, bestehend aus glatten Gefäßmuskelzellen und Extrazellulärmatrix, begrenzt werden. Die Stabilität der fibrösen Kappe ist abhängig vom Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und Matrixabbau. Die Auflösung einer bestehenden Plaque in Form von Erosion oder Ruptur, Thrombusbildung und vollständiger oder inkompletter Gefäßokklusion ist das Ergebnis einer Destabilisation der extrazellulären Matrix und abnehmender Lebensfähigkeit beteiligter Zellen, was sich klinisch als Notfall (z. B. akutes Koronarsyndrom) präsentiert<sup>87</sup>. Die Destabilisierung der Plaque kann durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) hervorgerufen werden. Die Sekretion von MMPs erfolgt durch Makrophagen, Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques und wird induziert durch inflammatorische Zytokine und NFκB-Aktivierung. In Kardiofibroblasten von Ratten kann die MMP9- und die MMP2-Aktivierung, induziert durch IL-1β, mittels Inhibition des Proteasoms gehemmt werden<sup>88</sup>. Das UPS könnte in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen als therapeutischer Angriffspunkt zur Vermeidung von Komplikationen prädestiniert sein. Die Untersuchung der Plaques von Patienten mit einer symptomatischen Stenose der *Arteria carotis interna* (ACI) ergab ein höheres Level an oxidativem Stress, eine vermehrte NFκB-Expression und eine erhöhte NFκB-Aktivität, außerdem mehr Entzündungszellen und weniger Kollagengehalt im Vergleich zu Plaques von asymptomatischen ACI-Stenosen<sup>89</sup>. In Koronarien von Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die fortgeschrittene, komplizierte Plaques aufwiesen, wurde eine höhere Ubiquitinkonzentration nachgewiesen. Möglicherweise ist der erhöhte Ubiquitingehalt in den Plaques auf einen Anstieg der ubiquitinierten Proteine zurückzuführen, nicht aber des freien Ubiquitins, was durch eine eingeschränkte Proteasomfunktion bedingt sein könnte<sup>90</sup>.

Das UPS ist an verschiedenen Stadien der Atherogenese und am Auftreten möglicher Komplikationen beteiligt und könnte als Behandlungsansatz bei der Therapie und Prävention der Atherosklerose in Betracht gezogen werden.

## 1.4 Proteasominhibition in Tiermodellen der Atherosklerose

Aktuelle Atherosklerosemodelle zur Erforschung der systemischen Therapie mit Proteasominhibitoren basieren auf der Fütterung einer Hochcholesteroldiät, die in Schweinen oder transgenen Mäusen atherosklerotische Läsionen induziert<sup>37, 72, 91</sup>. Eine Ausnahme ist die Ausbildung atherosklerotischer Plaques in urämischen Kaninchen unter Normaldiät<sup>92</sup>. Die transgenen Mausmodelle der Apolipoprotein-E-defizienten Maus (ApoE<sup>-/-</sup>-Maus) und der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus können komplexe atherosklerotische Läsionen entwickeln, die denen des Menschen sehr ähnlich sind und die innerhalb eines annehmbaren Zeitraums entstehen können<sup>93, 94, 95</sup>. Die ApoE<sup>-/-</sup>-Maus zeigt bei gleicher Fütterung ein höheres Gesamtcholesterollevel im Blut als die LDLR<sup>-/-</sup>-Maus. Die LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse stellen eine homogenere Gruppe bezüglich der gemessenen Plasmacholesterinspiegel unter Hochcholesteroldiät dar, während die Plasmacholesterinwerte der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus bei identischer Fütterung von Tier zu Tier erheblich schwanken<sup>96</sup>, so dass wir das Modell der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus favorisierten.

Van Herck et al. untersuchten den Effekt von niedrig dosierter und hoch dosierter Proteasominhibition mit Bortezomib auf frühe und fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen in einem operativen ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell. Die *A. carotis sinistra* von weiblichen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde durch die Implantation einer perivaskulären Manschette definiert eingengt. Dies bewirkte über eine Modulation der endothelialen Scherkräfte die Bildung einer akzelerierten Plaque. Die intraperitoneale Injektion des Proteasominhibitors Bortezomib erfolgte vier Wochen lang alle drei Tage in niedriger (100 µg/ kg Körpergewicht) und hoher (500 µg/ kg Körpergewicht) Dosis in einem frühen Atherosklerosestadium, zwei Wochen nach Manschettenimplantation, und in einem fortgeschrittenen Stadium, sechs Wochen nach Manschettenimplantation. Die *chymotrypsin-like* Aktivität in der Leber war vier Stunden nach intraperitonealer Injektion von Bortezomib mit 77 % ± 2 und 49 % ± 9 entsprechend der niedrig dosierten und hoch dosierten Applikation signifikant erniedrigt. Bortezomib hatte in niedriger und hoher Dosierung nach vierwöchiger Behandlung keinen Einfluss auf die Größe der Plaquefläche in den unterschiedlichen Atherosklerosestadien. Die niedrig dosierte und hoch dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib veränderten aber die Plaquezusammensetzung in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium zu Gunsten einer instabilen Plaque mit vergrößerter nekrotischer Kernregion, gesteigerter Apoptose und reduziertem Kollagengehalt. Die Behandlung mit Bortezomib, so van Herck et al., fördert in fortgeschrittenen atherosklerotischen



Läsionen der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus die Rupturanfälligkeit der Plaque<sup>91</sup>. Demgegenüber stehen die Ergebnisse der niedrig dosierten Proteasominhibition mit Bortezomib in frühen atherosklerotischen Läsionen von LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen<sup>37</sup>. Die Dosierung von 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht erwies sich in Vorversuchen zur Dosisfindung in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen als niedrigste potente und nicht toxische Dosis, die bei einer Behandlungsdauer von sechs Wochen und wöchentlich zweimaliger intraperitonealer Applikation in der Leber zur Abnahme der *chymotrypsin-like* Aktivität um 32,8 % 24 Stunden nach der Injektion führte. Die signifikante Reduktion der Plaquefläche unter Behandlung mit niedrig dosiertem Bortezomib (50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht) in frühen atherosklerotischen Läsionen der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus kann der Reduktion von oxidativem Stress und vaskulärer Inflammation sowie der Abwesenheit proapoptotischer Effekte zugeschrieben werden. Die atheroprotektive Zellantwort auf niedrig dosierte Proteasominhibition *in vitro*<sup>75</sup> konnte *in vivo* in einem frühen Atherosklerosestadium ebenfalls gezeigt werden<sup>37</sup>.

In den Koronarien weiblicher hypercholesterolämischer Schweine zeigten Herrmann et al. eine Verschlechterung der endothelabhängigen Vasodilatation durch die zweimal wöchentliche subkutane Injektion des Proteasominhibitors MLN-273 (80 µg/ kg Körpergewicht) für die Dauer von zwölf Wochen<sup>72</sup>. Im Kontrast dazu wiesen Chade et al. eine Verbesserung der Endothelfunktion in den renalen Gefäßen von hypercholesterolämischen Schweinen unter Behandlung mit MLN-273 nach. Die herunterregulierte Expression des Transkriptionsfaktors NFκB und die hochregulierte Expression seines Inhibitormoleküls IκB sowie die gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls Endothelin-1 (ET-1) unter Behandlung mit MLN-273 lassen eine Reduktion proinflammatorischer Aktivität im Nierengewebe der Tiere vermuten. Die vermehrte Expression antioxidativer Gene (Superoxiddismutase 1 und eNOS) konnte ebenfalls nachgewiesen werden und lässt auf eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit und einen gesteigerten Superoxidabbau schließen<sup>97</sup>. Die Genregulation unter Proteasominhibition mit MLN-273 in der Niere hypercholesterolämischer Schweine war mitverantwortlich für die atheroprotektive Wirksamkeit der Behandlung. Die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Endothelfunktion in der Koronararterie und in der Niere bei gleichem Versuchsaufbau deuten auf eine organspezifische Wirkung des Proteasominhibitors MLN-273 in hypercholesterolämischen Schweinen hin. In Kaninchen konnte ebenso wie in der letztgenannten Untersuchung, in einem größeren Tiermodell als der Maus, eine antiatherogene Wirkung der Proteasominhibition nachgewiesen werden. Die tägliche intramuskuläre Injektion von 20 µg/ kg Körpergewicht des Proteasominhibitors MG132 hemmte die urämisch induzierte Atherogenese in Kaninchen. Der Transkriptionsfaktor NFκB und sein Inhibitormolekül IκBα waren unter

Behandlung mit MG132 sowohl auf Transkriptionsebene als auch in ihren Proteinlevel antiatherogen reguliert, was die herabgesetzte Aktivität von NFκB erklären könnte. Die Expression und das Serumlevel des Transkriptionsfaktors TNFα waren ebenfalls herunterreguliert. Dementsprechend reduzierte die niedrig dosierte Proteasominhibition mit MG132 in urämischen Kaninchen die Verdickung der Intima und die Anzahl der Schaumzellen<sup>92</sup>.

Die Rolle des UPS in der Pathogenese der Atherosklerose ist unbestritten, auch wenn bisherige Untersuchungen *in vivo* zum Teil gegensätzliche Ergebnisse zeigen. Der Unterschied in der Regulation von oxidativem Stress, Inflammation und Apoptose scheint für diese widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich zu sein. Es gibt Hinweise darauf, dass die Wirkung der Proteasominhibition vom Ausmaß der proteasomalen Hemmung abhängig ist. Eine geringgradige Proteasominhibition zeigte atheroprotektive Effekte in frühen atherosklerotischen Läsionen<sup>37</sup>. Bei der Applikation einer höheren Inhibitorosis konnte die antiatherogene Wirkung der proteasomalen Hemmung nicht mehr nachgewiesen werden<sup>71, 91</sup>. Die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen hatte keinen Einfluss auf die Größe der Plaqueläche von frühen oder fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen. In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen führte die niedrig dosierte Applikation von Bortezomib zu einer Destabilisierung der Plaque, während in einem frühen Atherosklerosestadium keine Veränderung der Plaquezusammensetzung unter niedrig dosierter Bortezomibgabe feststellbar war<sup>91</sup>. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Wirkung eines Proteasominhibitors in Abhängigkeit von der Wahl des Tiermodells und insbesondere in Abhängigkeit vom untersuchten Stadium der Atherosklerose unterscheidet. Die stadiumspezifische Funktion des UPS in der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus unter niedrig dosierter Proteasominhibition mit Bortezomib steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die atheroprotektive Wirksamkeit von niedrig dosierter Bortezomibgabe auf die Entstehung eines frühen Atherosklerosestadiums soll in einem fortgeschrittenen Stadium überprüft werden und damit Potential und Grenzen einer möglichen therapeutischen Anwendung von Proteasominhibitoren in der Atherosklerose aufzeigen.

## 1.5 Zielsetzung

*In vitro* und *in vivo* hat die niedrig dosierte und nicht toxisch wirkende Applikation von Proteasominhibitoren antioxidative und antiinflammatorische Wirkungen sowie antiproliferative Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen, was die Hypothese nahelegt, dass die niedrig dosierte Hemmung des UPS vor Atherosklerose schützt.

In unserem Labor wurde gezeigt, dass die niedrig dosierte Gabe von Bortezomib die Entwicklung von frühen atherosklerotischen Läsionen in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant einschränkt.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Bortezomib auf die Entstehung eines fortgeschrittenen Stadiums der Atherosklerose mit folgenden Fragestellungen:

- Kann die niedrig dosierte Applikation des Proteasominhibitors Bortezomib die Ausbildung eines fortgeschrittenen Stadiums der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen hemmen?
- Gibt es Unterschiede in der Wirkungsweise von Proteasominhibitoren in Abhängigkeit vom Stadium der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, und welche molekularen Ursachen liegen eventuellen Unterschieden zu Grunde?
- Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Wirkung von Bortezomib auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus?

## 2.0 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Die LDL-Rezeptor-defiziente Maus

Es wurden drei Zuchtpaare bei *Jackson Laboratories (Bar Harbor, U.S.A.)* erworben. Die Aufzucht erfolgte in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF). Zu Beginn des Versuchs waren alle LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse circa zehn Wochen alt, die männlichen Tiere waren 23-27 g und die weiblichen Tiere 19-25 g schwer. Alle Behandlungen und Untersuchungen wurden unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Tierversuchsgenehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) lag mit der Genehmigungsnummer G 207/ 03 vor. Insgesamt 72 LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse befanden sich im Versuch, davon waren je 36 Tiere männlichen bzw. weiblichen Geschlechts.

#### 2.1.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in normierten Makrolonkäfigen vom Typ vier auf Standardeinstreu für Labortiere, pro Käfig wurden vier bis sechs Mäuse in gleichgeschlechtlichen Gruppen gehalten. Alle Tiere wurden mit Ohrmarkierungen gekennzeichnet. Vereinzelt mussten Tiere aus den Gruppen entfernt werden, weil sie aggressives Verhalten gegen ihre Artgenossen zeigten. Diese Tiere wurden in Einzelhaltung überführt. Eine konstante Umgebungstemperatur von 22 °C und die Einhaltung eines zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus wurden automatisch geregelt. Futter und Wasser standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung und deren Aufnahme wurde regelmäßig kontrolliert. Bis zum Erreichen der zehnten Lebenswoche erhielten die Tiere standardisiertes Mäusealleinfutter. Ab der zehnten Lebenswoche bis zum Versuchsende wurden die Mäuse mit einem Experimentalfutter der Firma ssniff® Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) gefüttert. Diese Spezialdiät war angereichert mit 1,25 % Cholesterol, 0,5 % Natriumcholat und 15 % Kakaobutter.

## 2.1.2 Versuchsaufbau

Alle Tiere (n=72) wurden im Alter von drei Wochen von ihren Müttern abgesetzt und mit einer normalkalorischen Diät gefüttert. Die Tiere wurden in eine Baselinegruppe (4♂, 4♀) und in eine Versuchstiergruppe (32♂, 32♀) geteilt. Die Mäuse der Baselinegruppe wurden geopfert, um den alters- und ernährungsbedingten atherosklerotischen Status vor Behandlungsbeginn zu ermitteln. In der neunten Lebenswoche wurde der Versuchstiergruppe retrobulbär in Isofluran-Inhalationsnarkose 0,1 ml Blut abgenommen, um anschließend die Cholesterinkonzentration im Serum bestimmen zu können. Zusammen mit den zeitgleich gemessenen Gewichten wurden die Mäuse unter Berücksichtigung der ermittelten Blutfettwerte in phänotypisch homogene Gruppen eingeteilt. Jeweils 32 Tiere (16♂, 16♀) wurden der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe zugeteilt. 16 Wochen lang erhielten diese 64 LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Hochcholesteroldiät und je nach Gruppenzugehörigkeit wurde den Mäusen Bortezomib (Behandlungsgruppe: 50 µg/ kg Körpergewicht in 0,15 ml 0,9 % NaCl) oder Natriumchloridlösung (Kontrollgruppe: 0,15 ml 0,9 % NaCl) injiziert. Die Injektionen und das vorangehende Wiegen erfolgten zweimal wöchentlich. Das Allgemeinbefinden aller Tiere wurde regelmäßig untersucht. Im Verlauf des Versuchs verstarben vier Tiere der männlichen Kontrollgruppe und zwei Tiere der männlichen Behandlungsgruppe. Bei den weiblichen Tieren erkrankte je ein Tier aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe. Diese Tiere wurden von der Datenanalyse ausgeschlossen.

Die Versuchstiere wurden nach 16 Wochen durch retrobulbäres Entbluten unter Isofluran-Inhalationsnarkose euthanasiert und Organe sowie Blut entnommen. Im Vordergrund der Organentnahme stand die vollständige Freilegung der Aorta von der Aortenwurzel an bis zur Bifurkation. Für die Proteasomaktivitätsmessung (siehe Abschnitt 2.3) wurde die Leber entnommen. Allen Tieren wurde die letzte Injektion 24 Stunden vor der Euthanasie verabreicht. Die Aorten von je vier männlichen Tieren der Behandlungs- und der Kontrollgruppe wurden für die Microarray-Genexpressionsanalyse (siehe Abschnitt 2.5) verwendet. Die Genexpressionsanalyse beschränkte sich auf die männlichen Tiere.

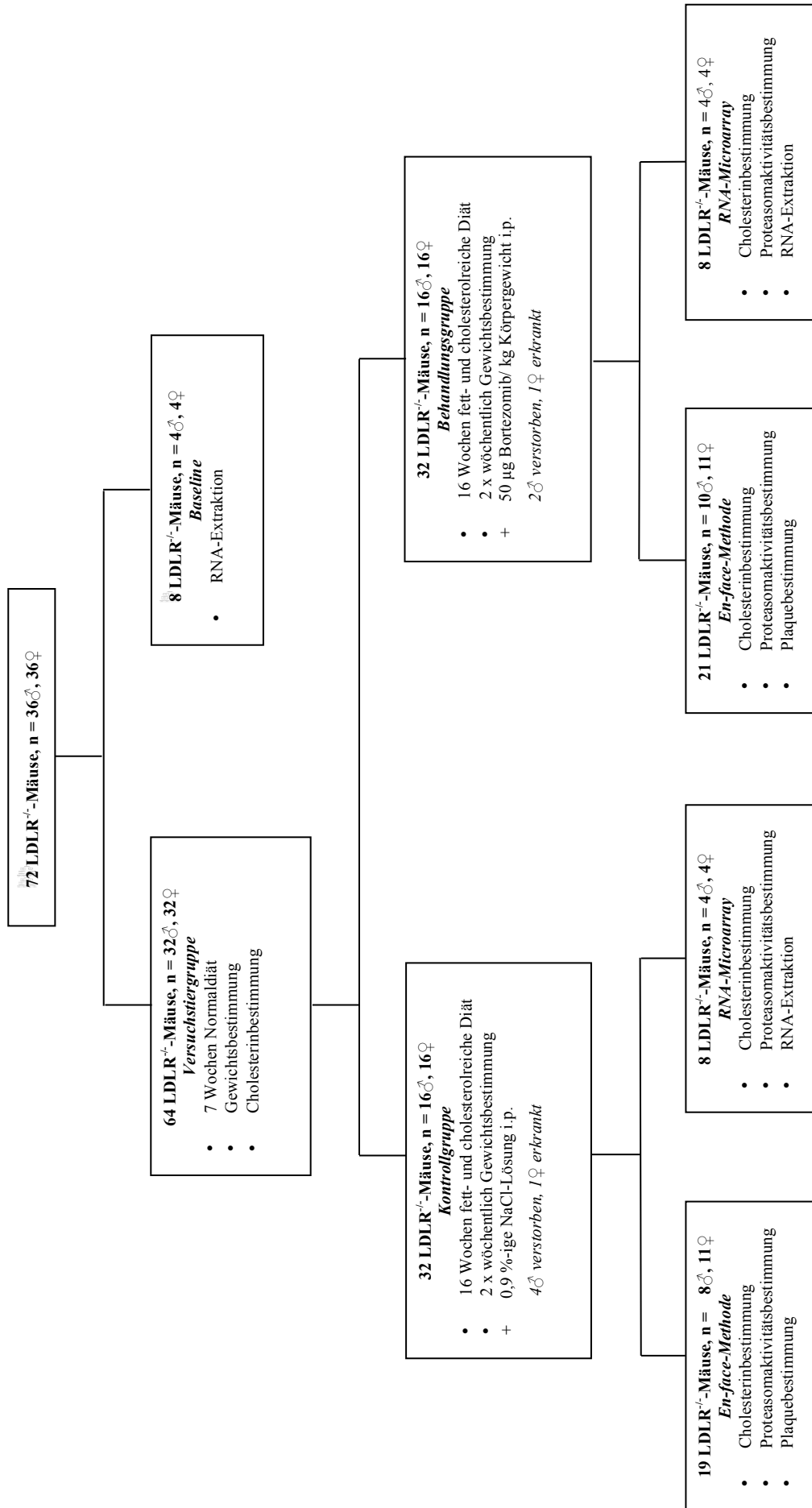


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau zur Erforschung der niedrig dosierten Proteasominhibition mit Bortezomib in einem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen

### 2.1.3 Dosisfindung mithilfe von Ub<sup>G76V</sup>GFP1-Mäusen

Heterozygoten männlichen Ub<sup>G76V</sup>GFP1-Mäusen wurden einmalig unterschiedliche Dosierungen von Bortezomib (25 µg, 50 µg oder 500 µg pro kg Körpergewicht) oder Natriumchloridlösung intraperitoneal verabreicht. Die Versuchstiere wurden unter Isofluran-Inhalationsnarkose 24 Stunden nach der Injektion geopfert (siehe Abschnitt 2.1.5). Nach Perfusion der Aorta mit *phosphate buffered saline* (PBS) wurden die Hauptschlagader und das Herz entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### ***Proteinisolation***

Die Proben wurden aufgetaut, mit einem Skalpell grob zerkleinert und in einem gekühlten 2 ml Eppendorfgefäß mit 80 µl Lysepuffer und zwei 4 mm Edelstahlkugeln in der Kugelmühle zweimal für 1 min bei 30 Hz homogenisiert und lysiert. Nach vollständiger Homogenisierung wurden die Eppendorfgefäße bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues gekühltes Eppendorfgefäß transferiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Tabelle 2.1: **Material für die Proteinisolation**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Kugelmühle MM301	Retsch, Haan, Deutschland
<i>Lysepuffer pH 7,4</i> 50 mmol/ l Tris-HCl, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid 154 mmol/ l KCl, Kaliumchlorid 5 mmol/ l Glukose 0,5 mmol/ l EDTA, Ethylendiamintetraacetat 1 mmol/ l PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid 2 mmol/ l DTT, Dithiothreitol 1 % Triton X-100, Octoxinol 9	Roth, Karlsruhe, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A. Roth, Karlsruhe, Deutschland Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A. Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### ***Bicinchoninsäurekomplex-Proteinquantifizierung***

Proteine sind in der Lage, zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer zu reduzieren. Bicinchoninsäure reagiert als Dimer mit einwertigem Kupfer zu einem violetten Farbkomplex,

dessen Absorption mit einem Spektrophotometer gemessen werden kann. Dabei entspricht die gemessene Absorption der Proteinkonzentration, denn die Farbstoffintensität korreliert direkt mit der Proteinkonzentration<sup>98</sup>.

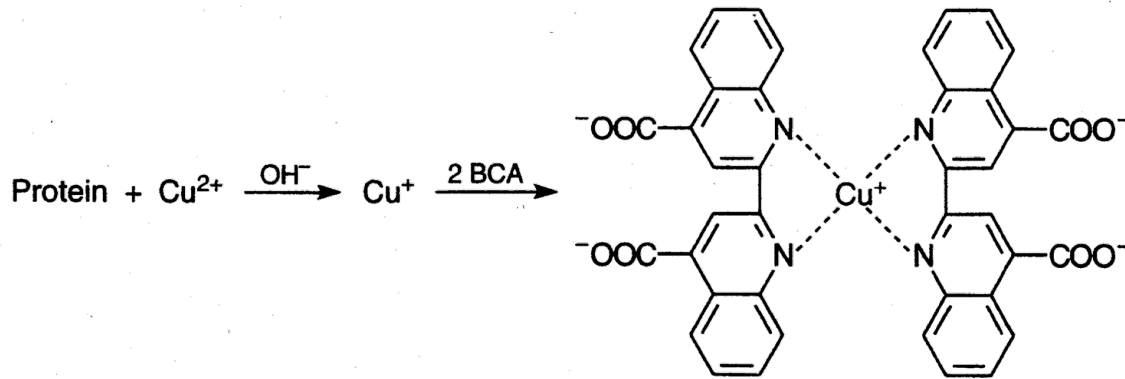


Abbildung 2.2: Reduktion von zweiwertigem Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ ) zu einwertigem Kupfer ( $\text{Cu}^+$ ) durch ein Protein und Bildung des violetten Bicinchoninsäurekomplexes (BCA)

Die Proteinprobe wurde zunächst im Verhältnis 1:5 mit *Aqua bidestillata* verdünnt, davon wurden je 10  $\mu\text{l}$  in zwei Vertiefungen einer durchsichtigen 96-er Lochplatte (Doppelwertbestimmung) pipettiert und mit 200  $\mu\text{l}$  Nachweisreagenz aufgefüllt. Das Nachweisreagenz bestand aus Reagenz A (Bicinchoninsäure) und Reagenz B (Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1. Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 0,1-1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Extinktionsmessung mittels ELISA-Reader, dabei wurde ein Messfilter mit 570 nm verwendet. Die Proteinkonzentration konnte unter Verwendung der BSA-Standardkurve in  $\mu\text{g}/\text{l}$  mit dem Computerprogramm WinRead berechnet werden.

