

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

„Vergleich des Proteasom-Inhibitors Bortezomib und des Immunproteasom-Inhibitors
ONX-0914 in ihrer Wirkung auf kortikale Primärkulturen der Ratte“

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.
(doctor medicinae)

An der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von
Aus
Magdeburg

Laura von Brzezinski
Rostock
2018

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Von Brzezinski, Laura

„Vergleich des Proteasom-Inhibitors Bortezomib und des Immunoproteasom-Inhibitors ONX-0914 in ihrer Wirkung auf kortikale Primärkulturen der Ratte“

(2018, 28 Abbildungen, 5 Tabellen)

Kurzreferat

Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (BZ) ist ein erfolgreich angewandtes Chemotherapeutikum in der Behandlung des Multiplen Myeloms (MM). Seine dosislimitierende Nebenwirkung ist die periphere Neuropathie, die zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten unter Therapie führt. Neuere Therapiekonzepte verfolgen die selektive Blockade von Untereinheiten des Immunoproteasoms. Hierin liegt die Chance auf eine medikamentöse Behandlung des MM mit geringerem Nebenwirkungsprofil und das Überwinden der BZ-induzierten Chemoresistenz.

Diese Arbeit untersuchte die Unterschiede zwischen BZ und ONX-0914 (ONX), einem selektiven Immunoproteasom-Inhibitor, in ihrer Wirkung auf kortikale Primärkulturen der Ratte.

Beide Pharmaka unterschieden sich deutlich in ihrer Wirkung auf das Überleben und die Vitalität von Neuronen. Die Applikation von BZ führte zu einer konzentrationsabhängigen Zellzahlreduktion, einer Verminderung der Synapsendichte, reduzierten Expressionslevel ausgesuchter Proteine des Zellüberlebens und zu einem Anstieg des Apoptose-vermittelnden Proteins Caspase 3 im Vergleich zu ONX. Insgesamt konnte eine geringere Toxizität des Immunoproteasom-Inhibitors ONX festgestellt werden.

Um weitere Aussagen über das Nebenwirkungsprofil von ONX, vor allem bezüglich der peripheren Neuropathie, treffen zu können, sind weiterführende *in vitro* und *in vivo* Experimente mit neuronalen Zellen des PNS von großem wissenschaftlichen Interesse.

Schlüsselwörter

Bortezomib, ONX-0914, Immunoproteasom, Proteasom, periphere Neuropathie, neuronale Zellkultur, β 5i/LMP7

Anmerkung

Um den Lesefluss nicht zu stören wurde bei Patienten die maskuline Form des Substantives gewählt. Selbstverständlich sind in diesem Fall immer beide Geschlechter gemeint.

Inhaltsverzeichnis

Titelblatt.....	I
Dokumentationsblatt.....	III
Schlüsselwörter.....	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
1.1. Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System.....	1
1.2. Das Proteasom	2
1.3. Das Immunoproteasom und seine LMP7-Untereinheit.....	3
1.4. Das Multiple Myelom.....	5
1.5. Proteasom-Inhibitoren	8
1.5.1. Bortezomib.....	8
1.5.2. ONX-0914.....	12
1.6. Zielvorstellung	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Material.....	15
2.1.1. Tiere	15
2.1.2. Chemikalien.....	15
2.1.3. Proteasom-Inhibitoren	16
2.1.4. Antikörper	16
2.1.4.1. Primäre Antikörper.....	16
2.1.4.2. Sekundäre Antikörper.....	17
2.2. Methoden	17
2.2.1. Herstellung und Kultivierung kortikaler Primärkulturen	17
2.2.2. Behandlung kortikaler Primärkulturen	18
2.2.3. Immunzytochemie.....	18
2.2.4. Mikroskopie	19
2.2.5. Qualitative und quantitative Analyse der Primärkulturen.....	19
2.2.6. Proteinextraktion aus behandelter kortikaler Primärkultur	20
2.2.7. Amidoschwarz Test.....	21
2.2.8. Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
2.2.9. Western Blot.....	24
2.2.10. Signalquantifizierung der Proteinlevel im Western Blot	25