Tabelle 2.2: Material für die Bicinchoninsäurekomplex-Proteinquantifizierung

Material	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Pierce Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, U.S.A.
96-er Lochplatte	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Wärmeschrank	Haraeus Instruments, Hanau, Deutschland
ELISA-Reader HT III	Anthos, Krefeld, Deutschland
WinRead 2.0	Anthos, Krefeld, Deutschland



## ***Westernblot***

Die Hemmung der Proteasomaktivität durch Injektion von Bortezomib wurde als Akkumulation von Ub<sup>G76V</sup>GFP und Ubiquitinkonjugaten in Zelllysaten von Aorten- und Herzgewebe mithilfe eines Rabbit-Anti-GFP- und Rabbit-Anti-Ubiquitin-Antikörpers in Westernblots dargestellt.

## ***Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese***

Das Gewebe wurde, wie unter dem Abschnitt „Proteinisolation“ beschrieben, lysiert. Der qualitative Nachweis von Ubiquitinkonjugaten und grün fluoreszierendem Protein (GFP) erfolgte mittels Gelelektrophorese, bei der die Proteine je nach Größe in einem Gel auf Polyacrylamidbasis getrennt wurden. Anschließend wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) transferiert (geblottet) und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Nach kurzem Aufkochen der im Zelllysate enthaltenen Proteine im Ladebuffer mit *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) liegen die Proteine denaturiert vor und weisen eine konstante Ladungsverteilung auf. SDS ist ein anionisches Tensid, das die Eigenladung der Proteine überdeckt und ihnen eine negative Außenladung verleiht. Dies ermöglicht die Auftrennung im elektrischen Feld. Diese Art der Gelelektrophorese bezeichnet man als SDS-Page (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Das Polyacrylamidgel besitzt Gelporen, die durch Polymerisation der Bestandteile Acrylamid und N,N-Methylbisacrylamid, initiiert durch Ammoniumperoxiddisulfat und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), entstanden sind. Je größer der Acrylamidgehalt des Gels, desto kleiner die Porengröße. Das Gel wirkt bei der Auftrennung der Proteine wie ein Sieb, kleine Proteine wandern leichter durch die Gelporen als große Proteine, und am Ende des Vorgangs liegen alle Proteine nach Größe sortiert im Gel vor. Für den Nachweis von Ub<sup>G76V</sup>GFP wurde ein 12 %-Gel verwendet, für den Nachweis von Ubiquitinkonjugaten ein 8 %-Gel. Die Gelzusammensetzung ist in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Eine Proteinmenge von 20 µg wurde nach erfolgter Lyse und Proteinmessung mit 5x SDS-Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95 °C im Thermoblock erhitzt, kurz anzentrifugiert und in abgekühltem Zustand in die Geltaschen pipettiert. Im Anschluss daran wurde die Gelelektrophorese mit 10 mA pro Gel gestartet. Nach 15 min wurde die anliegende Stromstärke auf 15 mA pro Gel erhöht. Die Proteinauftrennung dauerte insgesamt 1-1,5 Stunden. Danach wurden die Gelplatten aus der Kammer genommen, geteilt, das Sammelgel entfernt und das verbleibende Gel für 15 min im Blotpuffer inkubiert, um mit dem Blotten weiterverfahren zu können.

Tabelle 2.3: **Zusammensetzung des Polyacrylamidgels**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
1,5 M Tris, pH 8,8	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1 M Tris, pH 6,8	
10 % SDS, Natriumdodecylsulfat	SERVA, Heidelberg, Deutschland
40 % Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
10 % APS, Ammoniumperoxiddisulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
TEMED, N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.

Tabelle 2.4: **Lösungen und anderes Material**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<i>TBS, Tris-gepufferte Salzlösung, pH 7,4</i>	
50 mM Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
150 mM NaCl, Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>5x SDS Probenpuffer</i>	
655 µl 1 M Tris, pH 6,8	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2 ml 99 % Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
500 µl β-Mercaptoethanol	SERVA, Heidelberg, Deutschland
2,3 ml 10 % SDS	SERVA, Heidelberg, Deutschland
10 mg Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg, Deutschland
ad 10 ml <i>Aqua destillata</i>	
<i>SDS-Laufpuffer</i>	
2,5 mM Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
19,2 mM Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,01 % SDS, pH 8,8	SERVA, Heidelberg, Deutschland
<i>Blotpuffer</i>	
48 mM Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
39 mM Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
20 % Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresekammer TV100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Power Supply EPS 600	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## *Blotten*

Beim Blotten werden die im Gel aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran übertragen. Zunächst wurde die PVDF-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten und für 1 min mithilfe von Methanol aktiviert, anschließend 5 min in *Aqua destillata* gewaschen und danach 5-10 min in Blotpuffer gespült. Im Anschluss daran wurden sechs Whatman-Papiere ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und in Blotpuffer getränkt. Von Kathodenseite nach Anodenseite hin wurden nun drei Whatman-Papiere, die PVDF-Membran, das Gel und wieder drei Whatman-Papiere in der Blotkammer gestapelt. Nach Verschließen der Blotkammer wurde bei 400 mA für 1-1,5 Stunden geblottet. Im weiteren Verlauf wurde die PVDF-Membran aus dem Stapel entfernt und für 5-10 min in Amidoschwarzlösung gefärbt, um den Proteintransfer zu überprüfen. Danach wurden die Membranen in Roti-Block inkubiert.

Tabelle 2.5: **Material für das Blotten**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Blocklösung</i> 10x Roti-Block 1:10 in PBS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Amidoschwarzlösung</i> Amidoblack Staining Solution A 8181 1:1 in deionisiertem Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Whatman-Papier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PVDF-Membran, Polyvinylidenfluorid-Membran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Blotkammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

## *Umsetzung der Blots mit Antikörpern*

Durch das zweistündige Schwenken der PVDF-Membran in Roti-Block wird eine unspezifische Bindung der Antikörper an die PVDF-Membran verhindert, indem freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran geblockt werden. Die PVDF-Membran wurde mit den Primärantikörpern in der Blocklösung bei einer Verdünnung von 1:20.000 für Rabbit-Anti-GFP und 1:2000 für Rabbit-Anti-Ubiquitin über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am Folgetag wurde die PVDF-Membran viermal hintereinander für 10 min in TBS-T-Waschpuffer bestehend aus *Tris-buffered saline* und Tween 20 (Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat) gereinigt und danach mit dem Sekundärantikörper Goat Anti-Rabbit IgG (Verdünnung 1:10.000) bei

Raumtemperatur auf einer Wippe für 1 Stunde lang inkubiert. Danach folgte eine erneute Waschphase mit TBS-T für 40 min mit ebenfalls viermaligem Pufferwechsel und im Anschluss wurde die Membran unter Schwenken für 1 min in *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Lösung inkubiert. Das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol wird durch die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidiert und fällt daraufhin unter Lichtemission in seinen Grundzustand zurück. Das generierte Licht wurde durch Auflage eines Films in einer Kassette registriert. Die Filme wurden nach ihrer Entwicklung gescannt.

Mithilfe des Westernblots wurde zunächst das grün fluoreszierende Protein im Proteingemisch bestimmt. Anschließend wurde die Membran gestrippt, d. h. bestehende Antikörperbindungen wurden wieder gelöst, so dass die qualitative Bestimmung der Ubiquitinkonjugate im Proteingemisch erfolgen konnte. Die PVDF-Membran wurde für 30 min bei 50 °C unter Schwenken in Striplösung inkubiert. Danach wurde die PVDF-Membran viermal, wie bereits beschrieben, erneut in TBS-T gewaschen und im Anschluss daran konnte entsprechend dem obigen Protokoll ab Roti-Block-Inkubation weiterverfahren werden.

Tabelle 2.6: **Material für die Antikörperbindung und das Strippen des Westernblots**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Primärantikörper (Verdünnung)</i> Rabbit-Anti-GFP (1:20.000) Rabbit-Anti-Ubiquitin (1:2000)	Epitomics, Burlingame, U.S.A. DAKO, Glostrup, Dänemark
<i>Sekundärantikörper (Verdünnung)</i> Goat Anti-Rabbit IgG (1:10.000)	Jackson, Newmarket, Großbritannien
<i>Waschpuffer, TBS-T</i> TBS, <i>Tris-buffered saline</i> 0,1 % Tween 20, Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat ECL-Lösung, <i>Enhanced Chemiluminescence</i> -Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A. GE-Healthcare, Buckinghamshire, England
<i>Striplösung</i> 0,2 M Glycin/ HCl, pH 2,4 0,1 % SDS 1 % Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S. A. SERVA, Heidelberg, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
Wippe Biometra WT 12 Film X-Omat Blue XB-1, 18x24 cm Entwicklermaschine Hyperprocessor	Biometra, Göttingen, Deutschland Kodak, Rochester, U.S.A. GE-Healthcare, Buckinghamshire, England

## 2.1.4 Die Applikation von Bortezomib

Der Proteasominhibitor Bortezomib wird von der *Firma Millenium Pharmaceuticals (Cambridge, U.S.A.)* unter dem Namen *Velcade®* vertrieben. Die Dosis von 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht, die den Mäusen appliziert wurde, entspricht ~0,36 mg/ m<sup>2</sup> Körperoberfläche und beruht auf den Ergebnissen der bereits beschriebenen Vorversuche. Velcade® ist als gefriergetrocknetes Pulver mit 3,5 mg Bortezomib in Einzeldosen-Ampullen erhältlich. Das Pulver wurde in 0,9 % NaCl gelöst und in Aliquots zu 1 µg/ µl bei -80 °C bis zum Versuch gelagert. Die dem Körpergewicht der Maus entsprechende Dosis wurde zur besseren Applizierbarkeit in 0,15 ml einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung verdünnt und den Tieren intraperitoneal injiziert.

## 2.1.5 Opferung

Jede Maus (Baseline: n = 4♂, 4♀/ Behandlungsgruppe: n = 14♂, 15♀/ Kontrollgruppe: n = 12♂, 15♀) wurde eingangs gewogen und einer abschließenden körperlichen Untersuchung unterzogen. Die Tiere der Baselinegruppe wurden vor Behandlungsbeginn im Alter von 10 Wochen geopfert. Im Verlauf des Versuchs verstarben zwei Tiere der männlichen Behandlungsgruppe sowie vier Tiere der männlichen Kontrollgruppe und es erkrankte je ein Tier der weiblichen Behandlungs- und Kontrollgruppe. Die betroffenen Tiere wurden von der Datenanalyse ausgeschlossen. Um eine verminderte Stressbelastung für das Tier zu erreichen, wurde es zunächst in einer Narkosebox *via* Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt. Wenn sich die Atemfrequenz merklich verlangsamte, wurde das Tier umgehend aus der Narkosebox genommen und auf den Untersuchungsplatz gelegt. Die Narkosetiefe wurde mit dem Zwischenzehenreflex überprüft. Zur retrobulbären Blutentnahme wurde der in Narkose versetzten Maus eine angespitzte Microvette in den medialen Augenwinkel gedreht, wobei lediglich der retrobulbäre Venenplexus, nicht aber das Auge selbst, verletzt wurde. Das Blut wurde in einem Eppendorfgefäß gesammelt und nach 30 min Standzeit 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte das gewonnene Serum in Aliquots bei -80 °C gelagert werden.

Nach der Blutabnahme wurde das Tier in tiefe Narkose versetzt und konnte dann auf einer Styroporunterlage an den Pfoten fixiert werden. Zur Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose wurde der Maus eine eigens angefertigte Narkosemaske aufgesetzt, die an ihrem Ende mit einem Isofluran getränkten Wattebausch beladen war, der je nach Bedarf mit neuer Isofluranlösung getränkt werden konnte, so dass die Narkose nicht unterbrochen wurde. Die Maus wurde mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert bevor eine Thorakotomie und eine Laparotomie durchgeführt werden konnten. Nach Eröffnen der Körperhöhlen wurden zunächst die *Aa. iliacae* aufgesucht und mit einem Skalpell durchtrennt. Anschließend wurde der linke Ventrikel des Herzens mit einer Flügelkanüle punktiert und mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Die Perfusion wurde fortgeführt bis die abfließende Flüssigkeit aus den durchtrennten *Aa. iliacae* klar war (siehe Abbildung 2.3).

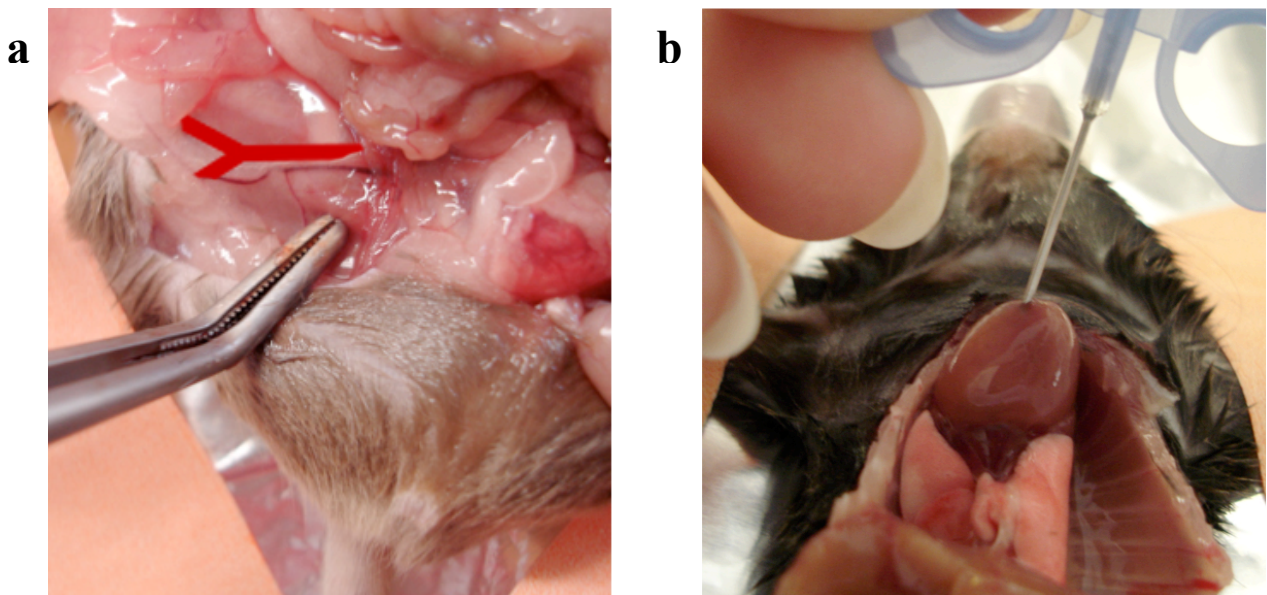


Abbildung 2.3: **Darstellung der *A. iliaca dextra* vor Durchtrennung (a) und Punktion des linken Ventrikels (b).** Vor Behandlungsbeginn (Baseline: n = 4♂, 4♀) und nach 16-wöchiger Fütterung mit einer fett- und cholesterolreichen Diät sowie zweimal wöchentlicher intraperitonealer Injektion von 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht (Behandlungsgruppe: n = 14♂, 15♀) oder 0,9 %-iger Natriumchloridlösung (Kontrollgruppe: n = 12♂, 15♀) wurden die Aorten der LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse für die Plaqueflächenbestimmung und die RNA-Extraktion entnommen. Eine Inhalationsnarkose mit Isofluran erlaubte die Durchführung von Thorakotomie und Laparotomie. Die Spülung der Aorta mit physiologischer Kochsalzlösung vor Entnahme konnte nach Durchtrennung der *Aa. iliacae* (a) und der Punktion des linken Ventrikels mit einer an ein Infusionsbesteck angeschlossenen Flügelkanüle (b) problemlos erfolgen.

Im weiteren Verlauf der Opferung erfolgte die Organentnahme. Leberproben für die Proteasomaktivitätsmessung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die restliche Leber, die linke Niere, die Lunge und die Milz wurden entfernt. Die Präparation wurde mit dem Entfernen des Brustbeins fortgesetzt, so dass der Weg frei wurde zur Entnahme der Aorta. Das Herz wurde entfernt und die Präparation der Aorta wurde mikroskopisch fortgesetzt.

## **2.2 Die *En-Face*-Methode zur quantitativen Untersuchung atherosklerotischer Plaques in der Aorta**

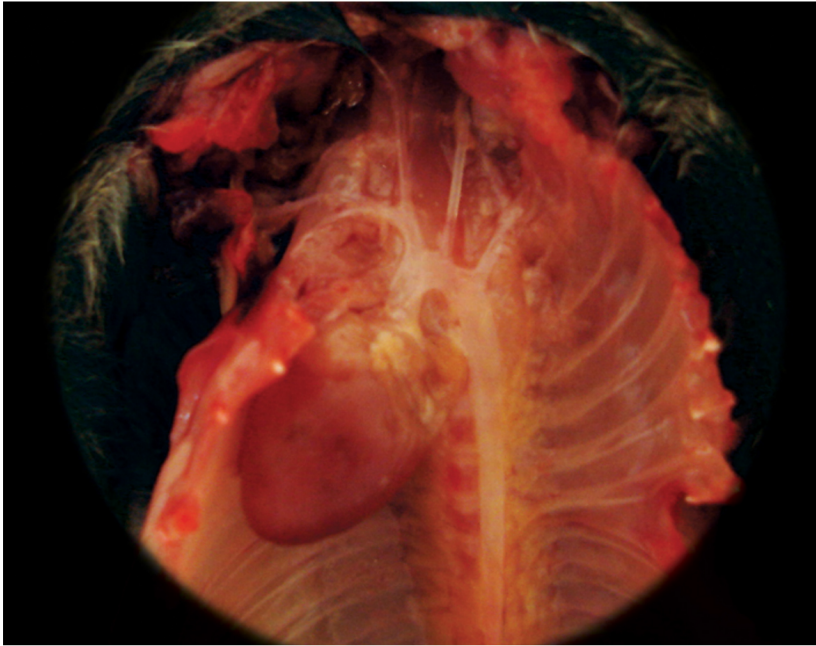
### **2.2.1 Aortenentnahme**

Die Eröffnung von Brust- und Bauchraum, sowie die unter Abschnitt 2.1.5 geschilderte Organentnahme ermöglichten die Entnahme der Aorta. Noch *in situ* erfolgte die Entfernung von makroskopisch sichtbaren äußeren Fettanlagerungen und bindegewebigen Strukturen. Anschließend wurde der Aortenbogen mit Ursprung an der Aortenwurzel mit seinen Abgängen, dem *Truncus brachiocephalicus*, der *Arteria carotis communis sinistra* und der *Arteria subclavia sinistra*, freigelegt (siehe Abbildung 2.4). Danach erfolgte die Präparation der *Aorta thoracica*, die mit ihrem Eintritt in die Bauchhöhle zur *Aorta abdominalis* wird. Die *Arteriae renalis sinistra et dextra* und die *Aorta abdominalis* wurden bis unter die Bifurkation mit den *Arteriae iliacae communes* freipräpariert. Die Gefäßabgänge wurden in Abstand zur Hauptschlagader abgesetzt und die Aorta behutsam von dorsal abgelöst, so dass sie als Ganzes entnommen werden konnte.

Das Gefäß lag zur Gewebefixierung 24 Stunden lang in 4 %-iger phosphatgepufferter Formaldehydlösung (Roti<sup>®</sup>-Histofix von Roth, Karlsruhe, Deutschland), im Anschluss daran begann die Feinpräparation.



**a**



**b**

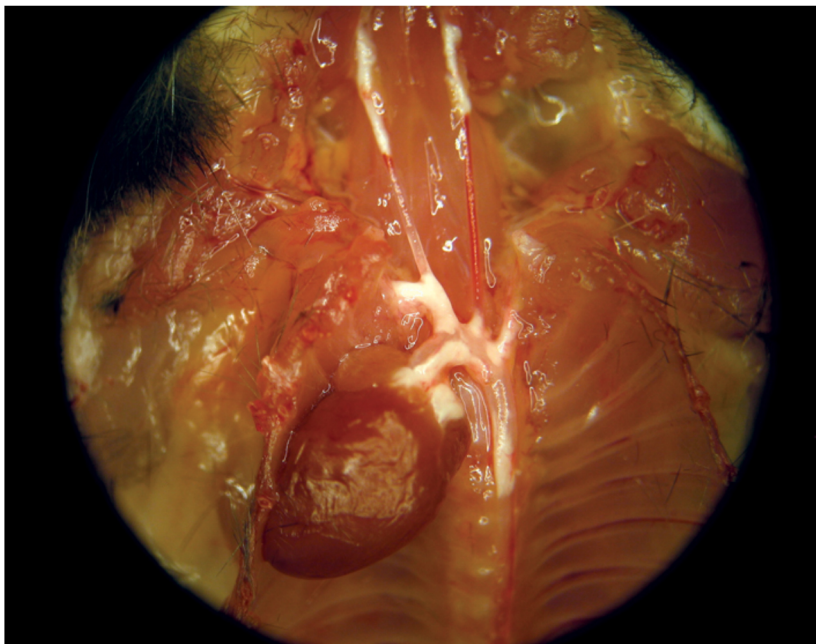


Abbildung 2.4: Blick in den Thorax einer männlichen LDLR<sup>-/-</sup>-Maus nach 16 Wochen Normaldiät (a) und nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) sowie zweimal wöchentlicher intraperitonealer Applikation von 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht (b). Brustbein und Lunge wurden entfernt. *Aorta ascendens*, Aortenbogen mit Abgängen, *Aorta descendens* und *Aorta thoracica* ohne sichtbare Zeichen von Atherosklerose (a) und mit massiven atherosklerotischen Plaques (b).



## 2.2.2 Feinpräparation der Aorta

Die Aorten (Baseline: n = 4♂, 4♀/ Behandlungsgruppe: n = 14♂, 15♀/ Kontrollgruppe: n = 12♂, 15♀) wurden nach ausreichender Konservierung aus der Formaldehydlösung in silikonbeschichtete Petrischalen überführt und mit phosphatgepufferter Salzlösung (Roti<sup>®</sup>-Stock von Roth, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt. Die Feinpräparation erfolgte mikroskopisch mit Federschere und Pinzette, mit deren Hilfe verbliebenes Fettgewebe und die äußerste Gefäßschicht, die Tunica externa, entfernt werden konnte. Die Aorten der Baselinegruppe und je vier Aorten der männlichen und weiblichen Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden einzeln in Eppendorfgefäße platziert und für die RNA-Extraktion aufbewahrt. Befreit von adventitiellem Bindegewebe wurden die verbliebenen Aorten longitudinal aufgeschnitten, was eine plane Befestigung des Gefäßschlauches ermöglichte. Wie in Abbildung 2.5 dargestellt, wurden auch die angrenzenden Gefäßabgänge eröffnet.

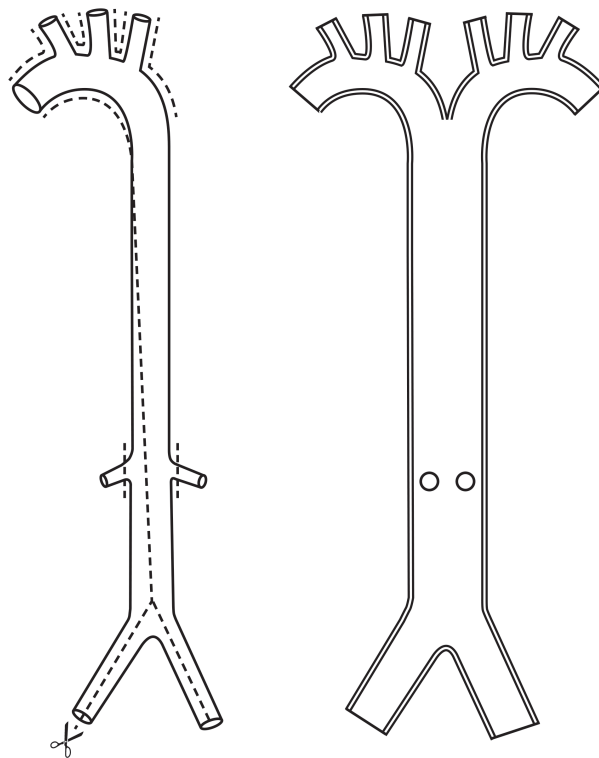


Abbildung 2.5: **Schnittkanten bei der Feinpräparation der Aorten.** Nach 16-wöchiger Fütterung mit einer fett- und cholesterolreichen Diät sowie zweimal wöchentlich intraperitonealer Injektion von 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht (Behandlungsgruppe: n = 10♂, 11♀) oder 0,9 %-iger Natriumchloridlösung (Kontrollgruppe: n = 8♂, 11♀) wurden die Aorten der LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse für die Plaqueflächenberechnung entnommen und unter dem Mikroskop mithilfe einer Federschere entlang der dargestellten Schnittkanten aufgetrennt und am Silikonboden einer Petrischale mit sogenannten Minutienstiften befestigt, so dass eine plane Fläche entstand.

Im weiteren Verlauf der Feinpräparation wurde die Aorta mit sogenannten Minutienstiften am Silikonboden der Petrischale in einer Ebene fixiert. Die Minutienstifte mussten dabei möglichst abseits von atherosklerotischen Veränderungen im Gefäß positioniert werden, damit bei der späteren Bearbeitung der Aortenbilder die Fixierhilfen ausradiert werden konnten, ohne Teile der Plauefläche mit zu löschen und die Werte der quantitativen Plaueflächenbestimmung zu verfälschen. Unter Zuhilfenahme von zwei feinen Pinzetten wurden die Aorten mit den Minutienstiften unter dem Mikroskop auf der Silikonunterlage befestigt.

### **2.2.3 Sudan IV-Färbung**

In einer atherosklerotischen Plaue befindet sich ein großer Anteil an Cholesterin und anderen Fettmolekülen, die sich bei Behandlung mit Sudan IV rot färben<sup>99</sup>. Die Adventitia des Gefäßes sollte sorgfältig abpräpariert sein, weil gefärbtes Fettgewebe dieser Schicht durchscheinen könnte und dann fälschlicherweise als Plaue in der Intima bzw. Media wahrgenommen werden könnte und somit falsch positive Ergebnisse liefern würde. Für die Färbung wurden die fixierten Aorten (Behandlungsgruppe: n = 10♂, 11♀/ Kontrollgruppe: n = 8♂, 11♀) in den Petrischalen für die Dauer von 5 min mit 50 %-igem Alkohol bedeckt und im Anschluss daran mit Azeton-Scharlach-Lösung beträufelt, so dass die gesamte Gefäßinnenfläche von der Farbstofflösung bedeckt war. Nach 4 min Färbezeit wurde das Präparat zwei- bis dreimal kurz mit 70 %-igem Alkohol gespült.

### **2.2.4 Fotografieren der Aorten**

Die eingefärbten Aorten wurden unter dem Mikroskop mithilfe eines Kameraadapters, der die Befestigung einer Digitalkamera am Mikroskop ermöglichte, fotografiert. Zunächst wurde der obere Abschnitt von Aortenwurzel bis einschließlich den Abgängen der *Aa. renalis sinistra et dextra* fotografiert und anschließend der untere Teil bis einschließlich der *Aa. iliaca communes* bildlich festgehalten. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die fotografierten Ausschnitte überlappen, so dass die zwei Teile bei der späteren Bearbeitung am Computer wieder zusammengefügt werden können. Der Vorteil dieses zweigeteilten Fotografierens ist eine

hochauflösende Darstellung des Präparates im zusammengefügt Bild, die durch die hohe Vergrößerung am Mikroskop möglich wird.

### **2.2.5 Bearbeitung der Aortenfotos**

Die zwei Fotos, die zusammen eine gesamte Aorta ergaben, wurden im Programm Adobe Photoshop geöffnet und so beschnitten, dass sowohl das Gefäß als auch die Minutienstifte, mit denen das Präparat befestigt war, sichtbar blieben. Danach wurden die zwei Fotos in eine gemeinsame Datei kopiert, um anschließend durch das Übereinanderschichten eines im Vordergrund stehenden Fotos über das andere das Gesamtbild der Hauptschlagader entstehen zu lassen.

Anschließend wurde die Aorta in drei Abschnitte unterteilt, den *Arcus aorticus*, die *Aorta thoracica* und die *Aorta abdominalis*. Der Aortenbogen war definiert als Abschnitt oberhalb der Aortenwurzel bis zu der Höhe im Bild, in der die Gefäßgrenzen ohne Krümmung verlaufen. Direkt daran schloss sich die *Aorta thoracica* an, die sich bis oberhalb der Abgänge der *Aa. renalis sinistra et dextra* erstreckte. Den Gefäßabschnitt, der die Nierenabgänge beinhaltet und bis zu den abgesetzten *Aa. iliacae communes* reicht, beschreibt die *Aorta abdominalis*. Eine Kopie des Bildes der gesamten Hauptschlagader wurde nun entsprechend der definierten Abschnitte zerschnitten und jeder einzelne Abschnitt als neue Datei gespeichert. Die drei Bilder der Aortenabschnitte und das Gesamtbild der Hauptschlagader mussten zur Plaqueflächenberechnung weiter bearbeitet werden. Zunächst wurden die Aortenabschnitte bzw. das gesamte Gefäß unter Verwendung der Funktion des magnetischen Lassos exakt ausgeschnitten. Danach wurden die sichtbaren Reste der Minutienstifte in der Nähe von Plaqueflächen ausradiert, weil die Stifte bei der späteren Berechnung nicht von der Plaquefläche getrennt werden können und ein falsch positives Ergebnis produzieren würden.

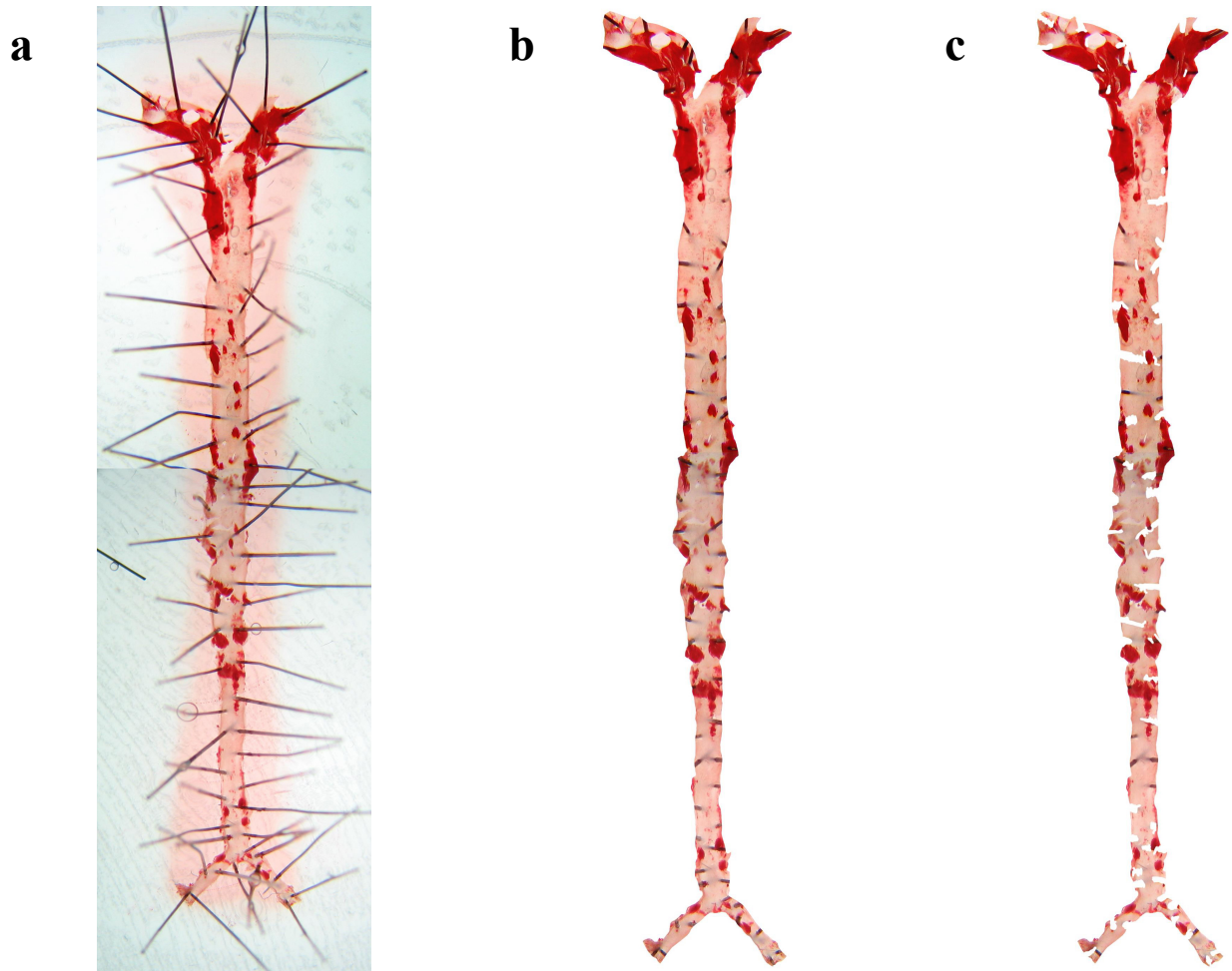


Abbildung 2.6: **Gesamtbild der Aorta aus 2 Fotos zusammengefügt (a), ausgeschnittene Aorta (b) und Aorta mit ausradierten Minutienstiften (c).** Nach Versuchsende wurden die Aorten der LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse (Behandlungsgruppe: n = 10♂, 11♀/ Kontrollgruppe: n = 8♂, 11♀) für die Plaquetflächenberechnung entnommen, unter dem Mikroskop längs aufgeschnitten und in einer Petrischale plan fixiert. Sudan IV färbte die Fettmoleküle der atherosklerotischen Läsionen rot. Die Aorten wurden anschließend in zwei Einzelbildern fotografiert, um eine bestmögliche Auflösung zu erreichen. In dem Programm Photoshop wurden die zwei überlappenden Bilder dann wieder zusammengefügt, so dass ein Abbild der gesamten Hauptschlagader entstand. Vor Berechnung der Plaquetfläche mithilfe des Programms Image wurden die Aortenbilder im Programm Adobe Photoshop bearbeitet. Die Aortenflächen konnten mit der Funktion des magnetischen Lassos ausgeschnitten werden und anschließend wurden alle sichtbaren Anteile der Minutienstifte, mit denen die Aorta in der Petrischale befestigt war, ausradiert.

## 2.2.6 Plaquetflächenberechnung mithilfe der Schwellenwertbestimmung

Die vorbereiteten Bilder wurden im Programm des *National Institute of Health* (NIH) Image geladen. In diesem Programm konnte man das Bild in drei Farbkanäle (RGB) aufspalten. Für die Plaquetflächenberechnung wurde der grüne Farbkanal benutzt. Das Bild dieses Kanals wurde im weiteren Verlauf mithilfe der Schwellenwertfunktion des Programms weiterbearbeitet, so dass die Plaquetflächen in roter Farbe hervortraten. Die rot markierten Flächen konnten durch variable Schwellenwerteinstellung verändert werden, dabei wurde darauf geachtet, dass der gewählte

Schwellenwert die realen Plaqueflächen wiedergab. Anschließend wurden alle Plaqueflächen durch Anklicken ausgewählt und zu einer Gesamtfläche summiert. Durch Anklicken eines beliebigen Punktes im Bild wurde die Auswahl der Plaqueflächen aufgehoben. Die Schwellenwerteinstellung wurde nun so verändert, dass sich die Gesamtfläche des Aortenabschnitts bzw. die gesamte Aortenfläche rot darstellte. Analog zur Plaqueflächenberechnung wurde durch Auswahl der markierten Gesamtfläche die Größe der Gesamtfläche berechnet. Der prozentuale Anteil der Plaquefläche an der Gesamtfläche konnte nun berechnet werden.

## **2.3 Messung der proteasomalen Aktivität in murinem Lebergewebe**

### **2.3.1 Gewebelyse**

Das Lebergewebe wurde mit einem Skalpell fein zerkleinert und anschließend mit *Aqua bidestillata* vermengt. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und sofort in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) gegeben. Die gefrorene Suspension taute bei Raumtemperatur wieder auf. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Proben (Behandlungsgruppe: n = 14♂, 15♀/ Kontrollgruppe: n = 12♂, 15♀) wurden anschließend bei -80 °C gelagert bzw. zur Proteinbestimmung weiter aufgearbeitet. Dazu mussten die Proben bei 4 °C und 14.000 rpm über 30 min abzentrifugiert werden (Zentrifuge 5810R von Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die intrazytoplasmatischen Proteine sowie auch Kernproteine, im Speziellen die Proteasomen, trennen sich hierbei von den übrigen Zellbestandteilen ab. Danach wurde der vorhandene Überstand in ein gesondertes Eppendorfgefäß pipettiert und das Pellet verworfen. Die anschließende Quantifizierung der Proteine mit dem BCA-Assay erfolgte wie unter 2.1.3 beschrieben.

## 2.3.2 Messung der Proteasomaktivität mit fluorogenen Substraten

### *Funktionsweise der fluorogenen Substrate*

Fluorogene Substrate werden zur Messung der Aktivität von Peptidasen eingesetzt. Das proteasomspezifische Substrat Suc-LLVY-AMC besteht aus einem Peptid (Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin), welches das Schnittmotiv für die *chymotrypsin-like* Aktivität beinhaltet, und dem C-terminal angehängten inaktiven 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC), welches erst durch die Degradation des Peptids aktiviert wird. Das bei dieser Reaktion entstehende frei fluoreszierende AMC wird mittels Spektrofluorometer gemessen. Je höher die *chymotrypsin-like* Aktivität des Proteasoms, desto höher die gemessene Fluoreszenz.

### *Durchführung der Proteasomaktivitätsmessung in murinem Leberzelllysat*

Für die Bestimmung der Proteasomaktivität im Zellextrakt wurden für die Messung der *chymotrypsin-like* Aktivität 10 µg Proteinsuspension pro Loch einer 96-er Lochplatte in 20 µl *Aqua destillata* angesetzt. Anschließend wurden zu jeder Probe (Behandlungsgruppe: n = 14♂, 15♀/ Kontrollgruppe: n = 12♂, 15♀) je 100 µl des vorbereiteten Mastermix, der kühl und lichtgeschützt gelagert werden musste, gegeben. Des Weiteren wurde die Lochplatte zur Kontrolle sowie zum Abgleich mit AMC-Standard (Gesamtvolumen 120 µl) versehen. Die Lochplatte wurde sofort abgedeckt und 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Platte bei 355 nm Exzitation und 460 nm Emission in einem Fluorometer gemessen. Die Emissionswerte korrelieren mit der relativen Aktivität des Proteasoms. Je höher die Aktivität dieses multikatalytischen Komplexes ist, desto intensiver ist die Fluoreszenz. Die enzymatische Aktivität wurde als prozentuale Aktivität im Vergleich zur Kontrolle berechnet.

Tabelle 2.7: Material für die Proteasomaktivitätsmessung

Material	Hersteller
<i>Mastermix</i>	
60 µl 2x 26S-Inkubationspuffer	siehe unten
23,3 µl <i>Aqua destillata</i>	
0,22 µl 0,5 M DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
6 µl 100 mM ATP, Adenosintriphosphat	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
10 µl 2 mM Suc-LLVY-AMC	BACHEM, Bubendorf, Schweiz
0,2 µl Phosphokreatin-Kinase (1 U/ µl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.
0,5 µl 1 M Phosphokreatin	Merck, Darmstadt, Deutschland

---

<i>2x 26S-Inkubationspuffer</i>	
450 mM Tris, pH 7,8 (37 °C), pH 8,2 (Raumtemperatur)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
90 mM KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
15 mM Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O, Magnesiumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
15 mM MgCl <sub>2</sub> , Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland

---

96-er Lochplatte	Greiner, Kremsmünster, Österreich
SpectraMax GeminiEM Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.

---

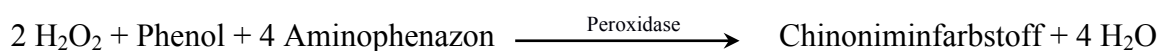
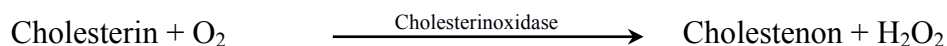
## 2.4 Quantitative Bestimmung von Cholesterin

### 2.4.1 Messprinzip der enzymatischen Cholesterinbestimmung

Roeschlau und Allain beschrieben 1974 die erste vollenzymatische Methode zur quantitativen Cholesterinbestimmung. Es handelt sich dabei um einen enzymatischen Farbstest, bei dem mithilfe von Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase das Cholesterin bestimmt werden kann. Die Cholesterinester werden unter Zugabe von Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten.



Das freie Cholesterin wird vom Luftsauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das Wasserstoffperoxid reagiert zusammen mit 4-Aminophenazon und Phenol unter Einfluss des Katalysators Peroxidase zu einem roten Farbstoff, Chinonimin (4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon), dessen Farbintensität direkt proportional zur Cholesterinkonzentration ist. Die Farbintensität kann photometrisch gemessen werden.



## 2.4.2 Messung des Cholesteringehalts in murinem Serum

Die gewonnenen Vollblutproben (Behandlungsgruppe: n = 14♂, 15♀/ Kontrollgruppe: n = 12♂, 15♀) wurden bei 14.000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand (Serum) abpipettiert. Bei der gleichzeitigen Messung des Cholesteringehalts von mehreren Seren wurden die Proben, die Arbeitsreagenzien, die Lösungen der Standardreihe und *Aqua destillata* für die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte auf Eis gelagert, so dass die erwartete Farbreaktion verzögert stattfand und die Signalstabilität für die photometrische Messung gewährleistet blieb.

In ein Eppendorfgefäß wurden je 4 µl einer Serumprobe und 400 µl Arbeitsreagenz R1 hineinpipettiert und mithilfe des Vortexmischers 30 s durchmischt. Weiterhin wurden je 4 µl der Standardreihe (25 mg/ dl, 50 mg/ dl, 100 mg/ dl, 200 mg/ dl, 400 mg/ dl) und je 4 µl *Aqua destillata* (Reagenzienleerwert) mit je 400 µl Arbeitsreagenz R1 versetzt und durchmischt. Die entstandenen Lösungen wurden als Doppelwerte in eine 96-er Lochplatte pipettiert, d. h. es wurden pro Probenloch 195 µl der Probenlösung verwendet. Anschließend wurde die 96-er Lochplatte, in der sich sowohl die einzelnen Probenlösungen als auch die Proben der Standardreihe und des Reagenzienleerwerts befanden, für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach konnten die Extinktionen des Standards und der Proben gegen den Reagenzienleerwert mittels Spektrometer bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen werden. Die Signalstabilität war für 60 min gewährleistet.

Tabelle 2.8: Material für die Messung der Cholesterinkonzentration

Material	Hersteller
<i>Arbeitsreagenz R1 (Fluitest® CHOL)</i> 90 mmol/ l Pipes Puffer, pH 6,9 26 mmol/ l Phenol 200 U/ l Cholesterinoxidase 300 U/ l Cholesterinesterase 1250 U/ l Peroxidase 0,4 mmol/ l 4-Aminophenazon	Analyticon, Lichtenfels, Deutschland
<i>Standardlösung R4 (Fluitest® CHOL)</i> 200 mg/ dl Cholesterin	Analyticon, Lichtenfels, Deutschland
96-er Lochplatte	Greiner, Kremsmünster, Deutschland



### 2.4.3 Berechnung der Cholesterinkonzentration

Das Programm WinRead berechnet unter Verwendung der gemessenen Extinktionswerte der Serumproben (Behandlungsgruppe: n = 14♂, 15♀/ Kontrollgruppe: n = 12♂, 15♀) und mithilfe der Extinktionswerte der Standardreihe (Standardkurve) die Cholesterinkonzentration der einzelnen Serumproben in mg/ dl. Der Messbereich des verwendeten Tests reicht von 3 bis 800 mg/ dl bzw. von 0,08 bis 20,7 mmol/ l Cholesterin. Die gewonnenen Serumproben bei Versuchsende ließen höhere Konzentrationen außerhalb dieses Bereiches erwarten und wurden deshalb um den Faktor zehn verdünnt. Die errechnete Cholesterinkonzentration der zuvor verdünnten Proben wurde mit dem Verdünnungsfaktor zehn multipliziert und bezifferte dann den gemessenen Cholesteringehalt im Blut des Tieres bei Versuchsende.

## 2.5 Microarray-Genexpressionsanalyse

Eppendorfgefäße mit den zur RNA-Analyse entnommenen Aorten (Baseline: n = 4♂/ Behandlungsgruppe: n = 4♂/ Kontrollgruppe: n = 4♂) wurden auf Trockeneis an *Miltenyi Biotec* verschickt. Die Genexpressionsanalyse beschränkte sich auf die männlichen Tiere.

Die RNA wurde unter Verwendung von TRIZol (*guanidinium thiocyanate-phenol*) und eines standardisierten Protokolls isoliert. Es erfolgte eine Qualitätskontrolle der RNA-Proben *via Agilent 21000 Bioanalyzer platform (Agilent Technologies, Palo Alto, U.S.A.)*. Äquivalente Mengen Aorten-RNA von Tieren einer Versuchsgruppe (n = 4♂) wurden zu einem RNA-Pool zusammengefasst. Für die lineare RNA-Amplifikation wurde das *Agilent Low RNA Input Linear Amp Kit* verwendet. 1 µg eines jeden RNA-Pools wurde als Ausgangsmaterial für die Synthese von cDNA eingesetzt. Anschließend wurde, wie im Protokoll des Herstellers vorgesehen, die Hälfte des Reaktionsgemischs für die Synthese der cRNA und die Cy3-Fluoreszenzmarkierung verwendet. Der Gehalt an cRNA und die Aufnahme rate des fluoreszierenden Farbstoffs wurden mithilfe des ND-1000 Spectrophotometers (*NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, U.S.A.*) gemessen. Die Hybridisierung wurde nach dem *Agilent 60-mer oligo microarray processing protocol* unter Verwendung des *Agilent Gene Expression Hybridization Kit* durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurde 1,65 µg Cy3-markierte fragmentierte cRNA über Nacht (17 Stunden bei 65 °C) im entsprechenden Puffer in *Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarrays (4x44K)* mithilfe der von *Agilent* empfohlenen Hybridisierungskammer und des Hybridisierungsofens

hybridisiert. Am Ende wurde die Microarrays mit dem *Agilent Gene Expression Wash Buffer 1* für 1 min bei Raumtemperatur gespült. Es erfolgte eine zweite Spülung mit dem auf 37 °C erhitzten *Agilent Gene Expression Wash Buffer 2* für ebenfalls 1 min vor der finalen 30-sekündigen Spülung mit Acetonitril. Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Microarrays wurden mit dem *Agilent Microarray Scanner System* ermittelt.

## 2.6 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistic Version 23<sup>®</sup>. Alle Daten wurden auf das Vorliegen einer Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) überprüft und sie wiesen alle eine Normalverteilung auf. Es wurden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) innerhalb jeder Versuchstiergruppe für jedes Datenset berechnet. Je nach Fragestellung erfolgte die Berechnung einer 2- oder 3-faktoriellen ANOVA. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Für die graphische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot<sup>®</sup> verwendet.

Bei der Microarray-Genexpressionsanalyse diente die *Agilent Feature Extraction Software (FES)* dem Auslesen und der Verarbeitung der Microarray-Bilddateien. Die Software ermittelte die Intensität der Fluoreszenzsignale (inklusive Hintergrundsubtraktion), sonderte Ausreißer aus und errechnete die statistische Signifikanz (p-Werte). Zur Bestimmung der unterschiedlichen Genexpression wurden die Dateien aus FES unter Verwendung des *Rosetta gene expression data analysis system (Rosetta Biosoftware, Seattle, U.S.A)* weiter analysiert. Mithilfe des *Rosetta Resolver* Fehlermodells wurde für jedes Vielfache ein p-Wert errechnet. Alle Gene mit Expressionsraten  $< 0,5$  und  $> 2$  und einem p-Wert  $< 0,01$  wurden zur Erstellung der Tabellen der signifikant regulierten Gene ausgewählt. Um möglichst unverfälschte Informationen über Funktionsmuster der regulierten Gene zu erhalten, wurde die Softwareanwendung *Ontologizer v2.1 (Computational Biology Group, Institute for Medical Genetics and Human Genetics, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany, <http://compbio.charite.de/index.php/ontologizer2.html>)* zur Analyse der Daten aus den Microarrays verwendet. Signifikant überrepräsentierte *gene ontology (GO) terms* wurden durch die Eltern-Kind-Analyse und die Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestung<sup>100</sup> ermittelt. Wir erachteten eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  als signifikant.

## 3.0 ERGEBNISSE

### 3.1 Dosisfindung für die Applikation von Bortezomib

Um eine möglichst niedrige und nicht toxische, aber wirksame Dosierung für den Proteasominhibitor Bortezomib zu finden, wurden Experimente mit Ub<sup>G76V</sup>GFP1-Mäusen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.3). Ub<sup>G76V</sup>GFP1-Mäuse (Charles River, Wilmington, U.S.A.) sind Träger des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), das ubiquitär in den Tieren vorliegt. Der Ub<sup>G76V</sup>GFP-Reporter trägt ein Ubiquitin-Fusions-Degradationssignal bestehend aus einem N-terminal gebundenen Ubiquitin, das als Bindeglied für weitere Ubiquitinmoleküle dient<sup>101</sup>.

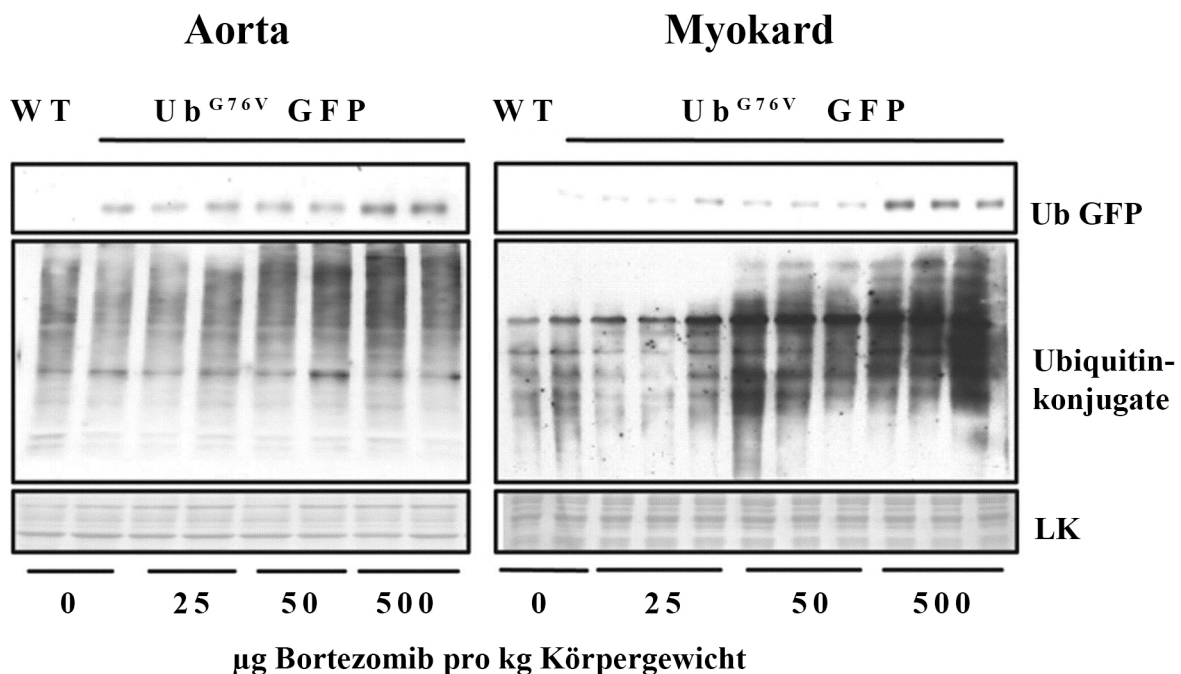


Abbildung 3.1: Die Injektion von 50 µg Bortezomib pro kg Körpergewicht (KG) führt zur partiellen Proteasominhibition. Westernblots eines Ub<sup>G76V</sup>GFP-Reporterproteins und von Ubiquitinkonjugaten in Aorten- und Herzgewebe von Wildtyp- und Ub<sup>G76V</sup>GFP (grün fluoreszierendes Protein)-Mäusen 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion unterschiedlicher Bortezomibdosierungen. 50 µg/ kg KG war die geringste Dosis, die zur Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten führte, aber keine nachweisbare Akkumulation von Ub<sup>G76V</sup>GFP zeigte. Es erfolgte eine partielle Hemmung der Proteasomaktivität. Im Gegensatz dazu führte die Injektion von 500 µg/ pro kg KG zu einer ausgesprochen starken Proteasominhibition mit erhöhter Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten und des Ub<sup>G76V</sup>GFP-Reporterproteins. Amidoschwarzfärbung diente als Ladekontrolle (LK).

Eine Polyubiquitinkette aus mindestens vier Ubiquitinmolekülen kann die Degradation eines Proteins einleiten<sup>32</sup>. Die Hemmung des UPS führt zu einer Anhäufung des GFP-Reporters im

Gewebe. Die Akkumulation von Ub<sup>G76V</sup>GFP und die nachweisbare Fluoreszenz im Gewebe sind abhängig von der Dosis des applizierten Proteasominhibitors<sup>101</sup>.

Abbildung 3.1 zeigt Westernblots eines Ub<sup>G76V</sup>GFP-Reporterproteins und von Ubiquitin-konjugaten in Aorten- und Herzgewebe von Wildtyp- und Ub<sup>G76V</sup>GFP-Mäusen 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion unterschiedlicher Bortezomibdosierungen. Eine Dosis von 50 µg/ kg Körpergewicht Bortezomib bewirkte eine erhöhte Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten in der Aorta und im Myokard, wenngleich diese geringer ausfiel als in den Lysaten der Tiere, die mit 500 µg/ kg Körpergewicht behandelt worden waren. Die Applikation von 25 µg/ kg Körpergewicht Bortezomib zeigte keine messbaren Effekte. Eine Akkumulation von Ub<sup>G76V</sup>GFP konnte erst nach Injektion von 500 µg/ kg Körpergewicht Bortezomib beobachtet werden.

Die Dosis von 50 µg/ kg Körpergewicht Bortezomib liegt unter der bekannten toxischen Dosierung von 100 µg/ kg Körpergewicht für Affen und Nagetiere<sup>102</sup> und ist eine moderate, aber wirksame Dosis für die partielle proteasomale Hemmung im Herz-Kreislaufsystem, deshalb wählten wir diese Dosierung für den vorliegenden Tierversuch.

### **3.2 Einfluss von Bortezomib auf das Körpergewicht**

Die Behandlung mit Bortezomib hatte keinen Einfluss auf das Körpergewicht der LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse. Die männlichen Versuchstiere der Behandlungsgruppe (n = 14♂) wogen bei Versuchsstart durchschnittlich 26 g ± 2,8 und die Tiere der männlichen Kontrollgruppe (n = 12♂) durchschnittlich 27 g ± 1,5. Auch die Mittelwerte der Gewichte zu Versuchsende unterschieden sich mit 28 g ± 2,3 in der männlichen Behandlungsgruppe und mit 29 g ± 3,4 in der männlichen Kontrollgruppe nicht signifikant. Es wurden zwei Tiere aus der männlichen Behandlungsgruppe und vier Tiere aus der männlichen Kontrollgruppe von der Datenanalyse ausgeschlossen, weil sie vorzeitig verstarben. Die weiblichen Tiere wogen in der Behandlungsgruppe (n = 15♀) und in der Kontrollgruppe (n = 15♀) zum Versuchsstart durchschnittlich 20 g ± 0. Bei Versuchsende erreichte die weibliche Behandlungsgruppe einen Mittelwert von 24 g ± 1,7 und die weibliche Kontrollgruppe einen Mittelwert von 23 g ± 2,1 (siehe Tabelle 3.1). Aus der weiblichen Behandlungsgruppe und aus der weiblichen Kontrollgruppe wurde je ein Tier wegen Krankheit von der Datenanalyse ausgeschlossen. Die weiblichen Tiere wogen weniger als die männlichen Versuchsmäuse. Alle Tiere zeigten mit dem Futterwechsel von standardisiertem Mäusealleinfutter hin zu mit Cholesterol angereichertem Experimentalfutter eine geringfügige

Gewichtsabnahme. In der vierten Behandlungswoche hatten die Tiere im Mittel wieder ihr Ausgangsgewicht erreicht. Ab der vierten Woche zeigte sich in allen vier Tiergruppen eine stetige Tendenz der Gewichtszunahme (siehe Abbildung 3.2).

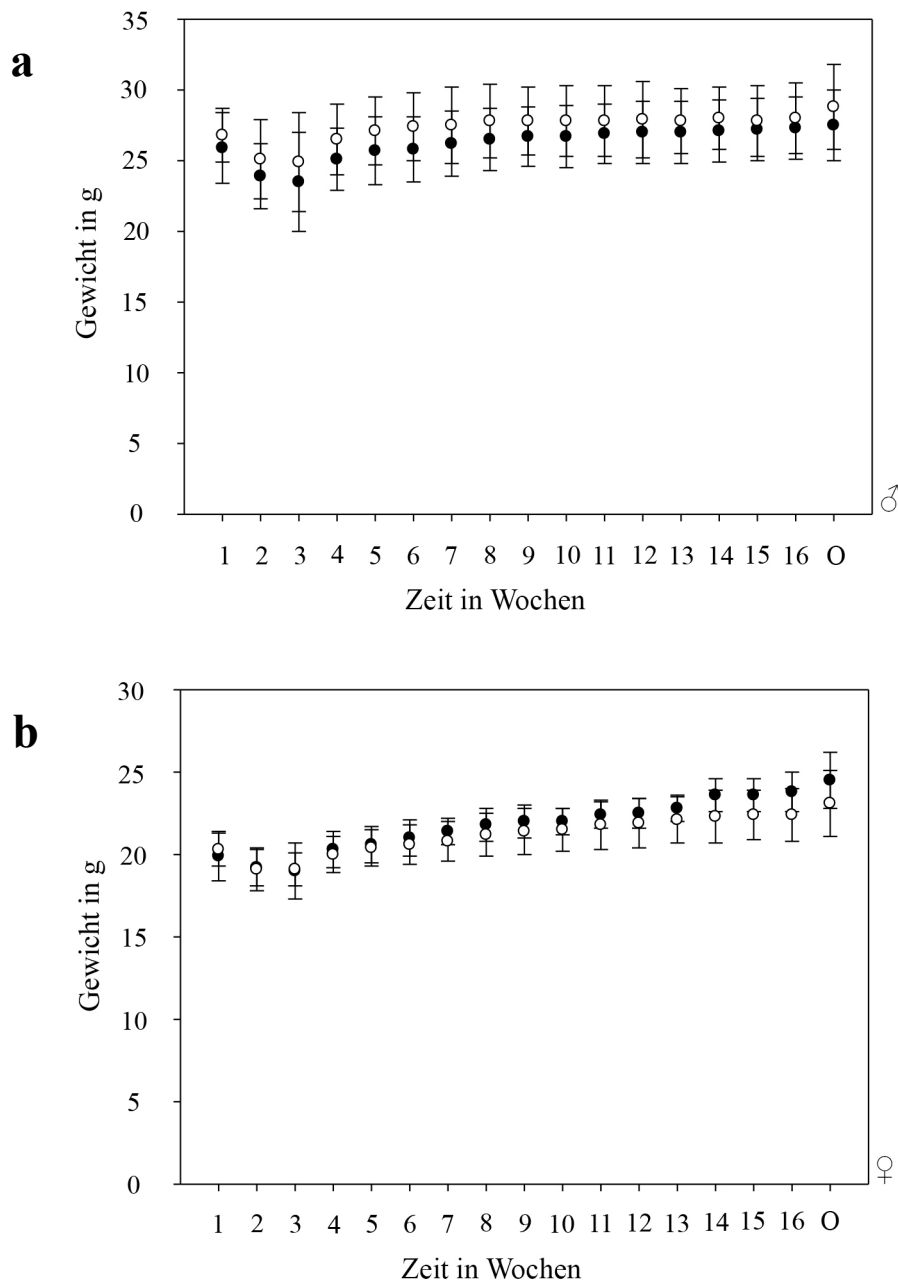


Abbildung 3.2: **Bortezomib hat in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen unter fett- und cholesterolreicher Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) keinen Einfluss auf das Körpergewicht.** Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der wöchentlich gemessenen Gewichte von männlichen (a) und weiblichen (b) LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen bis zur Opferung (O). Alle Tiere erhielten 16 Wochen lang zweimal wöchentlich 50 µg Bortezomib pro kg Körpergewicht (● ♂ n=14, ♀ n=15) oder 0,9 %-ige Natriumchloridlösung (○ ♂ n=12, ♀ n=15) als intraperitoneale Injektion. Bei Versuchsstart erfolgte ein Futterwechsel von Standardfutter hin zu einer Hochcholesteroldiät. Diese Futterumstellung ging bei den meisten Tieren mit einer vorübergehenden Gewichtsabnahme einher, die bereits in Versuchswoche vier wieder ausgeglichen war.

### 3.3 Serumcholesterolspiegel

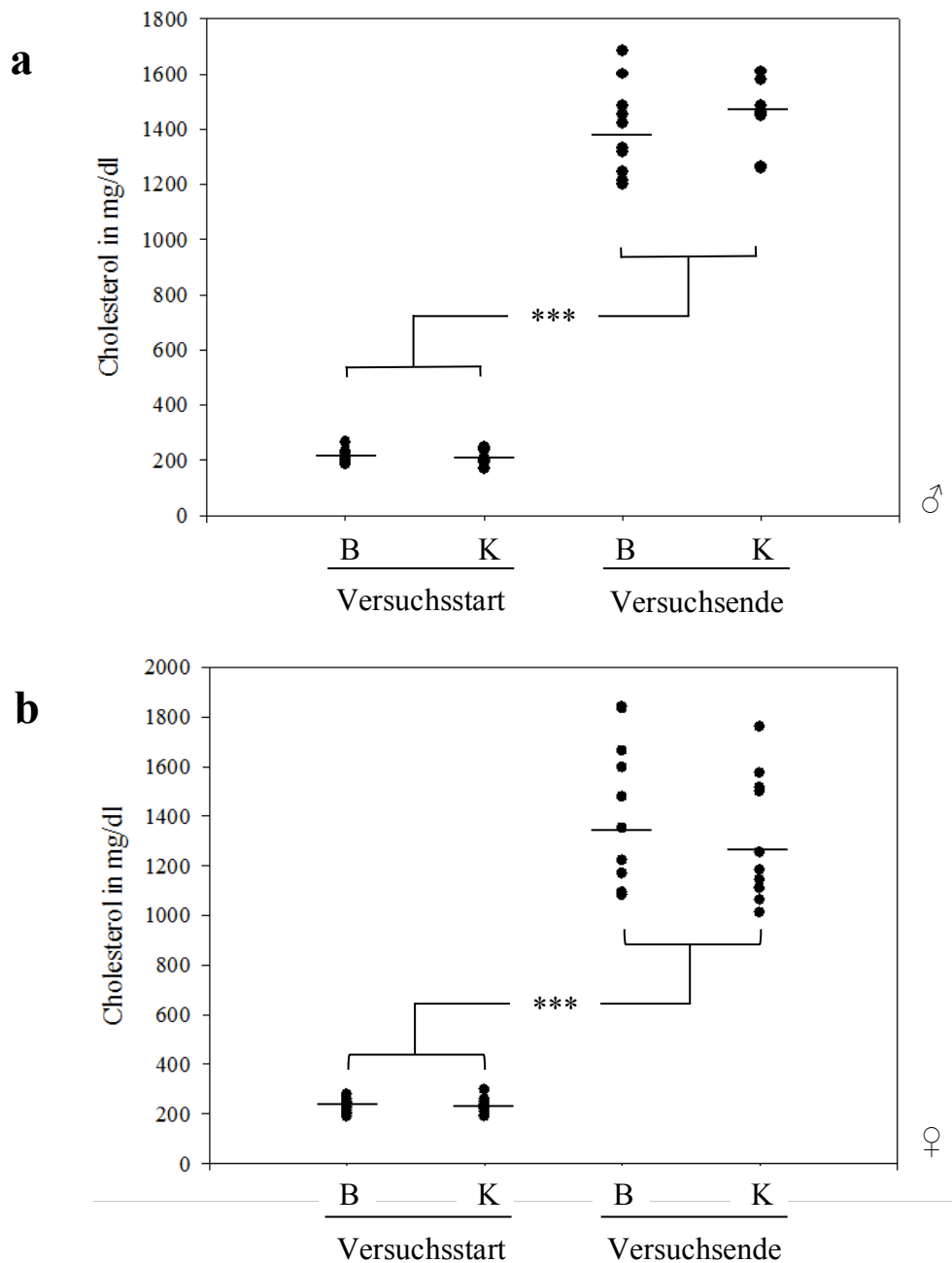


Abbildung 3.3: Die Injektion von Bortezomib für 16 Wochen hat in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen unter fett- und cholesterolreicher Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) keinen Einfluss auf das Serumcholesterol. Dargestellt sind die Serumcholesterolwerte der männlichen (a) und weiblichen (b) LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse als Einzelwerte (●) zu Versuchsstart und Versuchsende mit eingezeichnetem Mittelwert für jede Versuchstiergruppe. In der Behandlungsgruppe (B: ♂ n=14, ♀ n=15), die zweimal wöchentlich 16 Wochen lang eine intraperitoneale Injektion mit 50 µg Bortezomib pro kg Körpergewicht erhielt, und in der Kontrollgruppe (K: ♂ n=12, ♀ n=15), die zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion mit 0,9 %-iger Natriumchloridlösung erhielt, stieg das Serumcholesterollevel unter Hochcholesteroldiät zu Versuchsende im Vergleich zum Versuchsstart signifikant an (F(1, 35) = 969,56/ \*\*\*p≤0,001).

Der Cholesterolspiegel der Tiere wurde zu Beginn des Versuchs und zum Zeitpunkt der Opferung gemessen. Für die Serumcholesterolwerte wurde eine ANOVA mit den Faktoren Zeitpunkt (Versuchsstart/ Versuchsende), Geschlecht und Gruppenzugehörigkeit berechnet. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Cholesterolverte am Versuchsende im Vergleich zum Versuchsstart ( $F(1,35) = 969,56/ p \leq 0,001$ ). Alle anderen Effekte (Haupt- und Interaktionseffekte) waren nicht signifikant. Die Behandlung mit Bortezomib hatte keinen Einfluss auf das Serumcholesterollevel (siehe Abbildung 3.3). Bei Versuchsstart lag der durchschnittliche Cholesterolverwert bei 220 mg/ dl ( $\pm 25$ ). Dies spiegelt den Serumcholesterolgehalt von LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Normaldiät wieder. Das Cholesterollevel bei Versuchsende ergab für die männlichen Tiere (Behandlungsgruppe (B): n = 14♂, Kontrollgruppe (K): n = 12♂) einen Mittelwert von 1165 mg/ dl ( $\pm 320$ ) und für die weiblichen Tiere (B: n = 15♀, K: n = 15♀) einen Mittelwert von 1283 mg/ dl ( $\pm 297$ , siehe Tabelle 3.1). Aus der männlichen Behandlungsgruppe wurden zwei Tiere, aus der männlichen Kontrollgruppe wurden vier Tiere und aus der weiblichen Behandlungs- sowie Kontrollgruppe wurde je ein Tier wegen vorzeitigem Tod oder Krankheit von der Datenanalyse ausgeschlossen.

### 3.4 Einfluss von Bortezomib auf die Proteasomaktivität

Die Berechnung einer ANOVA in Bezug auf die proteasomale Aktivität mit den Faktoren Geschlecht und Gruppenzugehörigkeit (Behandlungsgruppe oder Kontrollgruppe) ergab einen signifikanten Haupteffekt der Behandlung  $F(1, 52) = 18,278/ p < 0,001$ . Die Behandlungsgruppe zeigte eine niedrigere Proteasomaktivität (B: 795 RFU  $\pm 186$ ) als die Kontrollgruppe (K: 1026 RFU  $\pm 232$ ). Der Haupteffekt Geschlecht wurde ebenfalls signifikant  $F(1, 52) = 74,352/ p < 0,001$ . Die männlichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse (♂1139 RFU  $\pm 264$ ) zeigten eine signifikant höhere Proteasomaktivität im Vergleich zu den weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen (♀682 RFU  $\pm 153$ ). Der Interaktionseffekt der beiden Faktoren Geschlecht und Gruppenzugehörigkeit war nicht signifikant  $F(1, 52) = 2,480/ p = 0,121$ .

Der anschließend durchgeführte t-Test ergab innerhalb der weiblichen Tiergruppe eine signifikant niedrigere Proteasomaktivität in der Behandlungsgruppe (n = 15♀, 503 RFU  $\pm 111/ 62$  % Proteasomaktivität) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 15♀, 811 RFU  $\pm 173/ 100$  % Proteasomaktivität,  $t(28) = -5,803/ p < 0,001$ , siehe Abbildung 3.4). In der männlichen Tiergruppe geht der numerische Effekt bezüglich der Proteasomaktivität in die gleiche Richtung,

dennoch wird der Unterschied zwischen Behandlungs- ( $n = 14♂$ ,  $1040 \text{ RFU} \pm 222/ 88 \%$  Proteasomaktivität) und Kontrollgruppe ( $n = 12♂$ ,  $1183 \text{ RFU} \pm 264/ 100 \%$  Proteasomaktivität) nicht signifikant ( $t(24) = -1,491$ ;  $p=0,149$ , siehe Tabelle 3.1).

Bis zum Versuchsende waren zwei Tiere aus der männlichen Behandlungsgruppe und vier Tiere aus der männlichen Kontrollgruppe vorzeitig verstorben. In der weiblichen Behandlungs- und Kontrollgruppe erkrankte je ein Tier. Die betroffenen Tiere wurden von der Datenanalyse ausgeschlossen.

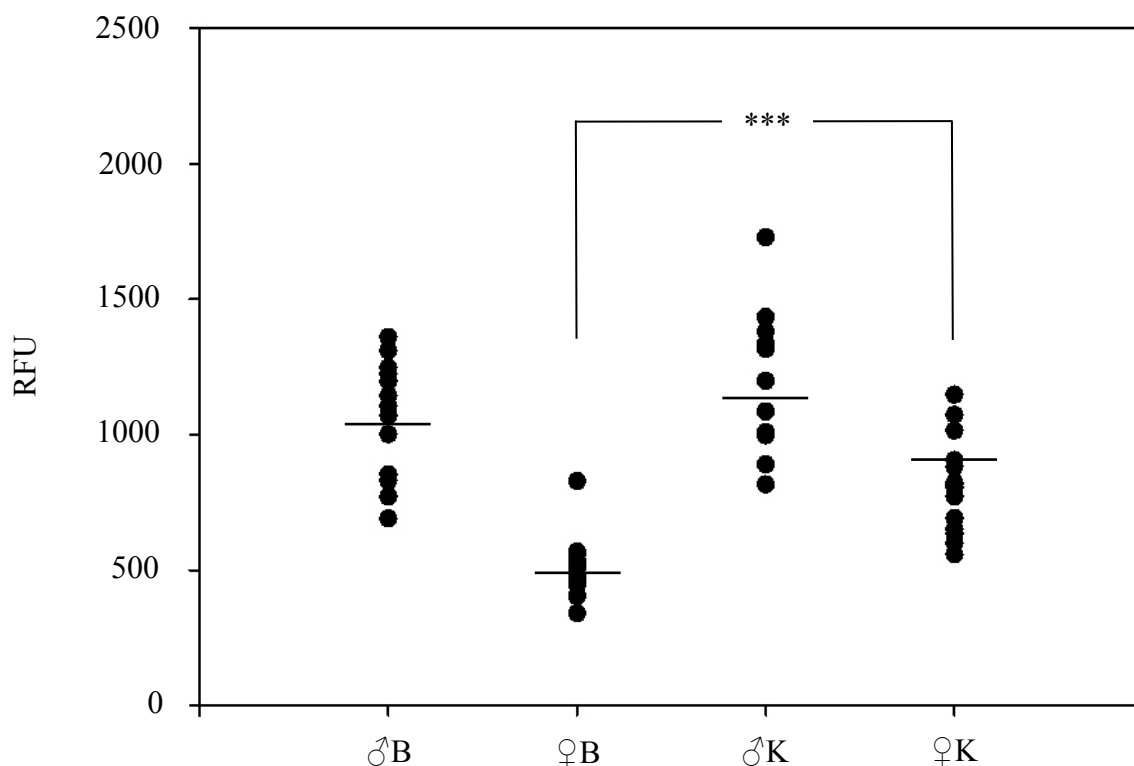


Abbildung 3.4: **Die proteasomale Aktivität in Leberlysaten von LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 16 Wochen Hochcholesteroldiät und zweimal wöchentlicher intraperitonealer Applikation von Bortezomib oder Natriumchloridlösung.** Dargestellt sind die Einzelwerte (●) und der Mittelwert pro Versuchstiergruppe der *chymotrypsin-like* Aktivität in Leberlysaten von männlichen und weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, die für 16 Wochen eine fett- und cholesterolreiche Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) erhielten und entweder zweimal wöchentlich 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht (B: ♂ n=14, ♀ n=15) oder 0,9 %-ige Natriumchloridlösung (K: ♂ n=12, ♀ n=15) als intraperitoneale Injektion appliziert bekamen. Die Proteasomaktivität war in den Leberlysaten der weiblichen Behandlungsgruppe (♀B) signifikant niedriger als in den Leberlysaten der weiblichen Kontrollgruppe (♀K),  $t(28) = -5,803/ p<0,001$ . In der männlichen Tiergruppe ging der numerische Effekt in die gleiche Richtung, dennoch ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Proteasomaktivität zwischen männlicher Behandlungs- (♂B) und Kontrollgruppe (♂K),  $t(24) = -1,491/ p=0,149$ . Die Männchen zeigten eine signifikant höhere Proteasomaktivität als die Weibchen, d.h. der Haupteffekt Geschlecht wurde signifikant ( $F(1, 52) = 74,352/ p<0,001$ ).



### 3.5 Einfluss von Bortezomib auf die Plaueflächen der Aorten

Die Plaueelast der Aorten wurde mithilfe der *En-Face*-Methode bestimmt (siehe Abschnitt 2.2) und als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche angegeben. Die Berechnung einer ANOVA mit den Faktoren Plaueefläche, Geschlecht und Gruppenzugehörigkeit ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Ausprägung der Plaueeflächen bei Versuchsende im Vergleich von Kontroll- (K: 26 %  $\pm$  6,2) zu Behandlungsgruppe (B: 27,7 %  $\pm$  9,1/  $F(1, 36) = 0,583/ p=0,45$ ). Die zweimal wöchentliche niedrig dosierte Applikation von Bortezomib (50  $\mu\text{g}/ \text{kg}$  Körpergewicht) führte bei einer Versuchsdauer von 16 Wochen zu keiner signifikanten Veränderung der Plaueefläche in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen unter fett- und cholesterolreicher Diät. Die männlichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse (B: n = 10♂, K: n = 8♂) zeigten im Vergleich zu den weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen (B: n = 11♀, K: n = 11♀) signifikant größere Plaueeflächen ( $F(1, 36) = 48,842/ p \leq 0,001$ , siehe Tabelle 3.1). Von der Datenanalyse wurden die Tiere ausgeschlossen, die im Verlauf des Experiments vorzeitig verstarben oder erkrankten. Das betraf je ein Tier der weiblichen Behandlungs- und Kontrollgruppe sowie zwei Tiere aus der männlichen Behandlungsgruppe und vier Tiere aus der männlichen Kontrollgruppe. Für die Microarray-Genexpressionsanalyse (siehe Abschnitt 3.6) wurden jeweils vier Tiere aus der männlichen und weiblichen Behandlungs- und Kontrollgruppe abgezogen.

Für die Einzelabschnitte, den *Arcus aorticus*, die *Aorta thoracica* und die *Aorta abdominalis*, wurde ebenfalls der prozentuale Anteil der Plaueefläche an der Gesamtfläche des Gefäßabschnitts bestimmt. Die Berechnung einer ANOVA mit den Faktoren Aortenabschnitt, Geschlecht und Gruppenzugehörigkeit ergab keinen signifikanten Einfluss der Behandlung mit Bortezomib auf die Plaueeflächen ( $F(1, 108) = 2,359/ p=0,127$ ). Der Abschnitt der *Aorta thoracica* war im Mittel zu 20,7 % ( $\pm$  7,6) von atherosklerotischen Plaues bedeckt. Für den Abschnitt der *Aorta abdominalis* ergab sich ein Mittelwert von 18 % ( $\pm$  11,5). Der Aortenbogen war in allen vier Versuchstiergruppen am stärksten von Atherosklerose betroffen und wies eine Plaueefläche von durchschnittlich 63,1 % ( $\pm$  6,6) auf. Bei den männlichen Tieren (Behandlungsgruppe (B): n = 10♂, Kontrollgruppe (K): n = 8♂) war der Aortenbogen mehr als doppelt so stark von Atherosklerose betroffen als die *Aorta thoracica* oder die *Aorta abdominalis*. Die weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse (B: n = 11♀, K: n = 11♀) zeigten hinsichtlich der errechneten Plaueefläche für den Abschnitt des Aortenbogens einen circa vierfach größeren bzw. sechsfach größeren prozentualen Plaueeflächenanteil im Aortenbogen im Vergleich zu der *Aorta thoracica* bzw. der *Aorta abdominalis*. Obwohl die 3-fach- Interaktion der ANOVA kein signifikantes

Ergebnis zeigte, wurde untersucht, ob sich die Plauefläche des Arcus aorticus der Männchen, die nach visuellem Anschein in der Behandlungsgruppe erhöht war, sich in der Behandlungs- und Kontrollgruppe signifikant unterschied. Der durchgeführte Post-hoc- t-Test ergab nach Bonferroni-Korrektur keinen signifikanten Unterschied ( $t(16)=2,787/ p=0,013$ , Bonferroni-korrigiertes Signifikanzkriterium:  $0,05/ 6=0,0083$ , siehe Abbildung 3.6).

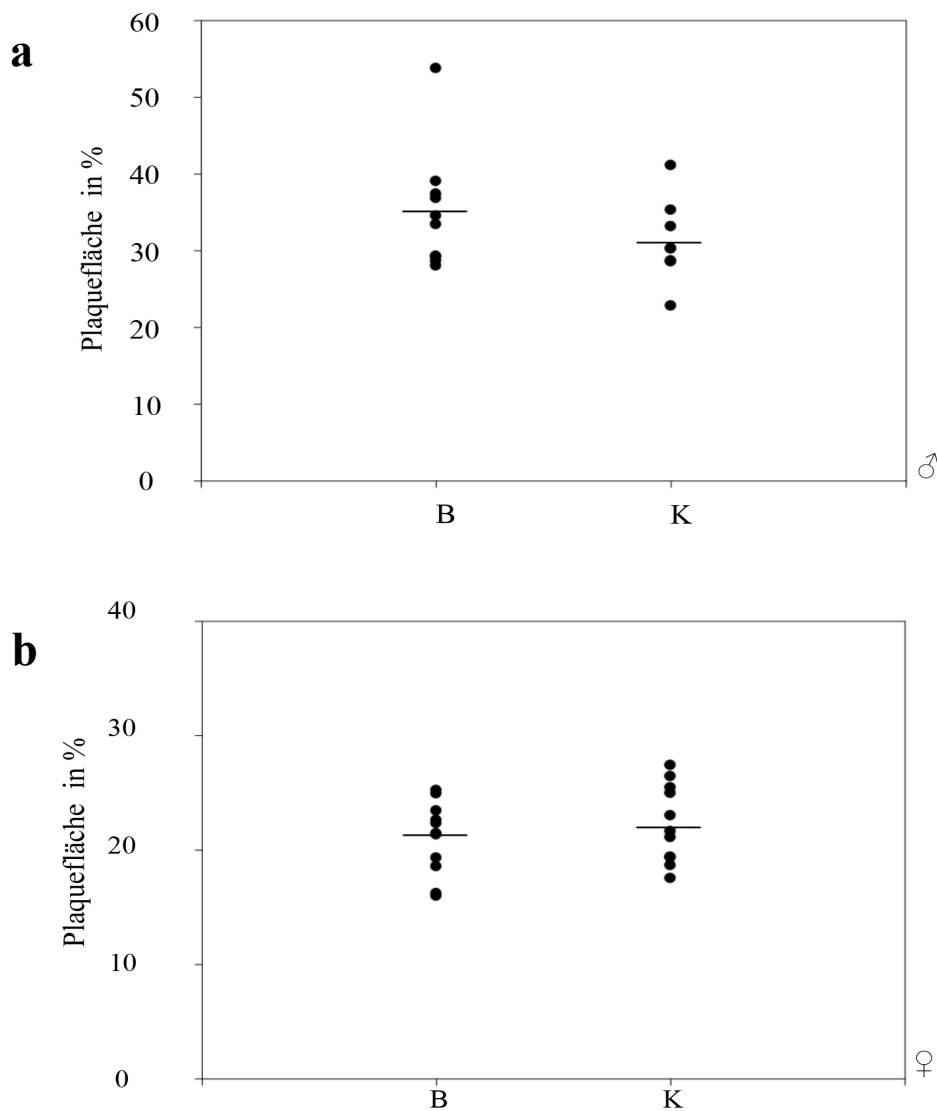


Abbildung 3.5: Die Injektion von Bortezomib für 16 Wochen hatte in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen unter fett- und cholesterreicher Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) keinen Einfluss auf die Gesamtgröße der Plauefläche in der Aorta. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Plauefläche an der Gesamtfläche der Aorta pro Tier (●) in männlichen (a) und weiblichen (b) LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, die für 16 Wochen unter Hochcholesteroldiät gehalten wurden. Eine horizontale Linie kennzeichnet den Mittelwert in jeder Versuchstiergruppe. Die Plaueelast in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, die zweimal wöchentlich 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht (Behandlungsgruppe (B): ♂ n=10, ♀ n=11) als intraperitoneale Injektion erhielten, unterschied sich am Versuchsende nicht signifikant von der Plaueelast der LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse, denen stattdessen 0,9 %-ige Natriumchloridlösung (Kontrollgruppe (K): ♂ n=8, ♀ n=11) appliziert wurde (K: 26 % ± 6,2/ B: 27,7 % ± 9,1/ F(1, 36) = 0,58/ p=0,45). Männliche LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten signifikant größere Plaueflächen als weibliche LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse (F(1, 36) = 48,842/ p≤0,001).

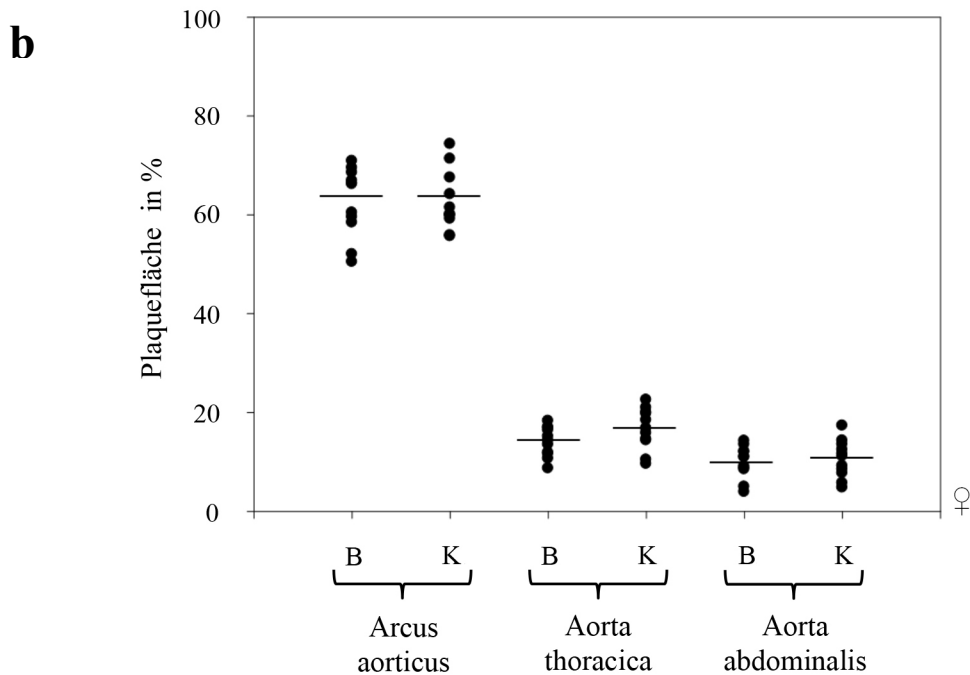
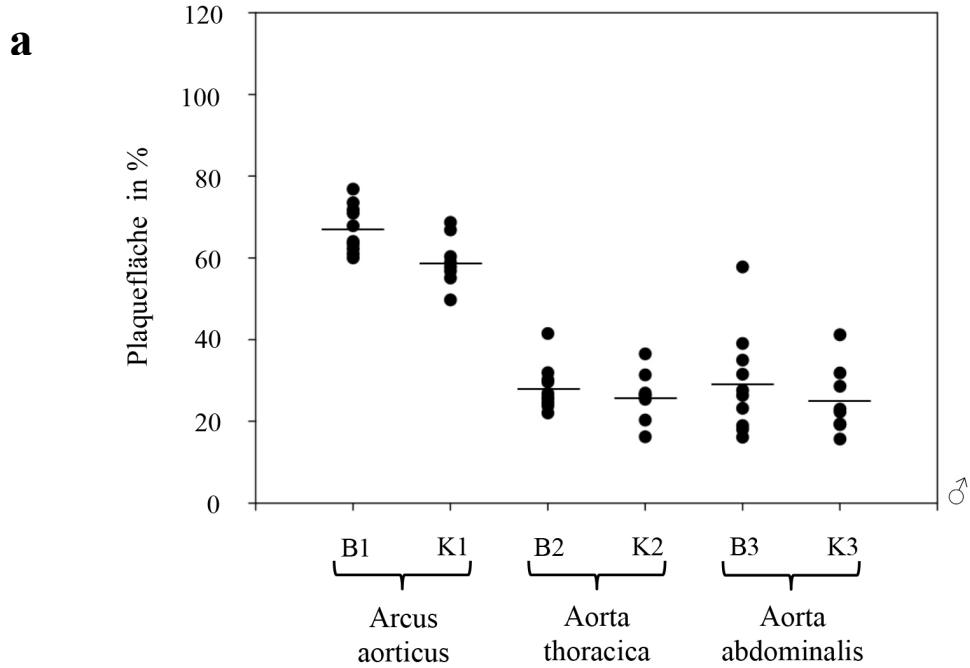


Abbildung 3.6: **Plaueflächen drei definierter Aortenabschnitte.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Plaueflächen an der Gesamtfläche des *Arcus aorticus*, der *Aorta thoracica* und der *Aorta abdominalis* pro Tier (●). Die LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse erhielten 16 Wochen lang eine fett- und cholesterolareiche Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterole) und bekamen zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion mit 50 µg Bortezomib pro kg Körpergewicht (B) oder 0,9 %-iger Natriumchloridlösung (K) appliziert. Eine horizontale Linie kennzeichnet den Mittelwert in jeder Versuchstiergruppe. Die Aortenabschnitte zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Behandlungs- (B: ♂ n=10, ♀ n=11) und Kontrollgruppe (K: ♂ n=8, ♀ n=11, F(1,108) = 2,359/ p=0,127). Der *Arcus aorticus* ist der mit Abstand am stärksten von Plaue betroffene Aortenabschnitt.

Tabelle 3.1: **Körpergewicht (KG), Serumcholesterol, Proteasomaktivität und Plaquefläche im Überblick.** Nach 16-wöchiger fett- und cholesterolreicher Diät sowie zweimal wöchentlicher intraperitonealer Injektion von 50 µg Bortezomib/ kg KG in der Behandlungsgruppe (B: n = 14♂, 15♀) oder 0,9 %-iger Natriumchloridlösung in der Kontrollgruppe (K: n = 12♂, 15♀) wurde den LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen die Aorta für die Plaqueflächenberechnung und für die RNA-Extraktion sowie die Leber für die Messung der Proteasomaktivität in Leberlysaten entnommen. Der Serumcholesterolgehalt wurde bei Versuchsstart und Versuchsende in retrobulbär abgenommenem Blut bestimmt. Alle Tiere wurden regelmäßig gewogen. Je ein Tier aus der weiblichen Behandlungs- und Kontrollgruppe sowie zwei Tiere aus der männlichen Behandlungsgruppe und vier Tiere aus der männlichen Kontrollgruppe wurden aufgrund von Krankheit oder vorzeitigem Tod von der Datenanalyse ausgeschlossen.

		♂ B (n=14)	♂ K (n=12)	♀ B (n=15)	♀ K (n=15)
<b>Versuchsstart</b>	Körpergewicht (g)	26 ± 2,8	27 ± 1,5	20 ± 1,3	20 ± 1,1
	Cholesterol (mg/ dl)	212 ± 23	207 ± 24	228 ± 27	227 ± 31
<b>Versuchsende</b>	Körpergewicht (g)	28 ± 2,3	29 ± 3,4	24 ± 1,7	23 ± 2,1
	Cholesterol (mg/dl)	1311 ± 178	1096 ± 405	1355 ± 293	1306 ± 280
	Proteasomaktivität (RFU)	1040 ± 222 (88 %)	1283 ± 264 (100 %)	503 ± 111 (62 %)	811 ± 173 (100 %)
	Plaquefläche (%)	35 ± 7,7 (n=10*)	31 ± 5,4 (n=8*)	21 ± 3,2 (n=11*)	22 ± 3,4 (n=11*)

\* RNA-Extraktion: (B) n = 4♂, 4♀ (K) n = 4♂, 4♀

### 3.6 Genexpressionsanalyse (RNA-Microarray)

Die Tabelle 3.2 zeigt die Veränderungen in der Expression von Genen als die x-fache Erhöhung des Genexpressionslevels in den Aorten von LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 16-wöchiger fett- und cholesterolreicher Diät in der Behandlungs- (B: n = 4♂) und in der Kontrollgruppe (K: n = 4♂) im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, die im Alter von zehn Wochen geopfert wurden und zeitlebens eine Normaldiät erhielten (Baseline: n = 4♂). Bortezomib hatte in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium keinen Einfluss auf die veränderte Expression ausgewählter atheroskleroserelevanter Gene unter fett- und cholesterolreicher Diät in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Eine Ausnahme hiervon war die veränderte Expression der Ubiquitin C-terminale Hydroxylase L1 (UCHL1) unter Proteasominhibition mit Bortezomib im Vergleich zur Kontrollgruppe und im Vergleich zur Baseline.

### **3.6.1 Niedrig dosiertes Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Expression oxidativ wirksamer Gene**

#### ***Nox1, Nox3, Nox4***

Die Untereinheiten Nox1, Nox3 und Nox4 der Hyperoxid produzierenden Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat (NADPH)-Oxidase waren in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen auf transkriptioneller Ebene nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline hochreguliert. Die Expressionsraten zeigten sich in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Baseline ebenso hoch wie in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline. Der Proteasominhibitor Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Regulation von NADPH-Oxidase-Untereinheiten auf Transkriptionsniveau.

### **3.6.2 Niedrig dosiertes Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Expression (anti-)inflammatorisch wirksamer Gene**

#### ***ET-1, E-Selektin, VCAM1, ICAM1***

Das Adhäsionsmolekül und der Vasokonstriktor ET-1 waren auf mRNA-Niveau in der Kontrollgruppe nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät im Vergleich zur Baseline auf mehr als das Doppelte angestiegen. Die Expression von ET-1 auf transkriptioneller Ebene war in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Baseline ebenso hoch, d. h. die intraperitoneale Applikation von niedrig dosiertem Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Expressionsrate von ET-1. Auch die Adhäsionsmoleküle VCAM1, ICAM1 und E-Selektin waren in der Behandlungsgruppe, genauso wie in der Kontrollgruppe, auf transkriptioneller Ebene im Vergleich zur Baseline deutlich hochreguliert. Der Proteasominhibitor Bortezomib konnte das Expressionslevel der Adhäsionsmoleküle nicht erniedrigen.

#### ***Transforming growth factor***

Im Vergleich zur Baseline stieg die Expressionsrate von *transforming growth factor beta-induced* (TGF-βi) und *transforming growth factor beta 1* (TGF-β1) in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen auf Transkriptionsniveau in der Kontrollgruppe nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät um das 2- bis 3-fache an. Auch in der Behandlungsgruppe war die Expression von TGF-βi und

TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zur Baseline 2- bis 3-fach hochreguliert. Die Gabe von Bortezomib hatte keinen Effekt auf die Expression von TGF- $\beta$ i und TGF- $\beta$ 1 auf mRNA-Ebene.

### ***Tumor necrosis factor***

Auf die Expressionsrate der im RNA-Array aufgeführten *Tumor necrosis factor superfamily members* (TNFSF) hatte Bortezomib keinen Einfluss. Nur der TNFSF7 konnte durch die Gabe von Bortezomib in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf mRNA-Ebene herunterreguliert werden.

Acht von fünfzehn aufgeführten *Tumor necrosis factor receptor superfamily members* (TNFRSF) zeigten keinen Unterschied in der Regulation auf Expressionsebene im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Baseline. Auch unter Bortezomibgabe blieb die Expressionsrate dieser acht TNFRSF unreguliert im Vergleich zur Baseline. In der anderen Hälfte der aufgeführten TNFRSF stieg die Expression in der Kontrollgruppe auf transkriptioneller Ebene im Vergleich zur Baseline deutlich an, aber die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib hatte auch hier keinen Einfluss auf die Expressionslevel auf transkriptioneller Ebene.

*Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2 und 6* (TNFAIP 2 und 6) waren in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen auf mRNA-Ebene nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline deutlich hochreguliert. Die intraperitoneale Injektion von Bortezomib in der Behandlungsgruppe konnte die Expressionsrate von TNFAIP 2 und 6 nicht beeinflussen. Zusammenfassend hatte die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät keinen Einfluss auf die Expressionsrate von TNF auf mRNA-Niveau. TNFSF7 konnte durch die Gabe von Bortezomib in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe herunterreguliert werden.

### ***Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1***

Die Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (UCHL1) war in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium unter niedrig dosierter Bortezomibgabe auf Transkriptionsebene in ihrer Expressionsrate deutlich reguliert. Während die UCHL1 nach 16-wöchiger fett- und cholesterolreicher Diät in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline geringgradig hochreguliert war, bewirkte die Applikation von Bortezomib in der Behandlungsgruppe eine deutliche Hochregulation der UCHL1 auf Transkriptionsebene im Vergleich zur Baseline.

### **3.6.3 Niedrig dosiertes Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Genexpression von Transporterproteinen des reversen Cholesteroltransports**

#### ***ATP-binding cassette transporter A1 und ATP-binding cassette transporter G1***

Die Expression von *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) und *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1) auf mRNA-Ebene zeigte in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 16-wöchiger fett- und cholesterolreicher Diät in der Kontrollgruppe einen deutlichen Anstieg im Vergleich zur Baseline. Unter niedrig dosierter Proteasominhibition mit Bortezomib war die Expressionsrate von ABCA1 und ABCG1 in der Behandlungsgruppe ebenso hochreguliert, eine weitere Steigerung der Expression beider Transporterproteine auf Transkriptionsebene konnte unter Bortezomibbehandlung allerdings nicht festgestellt werden.

### **3.6.4 Niedrig dosiertes Bortezomib hat keinen Einfluss auf die Genexpression von Kollagen und Kollagen spaltenden Matrixmetalloproteinasen**

Kollagene waren nach 16-wöchiger fett- und cholesterolreicher Diät in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen auf mRNA-Ebene in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline teilweise reguliert. Die Behandlung mit niedrig dosiertem Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Expressionsrate der Kollagene auf Transkriptionsebene im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in den Expressionsraten für die Matrixmetalloproteinasen auf transkriptioneller Ebene.

Tabelle 3.2: Der RNA-Microarray zeigt die Regulation der Genexpression in den Aorten von männlichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 16-wöchiger fett- und cholesterolreicher Diät in Kontroll- (K) und Behandlungsgruppe (B) als x-fache Erhöhung oder Erniedrigung im Vergleich zur Baseline (BL). Die Expressionsrate ausgewählter atheroskleroserelevanter Gene auf mRNA-Niveau in der Kontrollgruppe, die zweimal wöchentlich intraperitoneal 0,9 %-ige Natriumchloridlösung appliziert bekam, unterschied sich in großer Mehrzahl nicht von den entsprechenden Expressionsraten auf Transkriptionsebene in der Behandlungsgruppe, die zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion von 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht erhielt. Die Behandlung mit Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Expression atherogener und atheroprotektiver Gene auf transkriptioneller Ebene. Eine Ausnahme hiervon war die Hochregulation der UCHL1 unter Bortezomibbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die RNA wurde aus Aorten von vier Tieren pro Gruppe gewonnen.

Stress und Stressantwort	<i>x-fache Expression vs. Baseline (BL)</i>	
	K vs. BL	B vs. BL
VCAM1 ( <i>vascular adhesion molecule 1</i> )	16,37	14,66
ICAM1 ( <i>intracellular adhesion molecule 1</i> )	2,56	2,26
Sele ( <i>selectin endothelial cell</i> )	54,27	36,44
ET-1 (Endothelin-1)	2,72	2,74
ET <sub>A</sub> -Rezeptor (Endothelin-Rezeptor Typ a)	2,05	1,38
MSR1 ( <i>macrophage scavenger receptor 1</i> )	39,51	30,60
MSR2 ( <i>macrophage scavenger receptor 2</i> )	7,09	7,99
Nox1 (NADPH-Oxidase 1)	0,91	0,91
Nox3 (NADPH-Oxidase 2)	1,01	1,00
Nox4 (NADPH-Oxidase 4)	0,91	0,85
ABCA1 ( <i>ATP-binding cassette subfamily A1</i> )	7,31	6,81
ABCG1 ( <i>ATP-binding cassette subfamily G1</i> )	12,96	12,41
TNFSF 4 ( <i>Tumor necrosis factor superfamily member 4</i> )	13,32	16,80
TNFSF 7 ( <i>Tumor necrosis factor superfamily member 7</i> )	2,19	0,94
TNFSF 8 ( <i>Tumor necrosis factor superfamily member 8</i> )	7,59	5,63
TNFSF 9 ( <i>Tumor necrosis factor superfamily member 9</i> )	3,43	3,16
TNFSF 11 ( <i>Tumor necrosis factor superfamily member 11</i> )	2,09	1,59
TNFSF 13 ( <i>Tumor necrosis factor superfamily member 13</i> )	3,93	3,29
TNFSF 14 ( <i>Tumor necrosis factor superfamily member 14</i> )	2,28	1,78
TNFSF 15 ( <i>Tumor necrosis factor superfamily member 15</i> )	4,79	5,83
TNFRSF 1b ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1b</i> )	5,13	4,57
TNFRSF 4 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4</i> )	0,45	0,40
TNFRSF 7 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 7</i> )	0,06	0,04
TNFRSF 9 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9b</i> )	2,97	3,04
TNFRSF 11b ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b</i> )	13,83	12,29
TNFRSF 13b ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13b</i> )	0,48	0,39
TNFRSF 13c ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13c</i> )	0,07	0,01
TNFRSF 17 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 17</i> )	0,43	0,14
TNFRSF 18 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18</i> )	0,16	0,16
TNFRSF 19 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19</i> )	0,59	0,57
TNFRSF 21 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21</i> )	1,76	2,15
TNFRSF 22 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 22</i> )	2,41	2,48
TNFRSF 23 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 23</i> )	7,64	7,08
TNFRSF 25 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 25</i> )	0,50	0,43
TNFRSF 26 ( <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 26</i> )	12,52	13,13



TNFAIP 2 ( <i>Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2</i> )	13,66	14,75
TNFAIP 6 ( <i>Tumor necrosis factor alpha-induced protein 6</i> )	3,63	1,93
TGF- $\beta$ 1 ( <i>transforming growth factor beta 1</i> )	3,32	3,45
TGF- $\beta$ i ( <i>transforming growth factor beta-induced</i> )	2,35	3,07
SR-A3 (Scavenger-Rezeptor A3)	4,18	3,52
SR-B2 (Scavenger-Rezeptor B2)	2,45	2,35
SMAD1 ( <i>MAD homolog 1, drosophila</i> )	0,97	0,88
SMAD2 ( <i>MAD homolog 2, drosophila</i> )	1,14	1,14
SMAD3 ( <i>MAD homolog 3, drosophila</i> )	1,41	1,35
SMAD4 ( <i>MAD homolog 4, drosophila</i> )	1,00	0,96
SMAD5 ( <i>MAD homolog 5, drosophila</i> )	1,15	1,07
SMAD6 ( <i>MAD homolog 6, drosophila</i> )	0,92	1,06
SMAD8 ( <i>MAD homolog 8, drosophila</i> )	0,33	0,51
SMAD9 ( <i>MAD homolog 9, drosophila</i> )	0,59	1,51

### extrazelluläre Moleküle

TGF- $\beta$ i ( <i>transforming growth factor beta-induced</i> )	2,35	3,07
TGF- $\beta$ R1 ( <i>transforming growth factor beta receptor 1</i> )	2,49	2,25
COL1A1 ( <i>Procollagen type 1 alpha 1</i> )	3,11	3,75
COL2A1 ( <i>Procollagen type 2 alpha 1</i> )	3,84	3,87
COL3A1 ( <i>Procollagen type 3 alpha 1</i> )	2,91	2,92
COL4A3 ( <i>Procollagen type 4 alpha 3</i> )	0,33	0,24
COL4A3bp ( <i>Procollagen type 4 alpha 3 binding protein</i> )	2,34	2,34
COL4A6 ( <i>Procollagen type 4 alpha 6</i> )	0,57	0,57
COL5A1 ( <i>Procollagen type 5 alpha 1</i> )	1,96	1,84
COL5A2 ( <i>Procollagen type 5 alpha 2</i> )	4,42	4,91
COL7A1 ( <i>Procollagen type 7 alpha 1</i> )	0,40	0,50
COL8A1 ( <i>Procollagen type 8 alpha 1</i> )	10,70	11,97
COL8A2 ( <i>Procollagen type 8 alpha 2</i> )	0,50	0,40
COL9A3 ( <i>Procollagen type 9 alpha 3</i> )	0,24	0,44
COL10A1 ( <i>Procollagen type 10 alpha 1</i> )	2,10	3,67
COL11A1 ( <i>Procollagen type 11 alpha 1</i> )	0,32	0,65
COL11A2 ( <i>Procollagen type 11 alpha 2</i> )	0,91	1,12
COL12A1 ( <i>Procollagen type 12 alpha 1</i> )	6,12	5,98
COL17A1 ( <i>Procollagen type 17 alpha 1</i> )	0,05	0,05
COL19A1 ( <i>Procollagen type 19 alpha 1</i> )	0,34	0,10
COL24A1 ( <i>Procollagen type 24 alpha 1</i> )	4,04	5,26
MMP2 (Matrixmetalloproteinase 2)	4,56	5,35
MMP3 (Matrixmetalloproteinase 3)	38,20	45,20
MMP8 (Matrixmetalloproteinase 8)	100,00	106,97
MMP10 (Matrixmetalloproteinase 10)	9,20	9,22
MMP12 (Matrixmetalloproteinase 12)	100,00	99,06
MMP13 (Matrixmetalloproteinase 13)	100,00	107,42
MMP14 (Matrixmetalloproteinase 14)	9,16	9,03
MMP15 (Matrixmetalloproteinase 15)	0,11	0,88
MMP19 (Matrixmetalloproteinase 19)	11,85	9,31

### Ubiquitin-Proteasom-System

UCHL1 ( <i>ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1</i> )	0,30	11,70
--	------	-------

---

**Apoptose**

---

SMAD1 ( <i>MAD homolog 1, drosophila</i> )	0,97	0,88
SMAD2 ( <i>MAD homolog 2, drosophila</i> )	1,14	1,14
SMAD3 ( <i>MAD homolog 3, drosophila</i> )	1,41	1,35
SMAD4 ( <i>MAD homolog 4, drosophila</i> )	1,00	0,96
SMAD5 ( <i>MAD homolog 5, drosophila</i> )	1,15	1,07
SMAD6 ( <i>MAD homolog 6, drosophila</i> )	0,92	1,06
SMAD8 ( <i>MAD homolog 8, drosophila</i> )	0,33	0,51
SMAD9 ( <i>MAD homolog 9, drosophila</i> )	0,59	1,51

---

**Lipidstoffwechsel**

---

ABCA1 ( <i>ATP-binding cassette transporter A1</i> )	7,31	6,81
ABCG1 ( <i>ATP-binding cassette transporter G1</i> )	12,96	12,41

---

< 1-fach
1- bis 2-fach
2- bis 4-fach
> 4-fach

## 4.0 DISKUSSION

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib die Ausprägung früher atherosklerotischer Plaques in der Aorta in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen verringert und darüberhinaus ein antioxidatives und antiinflammatorisches Genexpressionsmuster im Aortengewebe induziert<sup>37</sup>. Herrmann et al.<sup>103</sup> und Di Filippo et al.<sup>104</sup> postulierten eine duale Rolle des UPS in der Atherogenese in Abhängigkeit vom Stadium der Atherosklerose. In Anknüpfung an die gewonnenen Erkenntnisse in einem frühen Atherosklerosestadium wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von niedrig dosierter Proteasominhibition mit Bortezomib auf die Plaquelast bei der Entwicklung eines fortgeschrittenen Stadiums der Atherosklerose in Aorten von LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht.

Die Mäuse zeigten *in situ* makroskopisch sichtbare Plaques, vor allem an bekannten Prädilektionsstellen, aber auch an anderen Stellen entlang des Gefäßverlaufs bis zur Aufzweigung in die *Arteriae iliacae communes dextra et sinistra*. Männliche LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten im Vergleich zu den weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen einen deutlich größeren Plaquelächenanteil im Gefäß. Der Aortenbogen war am stärksten von Atherosklerose betroffen. Die männliche Kontrollgruppe, der Natriumchloridlösung appliziert wurde, zeigte in diesem Gefäßabschnitt tendenziell eine prozentual geringere Plaqueläche als die männliche mit Bortezomib behandelte Gruppe.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib bei der Induktion eines fortgeschrittenen Stadiums der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Einfluss auf die Plaquelast hat. Im Abschnitt des Aortenbogens führte die Applikation von Bortezomib in der männlichen Tiergruppe, anders als erwartet, sogar eher zu einer Zunahme der Plaquelast. Die bereits erwähnte atheroprotektive Wirkung des Proteasominhibitors Bortezomib in einem frühen Atherosklerosestadium legt nahe, dass die Hemmung des Proteasoms zu einem undefinierten Zeitpunkt im Verlauf der Atherogenese das Fortschreiten der atherosklerotischen Läsionen begünstigen muss, wenn die Ergebnisse in einem späteren Stadium der Erkrankung keinen Unterschied in der Ausprägung der Plaquelächen beim Vergleich zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe zeigen. Die Wirkungsumkehr der Proteasominhibition vom atheroprotektiven Effekt in einem frühen Stadium der Atherosklerose hin zu einer proatherogenen Wirkung in einem späteren Stadium der Atherosklerose unterstützt die bisherigen widersprüchlichen Ergebnisse anderer Forschergruppen<sup>72, 91, 92</sup>. Vorteilhaft wirksam wurden Proteasominhibitoren in hypertensiven

Ratten<sup>71, 105</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen<sup>37</sup>. Keine dieser *in vivo* Studien erreichte die Dauer des aktuellen Versuchs und zeigte fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen. Der Vergleich innerhalb der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus liefert den Hinweis, dass sich die antioxidative und antiinflammatorische Wirkung von Bortezomib in einem frühen Stadium der Atherosklerose zu einem späteren Zeitpunkt verliert.

#### **4.1 Antiinflammatorische und antioxidative Effekte der Proteasominhibition**

*In vitro* Experimente mit humanen Gefäßendothelzellen und Endothelzellen der Pulmonalarterie vom Rind zeigten, dass die Hemmung des UPS die Expression und Aktivität der eNOS hochregulierte und die endothelabhängige Vasorelaxation in Aortenringen von Ratten verbesserte. Stangl et al. führten Experimente mit verschiedenen endothelialen Zelltypen durch und konnten zeigen, dass die Wirkung von Proteasominhibitoren sich trotz unterschiedlicher Gefäßsysteme und Spezies gleich<sup>56</sup>. Interessanterweise konnte eine Einzeldosis des Proteasominhibitors MG132 die Expression von eNOS bis zu zehn Tage lang hochregulieren<sup>56</sup>. Die gleichzeitige Hemmung der *chymotrypsin-like* Aktivität legte nahe, dass es sich bei der langfristigen Hochregulierung der eNOS-Expression um eine proteasomabhängige Wirkung handelte<sup>56</sup>. Die systematische Analyse der Wirkung von niedrig dosierter nicht toxischer und hoch dosierter toxischer Proteasominhibition in humanen Gefäßendothelzellen zeigte dosisspezifische Transkriptionsmuster, insbesondere die Hochregulierung von Genen, die für antioxidativ wirksame Enzyme kodieren, z. B. SOD1, HO1 und Glutathionperoxidase 3 (GPx3), und die verminderte Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheit Nox4, die in aktivierter Form eine Hauptquelle von ROS in endothelialen Zellen darstellt. Die Behandlung mit toxischen Dosen der Proteasominhibitoren MG132 und MG262 führte in den Endothelzellen zu einer deutlich stärkeren Regulation von Genen, die in Zusammenhang mit Apoptose stehen, und veränderte die Expressionsraten verschiedener Translationsinitiations- und Elongationsfaktoren<sup>75</sup>. Die niedrig dosierte Proteasominhibition dagegen beeinträchtigte keine Gene, die an der Proteinsynthese beteiligt sind, und leitete auch nicht die Apoptose der Endothelzellen ein. Darüberhinaus beobachteten Meiners et al. unter niedrig dosierter Proteasominhibition eine vierfach höhere Expression von eNOS auf RNA- und Proteinebene<sup>75</sup>. Im Gegensatz dazu war die Expression von MCP-1 deutlich herunterreguliert, ebenso wie die Expression des

Vasokonstriktors ET-1 und der HMG-CoA-Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese. Zusätzlich konnte eine Reduktion des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf Proteinebene festgestellt werden. Dieses Expressionsmuster weist auf einen vorteilhaften Effekt von niedrig dosierter Proteasominhibition auf die Endothelfunktion hin. Im Anschluss konnte in Aortenringen von Ratten eine verbesserte Endothelfunktion mit einem niedrig dosierten Proteasominhibitor im Vergleich zu Natriumchloridlösung nachgewiesen werden, so dass anzunehmen ist, dass die Veränderungen auf Transkriptionsebene Veränderungen der Zellfunktion zur Folge haben<sup>75</sup>. In Aortenringen von Ratten konnten Lorenz et al. nach Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 eine herabgesetzte Superoxid-Produktion beobachten<sup>106</sup>. Die NO-Bioverfügbarkeit könnte durch eine verminderte Aufnahme von NO durch Superoxidanionen gesteigert werden<sup>106</sup>. Die verminderte endothelabhängige Vasodilatation in Aortenringen von Ratten nach Inkubation mit TNF $\alpha$  steht vermutlich darüberhinaus in Verbindung mit der erhöhten Expression von ET-1, was durch die Behandlung mit einem Proteasominhibitor verhindert werden konnte<sup>106</sup>. *In vivo* Experimente in hypercholesterolämischen Schweinen zeigten eine verbesserte renale Endothelfunktion unter Proteasominhibition. Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor MLN273 führte in den Schweinen zu einer erhöhten Expression von eNOS, was eine erhöhte NO-Produktion vermuten lässt, und zu einer erhöhten Expression und Aktivität von SOD, was die Bindung von ROS im Gefäß begünstigen könnte. Außerdem beobachteten Chade et al. mit MLN273 eine verminderte mRNA Expression von prepro-ET-1 und ET<sub>A</sub><sup>97</sup>. Diese Ergebnisse stimmen mit der Auffassung von Meiners et al. überein, dass die verbesserte Endothelfunktion, die durch Proteasominhibitoren vermittelt wird, auf der Verschiebung der Balance zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren zu Gunsten der Vasodilatation beruht<sup>107</sup>. Die Hemmung des Proteasoms verhindert in humanen Endothelzellen zum Teil die zytokininduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen und reduziert in hypertensiven Ratten die Expression von VCAM1<sup>71</sup>. Ludwig et al. beobachteten, dass diese antiinflammatorische Wirkung auf antioxidativen Effekten beruhte und nicht auf der Hemmung der Translokation von NF $\kappa$ B<sup>71</sup>. Die niedrig dosierte Proteasominhibition habe vorteilhafte Wirkungen auf pathologische Ereignisse wie die Atherosklerose, die mit einer Adhäsion von Leukozyten einhergeht, postulierten Ludwig et al.<sup>71</sup>. Die Aktivierung antioxidativ wirksamer Gene nach Behandlung mit einem niedrig dosierten Proteasominhibitor konnte nicht nur in Endothelzellen beobachtet werden, sondern auch in verschiedenen anderen Gefäßzellen. Dreger et al. konnten die Nrf2-abhängige Aktivierung von AREs als ursächliche Verbindung zwischen Proteasominhibition und dem Schutz der Zelle vor oxidativem Stress identifizieren<sup>108</sup>. Diese

Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Levonen et al. überein, dass die vermehrte Expression von Nrf2 die Expression antioxidativer Enzyme in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten aktiviert und den oxidativen Stress in Rattenaortas *in vivo* reduziert<sup>109</sup>. Chen et al. konnten zeigen, dass die Induktion antioxidativer Enzyme (z. B. HO1 und Ferritin) und die reduzierte Expression inflammatorischer Moleküle (z. B. MCP-1 und VCAM1) vom Transkriptionsfaktor Nrf2 abhängig ist<sup>110, 111</sup>.

Die Pathogenese der Atherosklerose beinhaltet u. a. die endotheliale Dysfunktion, vermehrten oxidativen Stress und Inflammation. Die antiinflammatorische Wirkung von Proteasominhibitoren und ihre Fähigkeit die Endothelfunktion zu verbessern, geben Hinweise auf das antiatherogene Potential der Proteasominhibition. Im Verlauf der Initiationsphase der Atherosklerose migrieren Makrophagen in den Subendothelialraum und werden zu Schaumzellen, die sogenannte „fatty streaks“ ausbilden. Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 verursachte in der Aorta von urämischen Kaninchen eine signifikante Reduktion der Intimadicke und der Anzahl von Schaumzellen<sup>92</sup>. Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass die Proteasominhibition im weiteren Verlauf der Atherogenese in der Lage sein könnte, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu verringern und die Umwandlung der Zellen vom kontraktilen hin zu einem metabolischen Phänotyp zu hemmen<sup>85</sup>. *In vitro* Experimente mit glatten Gefäßmuskelzellen zeigten, dass die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Lactacystin den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus hemmte, die Zellanzahl verminderte und die Migration glatter Gefäßmuskelzellen reduzierte. *In vivo* führte die lokale Applikation von Lactacystin nach Ballondilatation in Sprague-Dawley-Ratten zu einer deutlichen Reduktion der Neointima<sup>112</sup>. Die Proteasomaktivität hat Einfluss auf die Transformation, Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen in der Progressionsphase der Atherosklerose. Die Proteasominhibition könnte in diesem Stadium besonders effektiv sein.

Basierend auf den geschilderten Ergebnissen untersuchten Wilck et al. die Anwendung von niedrig dosiertem Bortezomib in einem frühen Stadium der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Bortezomib zeigte antioxidative und antiinflammatorische Effekte und hemmte die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen der Initiationsphase in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Rückschlüsse auf die Wirkung von Proteasominhibition in einem späteren Stadium der Atherosklerose konnten nicht gezogen werden<sup>37</sup>.

## **4.2 Antiinflammatorische und antioxidative Effekte von Bortezomib sind in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium nicht mehr nachweisbar**

Die Behandlung mit niedrig dosiertem Bortezomib führte in Endothelzellen zu einer vermehrten Expression von Genen, die vor oxidativem Stress schützen, und zu einer verminderten Expression von Genen, die eine intakte Gefäßfunktion gefährden<sup>71, 75, 106</sup>. Der Proteasominhibitor Bortezomib konnte die veränderte Expression von maßgeblich an der Atherogenese beteiligten Genen in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit atherosklerotischen Läsionen der Initiationsphase unterdrücken. Diese Gene kodierten u. a. für Nox4, VCAM1 und ICAM1, MMP15, verschiedene Kollagene und UCHL1(Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1)<sup>37</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte eine veränderte Expression der genannten Gene auf Transkriptionsebene zwischen Bortezomib behandelten Tieren und der Kontrollgruppe in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen nicht festgestellt werden, was sich auch im Ergebnis der Plaqueflächen widerspiegelt. Lediglich die UCHL1 war in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich hochreguliert.

Nox4 bezeichnet eine Untereinheit der NADPH-Oxidase. Die erhöhte Abgabe von Hyperoxid durch die NADPH-Oxidase ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose. Der molekulare Mechanismus, der unter niedrig dosierter Proteasominhibition in einem frühen Stadium der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer verminderten Expression von Nox4 und konsekutiver Reduktion der Hyperoxidproduktion und des Serumgehalts von Lipidperoxidationsprodukten führte, ist nicht bekannt<sup>37</sup>. Ob die ausbleibende Regulierung von Nox4 auf transkriptioneller Ebene in einem fortgeschrittenen Stadium in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen auch auf Proteinebene oder indirekt durch die Bestimmung der Hyperoxidkonzentration im Gefäß nachweisbar wäre, bleibt offen. Der nicht signifikante Unterschied in der Ausprägung der Plaqueflächen zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe weist aber darauf hin.

Die Administration eines Proteasominhibitors führte in Aorten von hypertensiven Ratten zu einer herunterregulierten Expression von Adhäsionsmolekülen und ET-1<sup>71, 113</sup>. An der Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen ist das Adhäsionsmolekül VCAM1 durch die Rekrutierung von Leukozyten in großem Maße beteiligt. ET-1 ist nicht nur starker Vasokonstriktor, sondern induziert auch die Synthese von Signal- und Adhäsionsmolekülen wie TGF-β1, ICAM1, VCAM1, IL-6, oder MCP-1. Es fördert so ebenfalls die Adhäsion und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand und die Produktion von Kollagen durch glatte Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Läsionen. Wachstumsfördernde Prozesse atherosklerotischer Läsionen

können durch ET-1 beschleunigt werden, und es vermittelt Umbauprozesse der Gefäßwand in Bezug auf Bindegewebszusammensetzung und Sklerosierung. Bortezomib erniedrigte die VCAM1-Expression in frühen atherosklerotischen Läsionen von LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen. *In vivo* Experimente in hypercholesterolämischen Schweinen mit frühen atherosklerotischen Läsionen zeigten eine verminderte Expression von prepro-ET-1 und ET<sub>A</sub> bei Behandlung mit dem Proteasominhibitor MLN273 im Vergleich zu unbehandelten Tieren<sup>97</sup>.

In einem späten Atherosklerosestadium lässt sich in den LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen auf Transkriptionsebene eine Steigerung der Expression von VCAM1, ICAM1, ET-1 und ET<sub>A</sub> in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline nachweisen, die auch unter Behandlung mit Bortezomib unverändert hoch bleibt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Größe der Plaquesfläche, die zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium keinen signifikanten Unterschied mehr zeigte, in Zusammenhang steht mit einem ausbleibenden antiinflammatorischen Effekt des Proteasominhibitors Bortezomib, nämlich der ausbleibenden herabregulierten Expression von VCAM1, ICAM1, ET-1 und ET<sub>A</sub>.

Meiners et al. beobachteten in Endothelzellen unter Behandlung mit Bortezomib eine hochregulierte Expression der NO-produzierenden eNOS und der antioxidativen Enzyme SOD1 und HO1 auf transkriptionellem Niveau. Im Gegensatz dazu war Nox4 deutlich herunterreguliert. Dieses Expressionsprofil könnte die NO-Bioverfügbarkeit in den Endothelzellen steigern und vor endothelialer Dysfunktion schützen. Die Überexpression atheroprotektiver Gene und die damit verbundene Reduzierung von ROS verminderte die TNF $\alpha$ -induzierte VCAM1-Expression *in vitro*<sup>114</sup> und *in vivo*<sup>115</sup>. TNF $\alpha$ -Signalwege können unter Proteasominhibition in einem späten Atherosklerosestadium nicht mehr über die vermehrte Expression von antioxidativ wirksamen Genen kompensiert werden. Als Zeichen von oxidativem Stress kommt es im Organismus zur vermehrten Sekretion von TNF $\alpha$ . Die ROS-Produktion nimmt unter TNF $\alpha$  zu, die NO-Bioverfügbarkeit sinkt, was die endotheliale Dysfunktion fördert<sup>116</sup>. Der Einfluss von TNF $\alpha$  über verschiedene Signalwege und in verschiedenen Zielzellen auf die Initiation und auf das Fortschreiten der Atherosklerose macht ihn zu einem zentralen Baustein der Atherogenese. TNF $\alpha$  ist in der Lage Leukozyten zu aktivieren, deren Reifung voranzutreiben und weitere Leukozyten durch TNF $\alpha$ -induzierte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen zum entsprechenden Gefäßabschnitt zu rekrutieren. Über die chemotaktische Anziehung von Neutrophilen kann TNF $\alpha$  das Endothel darüberhinaus schädigen<sup>117</sup>. Viele andere Gewebearten, nicht nur das Gefäßendothel, werden durch TNF moduliert, u. a. auch Adipozyten. Ein TNF-modifiziertes Fettprofil kann die Atherogenese über eine Erhöhung von Peroxidationslipiden und eine Erniedrigung von HDL begünstigen<sup>118</sup>. Die Regulierung von



SOD1, HO1 oder eNOS durch Bortezomib ist in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen auf Transkriptionsebene nicht nachweisbar. Die direkte Hemmung von TNF $\alpha$  auf transkriptioneller Ebene war durch den Proteasominhibitor Bortezomib in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen weder in einem fortgeschrittenen noch in einem frühen Atherosklerosestadium möglich. Die ausbleibende Reduktion der Plaqueflächen unter Bortezomibbehandlung in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium beruht demnach eher auf der ausbleibenden transkriptionellen Hochregulierung antioxidativer Gene als auf der Regulierung von TNF $\alpha$ .

Die Aktivierung der Gene, die für SOD1 und HO1 kodieren, ist abhängig vom Transkriptionsfaktor Nrf2<sup>108</sup>. Die beiden antioxidativen Enzyme SOD1 und HO1 sind in der Lage, gefäßschädigende ROS zu eliminieren<sup>108</sup>. Ein Absinken von ROS in der Zelle schränkt die Bildung von Peroxynitrit durch ROS und NO ein, was die NO-Bioverfügbarkeit ansteigen lässt und einer Endotheldysfunktion entgegenwirkt. Der antioxidative Nrf2-Signalweg ist der Hauptabwehrmechanismus der Zelle gegen zytotoxische Effekte von oxidativem Stress<sup>119</sup>. Nrf2 liegt im Zytoplasma gebunden an sein Inhibitorprotein Keap-1, das für dessen Ubiquitinierung und Degradation *via* Proteasom verantwortlich ist, vor<sup>120</sup>. Wird die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt, führt dies zur Dissoziation des Inhibitorproteins und damit erfolgt die Stabilisierung von Nrf2, der dann im Nucleus *via* AREs die Aktivierung antioxidativ wirksamer Gene bewirken kann<sup>121</sup>. Die Ubiquitinierung und Degradation von Nrf2 konnte *in vitro* durch Proteasominhibition vermindert werden<sup>122</sup>. In Patienten mit Mantelzelllymphom konnte unter Behandlung mit Bortezomib eine hochregulierte Expression von Proteinen der Nrf2-vermittelten antioxidativen Signalwege beobachtet werden<sup>123</sup>. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden Wilck et al. in einem frühen Atherosklerosestadium eine signifikante Erniedrigung von Peroxidationslipiden in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, die mit Bortezomib behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, was sich in den reduzierten Plaqueflächen der Behandlungsgruppe widerspiegelte<sup>37</sup>. In einem weiterfortgeschrittenen Atherosklerosestadium hat Bortezomib in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Einfluss auf die Ausprägung der Plaquefläche und die beschriebene Hochregulierung antioxidativer Gene bleibt ebenfalls aus. Vermutlich trägt eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit im Gefäß dazu bei, dass die vermehrte Nrf2-vermittelte Expression von SOD1 und HO1 in einem späten Atherosklerosestadium ausbleibt, denn NO kann diesen Nrf2-Signalweg aktivieren<sup>124, 125</sup>. Die Stabilisierung von Nrf2 über die Hemmung des Proteasoms scheint zu diesem Zeitpunkt nicht mehr auszureichen, um eine vermehrte Expression antioxidativer Enzyme im Vergleich zur Kontrollgruppe zu vermitteln. Dies könnte mit dazu beitragen, dass sich die Plaqueflächen in Kontroll- und Behandlungsgruppe in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium in ihrer Größe nicht mehr voneinander unterscheiden.

Der Einfluss des UPS auf die Atherogenese ist unumstritten, insbesondere aufgrund seiner Rolle bei der zellulären Antwort auf oxidativen Stress, aber in großem Maße auch wegen seiner Beteiligung an inflammatorischen Prozessen. Im Mittelpunkt seines inflammatorischen Einflusses steht die UPS-abhängige Regulierung des Transkriptionsfaktors NFκB. DNA-Sequenzen, die in Abhängigkeit von NFκB exprimiert werden, kodieren für das Vorläufermolekül von ET-1, für die Adhäsionsmoleküle VCAM1 und E-Selektin und für das Chemokin MCP-1. Die Hemmung des Proteasoms verringert über eine Reduktion der NFκB-Aktivität die Expression von Adhäsionsmolekülen und die ET-1-Konzentration im Gefäß<sup>113</sup>. Die Untersuchung des Einflusses von Bortezomib auf ein fortgeschrittenes Stadium der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der Plaqueflächen zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe. Folglich kann vermutet werden, dass die Atheroprotektion über eine Hemmung der NFκB-Aktivierung durch Proteasominhibition in einem späteren Stadium der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht mehr gegeben ist. In Übereinstimmung damit konnte in diesem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose auf transkriptioneller Ebene auch keine antiatherogene Regulierung der NFκB-abhängigen Gene, die für VCAM1, ICAM1, ET-1 und E-Selektin kodieren, festgestellt werden. Auch oxidierte LDL-Partikel können NFκB in seine aktive Form überführen<sup>126</sup>. Die vermutete ausbleibende Nrf2-vermittelte Überexpression antioxidativer Gene in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen könnte die Superoxidproduktion und damit die Modifikation von LDL begünstigen. Der Anstieg von oxLDL und die fehlende Hemmung der NFκB-Aktivierung in einem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen könnten mögliche Ursachen dafür sein, warum es nicht zu einer Reduktion der Plaquefläche kam.

Der Proteasominhibitor Bortezomib erhöhte in Black 6 (BL/6)-Mäusen die Expressionsrate der Transportmoleküle ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*) und ABCG1 (*ATP-binding cassette transporter G1*) und erhöhte infolgedessen den gesamten reversen Cholesteroltransport (RCT) *in vivo*<sup>81</sup>. Beim RCT handelt es sich um den Rücktransport von pathologisch akkumulierendem Cholesterol mithilfe von HDL aus den Makrophagen atherosklerotischer Läsionen in die Leber, wo es anschließend in Gallensäure umgewandelt werden kann<sup>127, 128</sup>. Das Transportmolekül ABCA1 bildet freie HDL-Partikel aus lipidarmem Apolipoprotein A-I (Apo A-I)<sup>129</sup>, das den Cholesterolefflux *via* ABCG1 fördert, so entstehen reife HDL-Partikel<sup>130</sup>. Die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen bei Deletion von ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen war im Vergleich zu Versuchen, in denen nur einer der Transporter nicht vorhanden war, genauso schnell zu beobachten<sup>131</sup>. Beide Transporter ergänzen sich in ihrer

antiatherogenen Wirkung und werden über das UPS ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Parallel zu der vermehrten Expression von ABCA1 in BL/6-Mäusen unter Bortezomibbehandlung konnte kein Anstieg von HDL beobachtet werden<sup>81</sup>. Auch in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit frühen atherosklerotischen Läsionen führte die Behandlung mit Bortezomib nicht zu einer Erhöhung von HDL. Wilck et al. konnten nicht ausschließen, aber auch nicht beweisen, dass die von ihnen beobachtete Reduktion der atherosklerotischen Plaquesfläche in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen auch auf einen gesteigerten reversen Cholesteroltransport zurückzuführen war. In LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques konnte die Behandlung mit Bortezomib die Expression der Transportergene, die für ABCA1 und ABCG1 kodieren, nicht steigern. Dies weist darauf hin, dass eine weitere Ursache für den ausbleibenden Effekt der Bortezomibbehandlung auf die Größe der Plaquesfläche in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium in der fehlenden vorteilhaften Beeinflussung des RCTs zu finden sein könnte.

Die Progressionsphase ist gekennzeichnet von der Proliferation, Migration und Transformation glatter Gefäßmuskelzellen. Die Proliferation und konsekutive Migration sowie die Transformation von einem weniger proliferativen kontraktilen zu einem stark proliferativen synthetischen Phänotyp der Gefäßmuskelzellen konnten durch Proteasominhibition *in vitro* und *in vivo* gehemmt werden<sup>85, 86</sup>. TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) ist ein antiinflammatorisch wirksames Zytokin, das die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen herunterreguliert und der Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand entgegenwirkt<sup>132</sup>. Die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen werden durch TGF- $\beta$  gehemmt und die Expression von Proteinen des kontraktilen Apparats der Muskelzellen gefördert<sup>133, 134, 135</sup>. In gesunden Gefäßwänden ist TGF- $\beta$  in hoher Konzentration nachweisbar<sup>136</sup>. In LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen unter fett- und cholesterolreicher Diät war die Expression von TGF- $\beta$  nach 16 Wochen Versuchsdauer in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline auf Transkriptionsebene deutlich angestiegen. Die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib hatte in der Behandlungsgruppe aber keinen weiteren Anstieg von TGF- $\beta$  auf Expressionsebene zur Folge, was im Einklang steht mit dem Ergebnis gleichgroßer Plaquesflächen in Kontroll- und Behandlungsgruppe.

### 4.3 Der Einfluss von Bortezomib auf die Plaquestabilität

In der gesunden Gefäßwand überwiegt die Expression von TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II, während die Expression dieses Rezeptors in atherosklerotischen Läsionen deutlich abnimmt und überwiegend der TGF- $\beta$  Rezeptor Typ I exprimiert wird. TGF- $\beta$  hemmt nicht nur über TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II die Ausbildung sogenannter „*fatty streaks*“, sondern schützt in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium auch vor der Entstehung einer instabilen Plaque, indem es über TGF- $\beta$  Rezeptor Typ I die Expression extrazellulärer Matrix in glatten Gefäßmuskelzellen der fibrösen Kappe fördert<sup>137, 138, 139</sup>. Die Expression verschiedener Kollagene, die Teil der extrazellulären Matrix sind, war auf transkriptioneller Ebene in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 16-wöchiger fett- und cholesterolreicher Diät in der Kontrollgruppe, die zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion mit Natriumchloridlösung appliziert bekam, im Vergleich zur Baseline erhöht. Bei der Baseline handelte es sich um LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, die im Alter von zehn Wochen geopfert wurden und zeitlebens eine Normaldiät erhielten. Die zweimal wöchentliche intraperitoneale Injektion des Proteasominhibitors Bortezomib in der Behandlungsgruppe hatte keinen Einfluss auf die Expression der Kollagene auf mRNA-Ebene in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium, was in Zusammenhang stehen könnte mit der gleich hohen Expression von TGF- $\beta$  auf Transkriptionsebene in der Behandlungs- und Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline. Die Plaquestabilität ist auch abhängig von der Sekretion sogenannter Matrixmetalloproteinasen durch Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen<sup>140</sup>. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von 23 bekannten strukturell verwandten zinkabhängigen Endopeptidasen<sup>141</sup>, die Kollagen und Proteine der extrazellulären Matrix spalten können. Histologische Untersuchungen hoben die Lokalisation von Matrixmetalloproteinasen v. a. in der vulnerablen Schulterregion einer Plaque hervor<sup>142</sup>. Arterielle Plaques mit den histologischen Merkmalen der Plaquevulnerabilität bis hin zur Plaqueruptur zeigten ein erhöhtes Level von Matrixmetalloproteinasen und liefern einen weiteren Hinweis für deren pathologische Rolle<sup>143</sup>. Wilck et al. fanden in einem frühen Stadium der Atherosklerose in der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus eine vermehrte Expression von Matrixmetalloproteinasen in der Kontrollgruppe, die sechs Wochen lang eine fettreiche Diät und zweimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion mit Natriumchloridlösung erhielt, im Vergleich zur Baseline, die für den gleichen Zeitraum unter Normaldiät gehalten wurde. Interessanterweise konnte die zweimal wöchentliche intraperitoneale Injektion mit Bortezomib in der Behandlungsgruppe die gesteigerte Expression von Matrixmetalloproteinasen unter sechswöchiger fettreicher Diät in diesem frühen Atherosklerosestadium hemmen<sup>37</sup>. In

LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät konnte in der Kontrollgruppe ein Anstieg von Matrixmetalloproteinasen im Vergleich zur Baseline gezeigt werden, aber die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib in der Behandlungsgruppe hatte in einem späten Atherosklerosestadium keinen Einfluss auf die Expressionsrate von Matrixmetalloproteinasen auf Transkriptionsebene. Der Proteasominhibitor Bortezomib war in einem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht in der Lage, die Expression von TGF- $\beta$ , Kollagenen oder Matrixmetalloproteinasen auf Transkriptionsniveau vorteilhaft, d. h. plaquestabilisierend, zu beeinflussen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen gibt es Hinweise darauf, dass die Proteasominhibition in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium nachteiligen Einfluss auf die Plaquestabilität hat. Die Behandlung mit Bortezomib kann die Stabilität der fibrösen Kappe einer Plaque schwächen, indem sie die Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen induziert und darüber eine Abnahme der Synthese extrazellulärer Matrix bewirkt<sup>144</sup>. Gleichzeitig kann die Proteasominhibition den programmierten Zelltod von Makrophagen einleiten. Der Verlust dieser phagozytierenden Zellen bewirkt eine Vergrößerung des nekrotischen Kerns<sup>145</sup>. In frühen atherosklerotischen Läsionen kann der programmierte Zelltod von glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen das Fortschreiten der Läsion verlangsamen, während die Apoptose gleicher Zellen in späten atherosklerotischen Läsionen die Plaquestabilisierung fördert<sup>146</sup>. Van Herck et al. fanden in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen *in vitro* und *in vivo* in fortgeschrittenen Plaques der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus unter Behandlung mit Bortezomib einen Rückgang des Kollagengehalts und eine Vergrößerung des nekrotischen Kerns<sup>91</sup>. Im Gegensatz dazu hatte die niedrig dosierte Proteasominhibition mit Bortezomib in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen keinen Einfluss auf die Expression von Kollagen auf Transkriptionsebene. Die Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen wird auch von TNF vermittelt, dessen Expressionsrate unter Bortezomibbehandlung auf Transkriptionsniveau in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium ebenfalls unbeeinflusst blieb. Dies sind Hinweise darauf, dass in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit späten atherosklerotischen Läsionen der Proteasominhibitor Bortezomib keinen Einfluss auf die Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen hat, wenngleich der histologische Nachweis dafür fehlt. Eine endgültige Antwort auf die Frage, ob die Behandlung mit Bortezomib in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium einen letalen Ausgang der Erkrankung *via* Plaquestabilisierung und Ruptur fördert oder nicht, steht weiter aus. Dies bedarf weiterer Forschung, auch im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz von Bortezomib bei der Behandlung des multiplen Myeloms. Der Nutzen einer Bortezomibbehandlung muss hinsichtlich eines erhöhten kardiovaskulären Risikos weiter überprüft werden.

#### **4.4 Bortezomib fördert die Expression der Ubiquitin C-terminalen Hydrolase L1**

Im Vergleich zu anderen vom UPS beeinflussbaren Genen, die unter Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib in einem fortgeschrittenen Atherosklerosestadium nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät unreguliert blieben, war die Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (UCHL1) auf mRNA-Ebene in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Baseline (Tiere der Baseline wurden unter Normaldiät gehalten und im Alter von zehn Wochen geopfert) massiv erhöht, während sich die Expressionsrate von UCHL1 in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Baseline auf transkriptioneller Ebene ähnelte. Das Enzym UCHL1 ist in der Lage Substrate zu deubiquitinieren. In Endothelzellen verhindert UCHL1 über die Deubiquitinierung von I $\kappa$ B die Aktivierung von NF $\kappa$ B. Nach Ballondenudation konnte in den Karotiden von Ratten eine signifikant niedrigere NF $\kappa$ B-Aktivierung bei überexprimierter UCHL1 beobachtet werden<sup>147</sup>. Trotz des über 30-fachen Anstiegs von UCHL1 unter Proteasominhibition im Vergleich zur Kontrollgruppe, konnte das Fortschreiten der Atherosklerose in den mit Bortezomib behandelten LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen im vorliegenden Versuch nicht verhindert werden. Die Plaqueflächen der Kontroll- und Behandlungsgruppe unterschieden sich nach 16-wöchiger Versuchsdauer nicht in ihrer Größe. Wenngleich die Expressionsrate der UCHL1 in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit frühen atherosklerotischen Läsionen unter Bortezomib nicht so hoch anstieg wie in späten atherosklerotischen Läsionen, zeigte die Behandlungsgruppe in einem frühen Stadium signifikant kleinere Plaqueflächen als die Kontrollgruppe. In einem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose wurde die UCHL1 unter Behandlung mit Bortezomib zwar massiv überexprimiert, aber bewirkte trotzdem keine signifikante Reduktion der Plaqueflächen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Betrachtet man die UCHL1 als indirekten Makrophagenmarker, ergibt sich eine mögliche Interpretation dieser widersprüchlichen Ergebnisse. Die UCHL1 wird in T-Zellen exprimiert, die in atherosklerotischen Läsionen über die Antigenpräsentation durch Makrophagen aktiviert werden. Aktivierte Th1-Zellen setzen Zytokine frei, die weitere Makrophagen anlocken. Ein hohes Expressionslevel der UCHL1 bedeutet auch eine hohe Anzahl an T-Zellen und einen Anstieg an Makrophagen. Der starke Anstieg von UCHL1 auf transkriptioneller Ebene in einem späten Stadium der Atherosklerose könnte also in Zusammenhang stehen mit der hohen Anzahl an eingewanderten Makrophagen in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen. In diesem Zusammenhang bleibt allerdings das niedrige Expressionslevel der UCHL1 in der Kontrollgruppe ungeklärt. Eine Untersuchung der

Zusammensetzung der Plaques hinsichtlich der vorhandenen Zellarten und deren Anzahl sowie der extrazellulären Matrix könnte Aufschluss über die Hypothese geben, dass die UCHL1 weniger als entscheidend antiatherogen wirksamer Faktor zu verstehen ist, sondern vielmehr Aufschluss gibt über die Zellzusammensetzung einer Plaque. Unter erhöhtem oxidativen Stress kann die Aktivität der UCHL1 durch oxidative Modifikation des Enzyms eingeschränkt werden<sup>148</sup>. Die Überexpression von UCHL1 auf Transkriptionsebene in einem späten Atherosklerosestadium in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen ist nicht gleichzusetzen mit einer erhöhten Aktivität des Enzyms, denn diese könnte in einem fortgeschrittenen Stadium deutlich erniedrigt sein. Die Bortezomibbehandlung ist in diesem Stadium, wie bereits an anderer Stelle erläutert, nicht in der Lage die Expressionsrate antioxidativ wirksamer Gene zu fördern, während dies in einem frühen Atherosklerosestadium in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nachweisbar war. Die oxidative Modifikation und die damit einhergehende Inaktivierung von UCHL1 in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen könnten den ausbleibenden antiatherogenen Effekt der massiv überexprimierten UCHL1 unter Bortezomibbehandlung in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen erklären. Die oxidative Modifikation von UCHL1 hat auch eine Abnahme von freien Ubiquitinmolekülen zur Folge und hemmt die Degradation weiterer Proteine, so dass sich Proteinaggregate bilden können<sup>149</sup>. Tatsächlich geht der Verlust der UCHL1-Aktivität in Alzheimergehirnen einher mit verminderter Ubiquitinierung von Proteinen, Proteinakkumulation, erniedrigter Proteasomaktivität und erhöhter Konzentration oxidierter UCHL1<sup>150, 151</sup>.

#### **4.5 Der Einfluss von Bortezomib auf ein spätes Atherosklerosestadium**

Die unterschiedlichen und zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse der bisherigen *in vitro* und *in vivo* Studien, auch in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, können nicht endgültig beantworten, ob die Behandlung mit einem Proteasominhibitor pro- oder antiatherogen wirksam ist. Bei der Induktion eines fortgeschrittenen Stadiums der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen hatte Bortezomib keinen Einfluss auf die Plaquelast, während es bei der Induktion eines frühen Stadiums die Größe der atherosklerotischen Läsionen reduzierte. Ob Bortezomib die Atherogenese hemmt oder nicht, scheint in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen vom Stadium der atherosklerotischen Läsionen abhängig zu sein. Die Applikation von Bortezomib könnte in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Applikation pro- oder antiatherogen wirksam sein, je nachdem ob das UPS insuffizient oder aktiv ist. Auch in humanen Plaques aus Thrombendarteriektomiepräparaten der *Arteria carotis* zeigten sich Hinweise auf

eine erniedrigte Proteasomaktivität in fortgeschritteneren atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu einem früheren Atherosklerosestadium. So beobachteten Versari et al. eine erniedrigte Proteasomaktivität, die einherging mit einem signifikanten Anstieg der Ubiquitinkonjugate, mit erhöhtem oxidativen Stress und Apoptose, in symptomatischen Patienten im Vergleich zu asymptomatischen Patienten. Die anhaltende Überlastung der proteasomalen Kapazität unter erhöhtem oxidativen Stress führte laut Versari et al. zur Akkumulation und Aggregation funktionsunfähiger Proteine und leitete letztlich den Zelltod ein<sup>152</sup>. Für das Modell der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus könnte das bedeuten, dass die erhaltene oder gesteigerte proteasomale Aktivität in einem frühen Atherosklerosestadium die inflammatorische Antwort *via* NFκB vorantreibt, während in einem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose die eingeschränkte Proteasomaktivität zur Akkumulation und Aggregation funktionsunfähiger Proteine führt. Der Nachweis unterschiedlicher Effekte von Bortezomib auf die Entstehung früher und fortgeschrittener Atherosklerosestadien in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen unterstützt die Hypothese, das UPS sei in unterschiedlichem Ausmaß in den verschiedenen Atherosklerosestadien aktiv. In der vorliegenden Arbeit wurde mit 50µg Bortezomib pro kg Körpergewicht eine niedrige Proteasominhibitorosis gewählt, die in einem frühen Atherosklerosestadium wirksam war. Kritisch muss für den vorliegenden Versuch eine mögliche erniedrigte Bioverfügbarkeit von Bortezomib bei erhöhter Fettmasse der Versuchstiere in Betracht gezogen werden.

#### 4.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Die männlichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im vorliegenden Versuch im Vergleich zu den weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant größere Gesamtplaquefläche. Betrachtet man den Abschnitt des Aortenbogens allein, ergibt sich kein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen bei dem Vergleich der Plaueflächen. Die kaudal folgenden Abschnitte der *Aorta thoracica* und der *Aorta abdominalis* waren in männlichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant stärker von Atherosklerose betroffen als in weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät zeigten die weiblichen Tiere in Behandlungs- und Kontrollgruppe weniger fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen als die LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse männlichen Geschlechts.

Es wird angenommen, dass Östrogene atheroprotektiv wirksam sind<sup>153</sup>. Männlichen und weiblichen Kaninchen, die eine diätinduzierte Hypercholesterinämie entwickelten, wurden



Östrogene, z. B. Östradiol, allein oder in Kombination mit Gestagen oral oder auf parenteralen Wegen verabreicht. Das Hormon reduzierte die Plaqueflächen in Aorta und Koronararterien. Die Kombinationstherapie mit Gestagen zeigte keinen Vorteil im Vergleich zur Monotherapie oder hatte einen hemmenden Effekt auf die antiatherogene Wirkung des Östrogens<sup>154, 155, 156</sup>. Studien haben wiederholt gezeigt, dass die Östrogentherapie in Abhängigkeit von der Dosis einen hemmenden Effekt auf Läsionen der Initiations- und Progressionsphase in ovariectomierten Mäusen hat. Die Behandlung mit Östradiol verhinderte bis auf wenige Ausnahmen eine Entwicklung der Plaques über das Stadium der „fatty streaks“ hinaus<sup>157, 158, 159</sup>. Die Administration von Östrogenen scheint auch in männlichen Tieren Einfluss auf die Plaquelast zu haben. Nicht nur die Therapie mit Östradiol, sondern auch die exogene Zufuhr von Testosteron zeigte ähnliche atheroprotektive Effekte. Orchiectomierte LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine erhöhte Plaquelast, und die Gabe von Östradiol oder Testosteron reduzierte selbige. Die zusätzliche Gabe eines Aromatasehemmers hob die atheroprotektive Wirkung des Testosterons wieder auf. Dies deutet darauf hin, dass nicht das Testosteron selbst, sondern erst die Konversion des Testosterons zu Östradiol über eine Aromatase die antiatherogene Wirkung zur Folge hatte<sup>156</sup>. Zusammengefasst zeigen diese Studienresultate, dass die hormonelle Konstitution weiblicher Tiere hinsichtlich des Östrogens im Vergleich zu den männlichen Tieren die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen hemmt. Die Behandlung mit Bortezomib hatte in einem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose keinen Einfluss auf die Plaquefläche, aber die höhere Östrogenausschüttung in weiblichen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu männlichen Tieren könnte dazu geführt haben, dass weibliche Mäuse signifikant kleinere Plaqueflächen ausbildeten als männliche LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse der gleichen Versuchsgruppe.

Es wurde bereits in anderen Studien gezeigt, dass es keinen Unterschied in der Wirkung von Bortezomib zwischen männlichen und weiblichen Probanden gibt. Die Ansprechrate der Bortezomibtherapie war bei männlichen und weiblichen Patienten mit Multiplen Myelom gleich hoch. Allerdings zeigte Bortezomib in weiblichen Ratten eine höhere Toxizität als in der männlichen Vergleichsgruppe<sup>35</sup>.

#### **4.7 Zusammenfassung und Ausblick**

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland. Weltweit starben im Jahr 2008 17,3 Mio. Menschen an Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen<sup>4, 6</sup>. Das UPS

reguliert entscheidende Prozesse bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose. Dazu gehören Inflammation, Proliferation und Apoptose. Die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, die die Atherosklerose begünstigen, wird durch das UPS beeinflusst.

Die Hemmung des UPS kann in frühen Stadien der Atherosklerose die Größe von atherosklerotischen Plaques in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant reduzieren. Es gibt Hinweise darauf, dass die Behandlung mit einem Proteasominhibitor in Abhängigkeit von der behandlungsunabhängigen Proteasomaktivität anti- oder proatherogen wirken kann. Außerdem ist die Wirkung der Proteasominhibition abhängig vom applizierten Proteasominhibitor, der Dosis des Proteasominhibitors, der Art der Applikation und dem Organismus, in den appliziert wird.

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals die Wirkung der niedrig dosierten Proteasominhibition mit Bortezomib auf die Entstehung eines fortgeschrittenen Stadiums der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Es wurden mithilfe der *En-face*-Methode die Plaquelächen der Versuchstiere bestimmt. Ein RNA-Microarray wurde durchgeführt, um Erklärungen für die Wirkungsweise von Bortezomib in einem späten Atherosklerosestadium auf molekularer Ebene zu erlangen.

Die Behandlung mit Bortezomib während der Entstehung fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen zeigte keinen Einfluss auf die Plaquelast in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Im Gegensatz zu einem früheren Stadium der Atherosklerose blieben Gene mit atheroprotektivem Einfluss in diesem fortgeschrittenen Stadium unreguliert, was das Ergebnis der gleich großen Plaquelast in Kontroll- und Behandlungsgruppe erklärt. Weitere Versuche sind notwendig, um das UPS und seine Rolle in den einzelnen Stadien der Atherosklerose vollständig verstehen zu können. Es wird diskutiert, dass die Behandlung mit Proteasominhibitoren aufgrund der unterschiedlichen Aktivität des UPS in den verschiedenen Atherosklerosestadien sowohl atheroprotektiv als auch proatherogen wirken kann. Die genaue Kenntnis über die Wirkung von Bortezomib in Abhängigkeit vom Atherosklerosestadium wäre nicht nur im Hinblick auf eine mögliche Therapie der Atherosklerose von großer Wichtigkeit, sondern auch bei der Einschätzung des kardiovaskulären Risikos in Bezug auf bereits etablierte Therapien bei onkologischen Erkrankungen von besonderem Interesse. Die systematische Erforschung der proteasomalen Kapazität in einem Tiermodell könnte Aufschluss darüber geben, zu welchem Zeitpunkt im Verlauf der Atherogenese die Behandlung mit einem Proteasominhibitor atheroprotektiv wirksam ist und ob die niedrig dosierte Proteasominhibition das kardiovaskuläre Risiko erhöht.

## Schriftenverzeichnis

- 1 Lusic AJ. Atherosclerosis. Nature 2000;407:233-241.
- 2 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 2002;420:868-874.
- 3 Classification of atherosclerotic lesions; report of a study group. World Health Organ Tech Rep Ser 1958;57:1-20.
- 4 Alwan A. Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization 2011.
- 5 Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network and European Society of Cardiology 2012.
- 6 Statistisches Bundesamt. Todesfälle 2011 leicht rückläufig - häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen. Pressemitteilung vom 6. Dezember 2012 – 425/12.
- 7 Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Adult Treatment Panel III guidelines. Circulation 2004;110:227-239.
- 8 Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-2497.
- 9 Weinmann A. Allgemeine Pathologie. Edition Medizin 1991;7. Auflage.
- 10 Arroya LH, Lee RT. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. Cardivasc Res 1999;41:369-375.

- 11 Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2292-2301.
- 12 Galkina E, Ley K. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 2007;8:1239-1248.
- 13 Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8264-8268.
- 14 Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011;12:204-212.
- 15 Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002;8:1249-1256.
- 16 Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2011;106:749-760.
- 17 Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2108-2114.
- 18 Rock KL, Gramm C, Rothstein L et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994;78:761-771.
- 19 Tanaka K. Molecular biology of proteasomes. *Mol Biol Rep* 1995;21:21-26.
- 20 Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003;426:895-899.

- 21 Wang X, Su H, Ranek MJ. Protein quality control and degradation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:11-27.
- 22 Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000;404:770-774.
- 23 Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001;8:739-758.
- 24 Lipford JR, Deshaies, RJ. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat Cell Biol* 2003;5:845–850.
- 25 Hilt W. Das Ubiquitin-Proteasom-System in Proteinqualitätskontrolle und Regulation. *BIOspektrum* 2005;11:446-449.
- 26 DeMartino GN, Slaughter CA. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 1999;274:22123-22126.
- 27 Orłowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 1990;29:10289-10297.
- 28 Früh K, Gossen M, Wang K, Bujard H, Peterson PA, Yang Y. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J* 1994;13:3236-3244.
- 29 McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:589-594.
- 30 Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:179-187.

- 31 McCutchen-Maloney SL, Matsuda K, Shimbara N et al. cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. *J Biol Chem* 2000;275:18557-18565.
- 32 Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000;19:94-102.
- 33 Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 2000;275:14336-14345.
- 34 Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994;79:13-21.
- 35 Bross PF, Kane R, Farrell AT et al. Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2004;10:3954-3964.
- 36 Borrissenko L, Groll M. 20S proteasome and its inhibitors: cristallographic knowledge for drug development. *Chem Rev* 2007;107:687-717.
- 37 Wilck N, Fechner M, Dreger H et al. Attenuation of early atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by proteasome inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1418-4126.
- 38 Chauhan D, Hideshima T, Mitsiades C, Richardson P, Anderson KC. Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 2005;4:686-692.
- 39 Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005;105:1383-1395.
- 40 Mitsiades CS, Mitsiades N, Munshi NC, Anderson KC. Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell* 2004;6:439-444.

- 41 Reddy N, Czuczman MS. Enhancing activity and overcoming chemoresistance in hematologic malignancies with bortezomib: preclinical mechanistic studies. *Ann Oncol* 2010;21:1756-1764.
- 42 Hideshima T, Richardson P, Chauhan D et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001;61: 3071-3076.
- 43 Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14374-14379.
- 44 Kane RC, Dagher R, Farrell A et al. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:5291-5294.
- 45 Mackay H, Hedley D, Major P et al. A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:5526-5533.
- 46 Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F et al. A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 2005;103:2584-2589.
- 47 Morris MJ, Kelly WK, Slovin S et al. A phase II trial of bortezomib and prednisone for castration resistant metastatic prostate cancer. *J Urol* 2007;178:2378-2383.
- 48 Johnson D. The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocr Relat Cancer* 2015;22:T1-17.
- 49 Mani A, Gelmann EP. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:4776-4789.
- 50 Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Cell Cycle* 2005;4:290-296.

- 51 Petrucelli L, Dawson TM. Mechanism of neurodegenerative disease: role of the ubiquitin proteasome system. *Ann Med* 2004;36:315-320.
- 52 Gazzero E, Assereto S, Bonetto A et al. Therapeutic potential of proteasome inhibition in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Am J Pathol* 2010;176:1863-1877.
- 53 Powell SR, Herrmann J, Lerman A, Patterson C, Wang X. The ubiquitin-proteasome system and cardiovascular disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012;109:295-346.
- 54 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-1695.
- 55 Weber C, Zerenecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nature Rev Immunol* 2008;8:802-815.
- 56 Stangl V, Lorenz M, Meiners S et al. Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J* 2004;18:272-279.
- 57 Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, Chen J. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:1-10.
- 58 Wei Q, Xia Y. Proteasome inhibition down-regulates endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function. *J Biol Chem* 2006;281:21652-659.
- 59 Xu J, Wu Y, Song P, Zhang M, Wang S, Zou MH. Proteasome-dependent degradation of guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I causes tetrahydrobiopterin deficiency in diabetes mellitus. *Circulation* 2007;116:944-953.



- 60 Whitsett J, Picklo MJ Sr, Vasquez-Vivar J. 4-Hydroxy-2-nonenal increases superoxide anion radical in endothelial cells via stimulated GTP cyclohydrolase proteasomal degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2340-2347.
- 61 Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113:1708-1714.
- 62 Xia T, Dimitropoulou C, Zeng J et al. Chaperone-dependent E3 ligase CHIP ubiquitinates and mediates proteasomal degradation of soluble guanylyl cyclase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H3080-3087.
- 63 Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nat Immunol* 2011;12:695-708.
- 64 Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994;78:773-785.
- 65 Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-6866.
- 66 Uwe S. Anti-inflammatory interventions of NF-kappaB signaling: potential applications and risks. *Biochem Pharmacol* 2008;75:1567-1579.
- 67 Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 2001;7:401-409.
- 68 Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004;382:393-409.
- 69 Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev* 2004;18:2195–2224.

- 70 Fan CM, Maniatis T. Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* 1991;354:395-398.
- 71 Ludwig A, Fechner M, Wilck N et al. Potent anti-inflammatory effects of low-dose proteasome inhibition in the vascular system. *J Mol Med* 2009;87:793-802.
- 72 Herrmann J, Saguner AM, Versari D et al. Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. *Circ Res* 2007;101:865-874.
- 73 Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJ. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2519-2530.
- 74 Wu M, Bian Q, Liu Y et al. Sustained oxidative stress inhibits NF-kappaB activation partially via inactivating the proteasome. *Free Radic Biol Med* 2009;46:62-69.
- 75 Meiners S, Ludwig A, Lorenz M et al. Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2232-2241.
- 76 Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. On to the Road to Degradation: Atherosclerosis and the Proteasome. *Cardiovasc Res* 2010;85:291-330.
- 77 Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 2009;48:91-104.
- 78 Park HM, Kim JA, Kwak MK. Protection against amyloid beta cytotoxicity by sulforaphane: role of the proteasome. *Arch Pharm Res* 2009;32:109-115.
- 79 Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138:S419-420.

- 80 Bradshaw EL, Li XA, Guerin T et al. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors prevent HIV protease inhibitor-induced atherosclerosis by ubiquitination and degradation of protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C1271-1278.
- 81 Ogura M, Ayaori M, Terao Y et al. Proteasomal inhibition promotes ATP-binding cassette transporter A 1 (ABCA1) and ABCG1 expression and cholesterol efflux from macrophages in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1980-1987.
- 82 Kikuchi J, Furukawa Y, Kubo N et al. Induction of ubiquitin-conjugating enzyme by aggregated low density lipoprotein in human macrophages and its implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:128–134.
- 83 Thyberg J, Blomgren K. Effects of proteasome and calpain inhibitors on the structural reorganization and proliferation of vascular smooth muscle cells in primary culture. *Lab Invest* 1999;79:1077-1088.
- 84 Herrmann J, Ciechanover A, Lerman LO et al. The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases-a hypothesis extended. *Cardiovasc Res* 2004;61:11-21.
- 85 Xie P, Fan Y, Zhang H et al. CHIP represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation via ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 2009;29:2398-2408.
- 86 Meiners S, Laule M, Rother W et al. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation* 2002;105:483-489.
- 87 Clarke MC, Figg N, Maguire JJ et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 2006;12:1075-1080.
- 88 Meiners S, Hoher B, Weller A et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome. *Hypertension* 2004;44:471-477.

- 89 Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C et al. Increased activity of the ubiquitin-proteasome system in patients with symptomatic carotid disease is associated with enhanced inflammation and may destabilize the atherosclerotic plaque: effects of rosiglitazone treatment. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2444-2455.
- 90 Herrmann J, Edwards WD, Holmes DR Jr et al. Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1919-1927.
- 91 Van Herck JL, De Meyer GR, Martinet W, Bult H, Vrints CJ, Herman AG. Proteasome inhibitor bortezomib promotes a rupture-prone plaque phenotype in ApoE-deficient mice. *Basic Res Cardiol* 2010;105:39-50.
- 92 Feng B, Zhang Y, Mu J et al. Preventive effect of a proteasome inhibitor on the formation of accelerated atherosclerosis in rabbits with uremia. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;55:129-138.
- 93 Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001;7:425-429.
- 94 Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med* 1999;5:1313-1316.
- 95 Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999;144:285-301.
- 96 Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 1995;36:2320-2328.

- 97 Chade AR, Herrmann J, Zhu X, Krier JD, Lerman A, Lerman LO. Effects of proteasome inhibition on the kidney in experimental hypercholesterolemia. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1005-1012.
- 98 Lottspeich F, Zorbas H. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag 1998, 323-368.
- 99 Nunnari JJ, Zand T, Joris I, Majno G. Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats. *Exp Mol Pathol* 1989;51:1-8.
- 100 Grossmann S, Bauer S, Robinson PN, Vingron M. Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent child analysis. *Bioinformatics* 2007;23:3024-3031.
- 101 Lindsten K, Menéndez-Benito V, Masucci MG, Dantuma NP. A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat Biotechnol* 2003;21:897-902.
- 102 Cavaletti G, Gilardini A, Canta A et al. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat. *Exp Neurol* 2007;204:317-325.
- 103 Herrmann J, Soares SM, Lerman LO, Lerman A. Potential role of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: aspects of a protein quality disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:2003-2010.
- 104 Di Filippo C, Marfella R, D'Amico M. Possible dual role of ubiquitin-proteasome system in the atherosclerotic plaque progression. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1350-1351.
- 105 Takaoka M, Ohkita M, Itoh M, Kobayashi Y, Okamoto H, Matsumura Y. A proteasome inhibitor prevents vascular hypertrophy in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28:466-468.
- 106 Lorenz M, Wilck N, Meiners S et al. Proteasome inhibition prevents experimentally-induced endothelial dysfunction. *Life Sci* 2009;84:929-934.

- 107 Meiners S, Ludwig A, Stangl V, Stangl K. Proteasome inhibitors: poisons and remedies. *Med Res Rev* 2008;28:309-327.
- 108 Dreger H, Westphal K, Wilck N, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Meiners S. Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovasc Res* 2010;85:395-403.
- 109 Levonen AL, Inkala M, Heikura T et al. Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:741-747.
- 110 Chen XL, Varner SE, Rao AS et al. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem* 2003;278:703-711.
- 111 Chen XL, Dodd G, Thomas S et al. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1862-1870.
- 112 Barringhaus KG, Matsumura ME. The proteasome inhibitor lactacystin attenuates growth and migration of vascular smooth muscle cells and limits the response to arterial injury. *Exp Clin Cardiol* 2007;12:119-124.
- 113 Takaoka M, Ohkita M, Matsumura Y. Pathophysiological role of proteasome-dependent proteolytic pathway in endothelin-1-related cardiovascular diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 2003;1:19-26.
- 114 Lin SJ, Shyue SK, Hung YY et al. Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:334-340.

- 115 Li L, Chu Y, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 2003;42:997-1003.
- 116 McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:410-417.
- 117 Quinn K, Henriques M, Parker T, Slutsky AS, Zhang H. Human neutrophil peptides: a novel potential mediator of inflammatory cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1817-824.
- 118 Feingold KR, Pollock AS, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C. Discordant regulation of proteins of cholesterol metabolism during the acute phase response. *J Lipid Res* 1995;36:1474-1482.
- 119 Gold R, Kappos L, Arnold DL et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;367:1098-1107.
- 120 McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem* 2003;278:21592-21600.
- 121 Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1199-1207.
- 122 Du ZX, Yan Y, Zhang HY et al. Proteasomeinhibition induces a p38 MAPK pathway-dependent antiapoptotic program via Nrf2 in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E763-771.

- 123 Weniger MA, Rizzatti EG, Pérez-Galán P et al. Treatment-induced oxidative stress and cellular antioxidant capacity determine response to bortezomib in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:5101-5112.
- 124 Li CQ, Kim MY, Godoy LC, Thiantanawat A, Trudel LJ, Wogan GN. Nitric oxide activation of Keap1/Nrf2 signaling in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:14547-14551.
- 125 Um HC, Jang JH, Kim DH, Lee C, Surh YJ. Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells. *Nitric Oxide* 2011;25:161-168.
- 126 Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-2496.
- 127 Duffy D, Rader DJ. Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:455-463.
- 128 Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005;96:1221-1232.
- 129 Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem* 2001;276:23742-23747.
- 130 Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9774-9779.
- 131 Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N et al. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3900-3908.



- 132 Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC, Böttinger EP. Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J Cell Sci* 2000;113:2355-2361.
- 133 Owens GK, Geisterfer AA, Yang YW, Komoriya A. Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1988;107:771-780.
- 134 Björkerud S. Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arterioscler Thromb* 1991;11:892-902.
- 135 Liu G, Espinosa E, Oemar BS, Lüscher TF. Bimodal effects of angiotensin II on migration of human and rat smooth muscle cells. Direct stimulation and indirect inhibition via transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1251-1257.
- 136 Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:399-404.
- 137 Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 2001;89:930-934.
- 138 Lutgens E, Gijbels M, Smook M et al. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:975-982.
- 139 McCaffrey TA, Consigli S, Du B et al. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J Clin Invest* 1995;96:2667-2675.

- 140 Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 2003;126:2738-2749.
- 141 Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-573.
- 142 Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005;85:1-31.
- 143 Sluijter JP, Pulskens WP, Schoneveld AH et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke* 2006;37:235-239.
- 144 Clarke MC, Figg N, Maguire JJ et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 2006;12:1075-1080.
- 145 Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1256-1261.
- 146 Van Vré EA, Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:887-893.
- 147 Takami Y, Nakagami H, Morishita R et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, a novel deubiquitinating enzyme in the vasculature, attenuates NF-kappaB activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2184-2190.

- 148 Choi J, Levey AI, Weintraub ST et al. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* 2004;279:13256-13264.
- 149 Grimm S, Höhn A, Grune T. Oxidative protein damage and the proteasome. *Amino Acids* 2012;42:23-38.
- 150 Butterfield DA, Boyd-Kimball D. Proteomics analysis in Alzheimer's disease: new insights into mechanisms of neurodegeneration. *Int Rev Neurobiol* 2004;61:159-188.
- 151 Castaño JG, Mahillo E, Arizti P, Arribas J. Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry* 1996;35:3782-3789.
- 152 Versari D, Herrmann J, Gössl M, Mannheim D, Sattler K, Meyer FB, Lerman LO, Lerman A. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2132-2139.
- 153 dos Santos RL, da Silva FB, Ribeiro RF Jr, Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014 May;18:89-103.
- 154 Hanke H, Hanke S, Finking G et al. Different effects of estrogen and progesterone on experimental atherosclerosis in female versus male rabbits. Quantification of cellular proliferation by bromodeoxyuridine. *Circulation* 1996;94:175-181.
- 155 Haines CJ, James AE, Panesar NS et al. The effect of percutaneous oestradiol on atheroma formation in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999;143:369-375.
- 156 Bjarnason NH, Haarbo J, Byrjalsen I, Alexandersen P, K auffman RF, Christiansen C. Raloxifene and estrogen reduces progression of advanced atherosclerosis-a study in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001;154:97-102.

- 157 Nathan L, Shi W, Dinh H et al. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3589-3593.
- 158 Hodgin JB, Knowles JW, Kim HS, Smithies O, Maeda N. Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice. *J Clin Invest* 2002;109:541-548.
- 159 Elhage R, Clamens S, Besnard S et al. Involvement of interleukin-6 in atherosclerosis but not in the prevention of fatty streak formation by 17beta-estradiol in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2001;156:315-320.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau des 26 S-Proteasoms	6
2.1	Versuchsaufbau zur Erforschung der niedrig dosierten Proteasominhibition mit Bortezomib in einem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose in LDLR <sup>-/-</sup> -Mäusen	20
2.2	Reduktion von zweiwertigem Kupfer (Cu <sup>2+</sup> ) zu einwertigem Kupfer (Cu <sup>+</sup> ) durch ein Protein und Bildung des violetten Bicinchoninsäurekomplexes (BCA)	22
2.3	Darstellung der <i>A. iliaca dextra</i> vor Durchtrennung (a) und Punktion des linken Ventrikels (b)	28
2.4	Blick in den Thorax einer männlichen LDLR <sup>-/-</sup> -Maus nach 16 Wochen Normaldiät (a) und nach 16 Wochen fett- und cholesterolreicher Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) sowie zweimal wöchentlicher intraperitonealer Applikation von 50 µg Bortezomib/ kg Körpergewicht (b)	30
2.5	Schnittkanten bei der Feinpräparation der Aorten	31
2.6	Gesamtbild der Aorta aus 2 Fotos zusammgefügt (a), ausgeschnittene Aorta (b) und Aorta mit ausradierten Minutienstiften (c)	34
3.1	Die Injektion von 50 µg Bortezomib pro kg Körpergewicht (KG) führt zur partiellen Proteasominhibition	41
3.2	Bortezomib hat in LDLR <sup>-/-</sup> -Mäusen unter fett- und cholesterolreicher Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) keinen Einfluss auf das Körpergewicht	43
3.3	Die Injektion von Bortezomib für 16 Wochen hat in LDLR <sup>-/-</sup> -Mäusen unter fett- und cholesterolreicher Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) keinen Einfluss auf das Serumcholesterol	44
3.4	Die proteasomale Aktivität in Leberlysaten von LDLR <sup>-/-</sup> -Mäusen nach 16 Wochen Hochcholesteroldiät und zweimal wöchentlicher intraperitonealer Applikation von Bortezomib oder Natriumchloridlösung	46
3.5	Die Injektion von Bortezomib für 16 Wochen hatte in LDLR <sup>-/-</sup> -Mäusen unter fett- und cholesterolreicher Diät (15 % Kakaobutter, 1,25 % Cholesterol) keinen Einfluss auf die Gesamtgröße der Plaquefläche in der Aorta	48
3.6	Plaqueflächen drei definierter Aortenabschnitte	49

## Tabellenverzeichnis

1.1	Risikofaktoren der Atherosklerose	1
1.2	Funktionsbereiche ausgewählter Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems	4
2.1	Material für die Proteinisolation	21
2.2	Material für die Bicinchoninsäurekomplex-Proteinquantifizierung	22
2.3	Zusammensetzung des Polyacrylamidgels	24
2.4	Lösungen und anderes Material	24
2.5	Material für das Blotten	25
2.6	Material für die Antikörperbindung und das Strippen des Westernblots	26
2.7	Material für die Proteasomaktivitätsmessung	36
2.8	Material für die Messung der Cholesterinkonzentration	37
3.1	Körpergewicht (KG), Serumcholesterol, Proteasomaktivität und Plaquerfläche im Überblick	50
3.2	Der RNA-Microarray zeigt die Regulation der Genexpression in den Aorten von männlichen LDLR <sup>-/-</sup> -Mäusen nach 16-wöchiger fett- und cholesterolreicher Diät in Kontroll- (K) und Behandlungsgruppe (B) als x-fache Erhöhung oder Erniedrigung im Vergleich zur Baseline (BL)	54

## Abkürzungsverzeichnis

A., Aa.	<i>Arteria (singular), Arteriae (plural)</i>
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A 1</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette transporter G 1</i>
ACI	<i>Arteria carotis interna</i>
agLDL	<i>aggregated low-density lipoprotein</i>
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein-2</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
BH4	Tetrahydrobiopterin
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BL/ 6-Maus	Black 6-Maus
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CBF	Campus Benjamin Franklin
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CFTR $\Delta$ F508	Mutation im Gen für das Protein <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> , Deletion des Codons für Phenylalanin an Position 508
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHIP	C-Terminus des Hsc70-interagierenden Proteins
cIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
cRNA	<i>coding RNA</i>
CRP	C-reaktives Protein
Cu	Kupfer

Cy3	Carbocyanin 3
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
et al.	<i>et alii, et aliae, et alia</i>
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FES	<i>Feature Extraction Software</i>
GO	<i>gene ontology</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GTPCH	Guanosin 5-Triphosphat-Cyclohydrolase
HCL	Hydrochlorid
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
4-HNE	4-Hydroxynonenal
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hsc 70	Hitzeschockprotein 70
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IKK $\alpha$	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B kinase, I<math>\kappa</math>B kinase <math>\alpha</math></i>
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
iNOS	induzierbare NO-Synthase
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Keap-1	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LK	Ladekontrolle
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>



LDLR <sup>-/-</sup> -Maus	LDL-Rezeptor-defiziente Maus
LIG	LDL-induzierbares Gen
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
Mg (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	Magnesiumacetat
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC-I	<i>major histocompatibility complex I</i>
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NADPH-Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nox 1, 3 und 4	NADPH-Oxidase-Isoform 1, 3 und 4
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
oxLDL	oxidiertes LDL
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p27 <sup>kip1</sup>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
PA 700	Proteasomaktivator 700
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PKCα	Proteinkinase Cα
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RCT	<i>reverse cholesterol transport</i>
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RGB	Rot Grün Blau
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i>
Succ-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-AMC

TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th1-Zelle	Subgruppe der Thymus-Helferzellen
Tnfaip	<i>tumor necrosis factor alpha-induced protein</i>
Tnfrsf	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
Tnfsf	<i>tumor necrosis factor superfamily</i>
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octoxinol 9
TRIZol <sup>®</sup>	<i>guanidinium thiocyanate-phenol</i>
Tween 20	Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat
U.S.A.	<i>United States of America</i>
Ub <sup>G76V</sup> GFP1	Ubiquitin verbunden mit dem N-terminus des grün fluoreszierenden Proteins, Glycin 78 zu Valin mutiert
Ubi	Ubiquitin
UCHL1	Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
WT	Wildtyp
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Frau Aimara Arias, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Atherosklerose in der LDL-Rezeptor-defizienten Maus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung („Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Aimara Arias

## **Lebenslauf**

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

## **Publikationsliste**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in

Wilck N, Fechner M, Dreger H, Hewing B, Arias A, Meiners S, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Ludwig A. Attenuation of early atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by proteasome inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1418-1426.

publiziert.

## **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Frau Aimara Arias hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Wilck N, Fechner M, Dreger H, Hewing B, Arias A, Meiners S, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Ludwig A. Attenuation of early atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by proteasome inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1418-1426.

Beitrag im Einzelnen:

- 1) Durchführung und Auswertung der Dosisfindungsversuche
- 2) Laborspezifische Etablierung einer Methode zur Ermittlung der Plauefläche der Gesamtaorta (*En-face*-Methode) sowie deren Anwendung und Auswertung

Unterschrift der Doktorandin

## **Danksagung**

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Karl Stangl herzlich für die außerordentliche Möglichkeit bedanken unter seiner Führung am kardiologischen Forschungslabor der Charité forschen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meiner wissenschaftlichen Betreuerin vor Ort Dr. rer. nat. Antje Ludwig, die mir in einer Art und Weise im Labor und weit darüberhinaus zur Seite stand, die nicht anders als unglaublich geistreich, hilfreich und liebevoll zu bezeichnen ist. Ohne die tatkräftige Unterstützung und den wissenschaftlichen Rat, insbesondere von Anke Stach und Susanne Metzkow, aber auch von allen anderen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Ich danke aus vollem Herzen meinem geliebten Max, der mit viel Geduld und Liebe diese lange Zeit der Dissertation an meiner Seite stand und mich mit viel Nachsicht unterstützt hat. An dieser Stelle möchte ich auch meinen lieben Freunden danken, die mich in den Jahren getragen haben und stets an mich geglaubt und mir geholfen haben, die Arbeit zum Abschluß zu bringen. Ich möchte mich auch bei meiner Mama bedanken, ohne die mein Studium und auch die Dissertation nicht möglich gewesen wären. Danke Euch allen! Ich bin sehr glücklich Euch in meinem Leben zu wissen.