2.2.11.	Statistische Auswertung.....	25
3.	Ergebnisse	26
3.1.	Toxizität von DMSO.....	26
3.2.	Neurodegeneration in der Zellkultur	27
3.3.	Veränderungen der Zellmorphologie.....	35
3.4.	Pharmakologische Grenzwerte von Bortezomib und ONX-0914.....	38
3.5.	Veränderung der Neuronenzahl	39
3.6.	Dosis-Wirkungs-Analyse.....	42
3.7.	Quantität synaptischer Dornen	44
3.8.	Beeinflussung der Proteinhomöostase.....	47
3.9.	Phosphorylierung von CREB zu phospho-CREB	62
4.	Diskussion.....	63
4.1.	Behandlung kortikaler Primärkulturen der Ratte und ihre Verwendung als Modellorganismus	63
4.2.	Toxikologische Charakterisierung von BZ und ONX.....	65
4.3.	Neurodegeneration durch Proteasom-/Immunoproteasom-Inhibition	67
4.4.	Proteinanalyse	68
4.5.	Ausblick	73
5.	Zusammenfassung.....	75
6.	Veröffentlichung	77
7.	Literaturverzeichnis.....	78
8.	Danksagung	97
9.	Eidesstattliche Erklärung	98
10.	Darstellung des Bildungsweges.....	99

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1:	Induktion des Proteasoms zum Immunoproteasom	S. 3
Abb. 1.2:	Induktion des Proteasoms zum Immunoproteasom.....	S. 7
Abb. 1.3:	Chemische Struktur von BZ (A) und ONX (B).....	S. 8
Abb. 1.4:	Apoptotische Wirkung der Proteasom-Inhibition	S.10
Tab. 2.1:	Primäre Antikörper.....	S.16
Tab. 2.2:	Sekundäre Antikörper.....	S.17
Tab. 2.3:	Zusammensetzung des BSA-Standards in der Eichreihe.....	S. 21
Tab. 2.4:	Zusammensetzung der 5-20 % Gradient-SDS-Polyacrylamidgele	S.23
Abb. 2.1:	5-20 % SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie Brilliant Blau Färbung..	S.23
Abb. 3.1:	Vergleichende Immunfluoreszenzmikroskopie zwischen Leerkontrolle und DMSO-Kontrolle.....	S. 27
Abb. 3.2:	Map2-gefärbte Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h und 48 h.....	S. 29
Abb. 3.3:	Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h.	S. 32
Abb. 3.4:	Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX für 48 h.	S. 34
Abb. 3.5:	Charakteristische morphologische Veränderungen als Merkmale der Neurodegeneration nach Applikation von BZ und ONX. .	S. 36
Abb. 3.6:	Veränderung der Dendritenstruktur nach Behandlung mit BZ und ONX.....	S. 37
Tab. 3.1:	Toxikologische Schwellenwerte nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h und 48 h.....	S. 38
Abb. 3.7:	Mikroskopisch erkennbare Zellzahlreduktion nach Gabe von BZ und ONX.	S. 40
Abb. 3.8:	Quantifizierung MAP2-positiver Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX.	S. 41
Abb. 3.9:	Toxizitätscharakteristika von BZ und ONX in der Dosis-Wirkungs-Kurve.	S. 43
Abb. 3.10:	Verminderung des Synaptophysinsignals durch Behandlung mit BZ	S. 45
Abb. 3.11:	Quantifizierung von Synaptophysin nach Behandlung mit BZ und ONX für 48 h.	S. 46
Abb. 3.12:	Veränderte Proteinexpression nach Behandlung mit BZ und ONX.	S. 48
Abb. 3.13:	Quantifizierung des Proteinlevels von phospho-NFκB nach	

	Behandlung mit BZ und ONX.	S.49
Abb. 3.14:	Quantifizierung des Proteinlevels von CREB nach Behandlung mit BZ und ONX.	S. 51
Abb. 3.15:	Quantifizierung des Proteinlevels von phospho-CREB nach Behandlung mit BZ und ONX.....	S. 52
Abb. 3.16:	Quantifizierung des Proteinlevels von Caspase 3 nach Behandlung mit BZ und ONX.....	S. 54
Abb. 3.17:	Quantifizierung des Proteinlevels von α 6 nach Behandlung mit BZ und ONX.	S. 56
Abb. 3.18:	Quantifizierung des Proteinlevels von β -Aktin nach Behandlung mit BZ und ONX.....	S. 57
Abb. 3.19:	Quantifizierung des Proteinlevels von AMPA-Rezeptor nach Behandlung mit BZ und ONX.....	S.58
Abb. 3.20:	Quantifizierung des Proteinlevels von Synaptophysin nach Behandlung mit BZ und ONX.....	S. 59
Abb. 3.21:	Quantifizierung des Proteinlevels von Iba 1 nach Behandlung mit BZ und ONX.	S. 60
Abb. 3.22:	Quantifizierung des Proteinlevels von GFAP nach Behandlung mit BZ und ONX.	S. 61
Abb. 3.23:	Verhältnis der Expression von CREB zu phosphoryliertem CREB nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h und 48 h.....	S. 62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMPAR	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
APS	Aminopropyltriethoxysilan
ASZT	autologe Stammzelltransplantation
BMSC	<i>bone marrow stromal cells</i>
BSA	bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
Cas 3	Caspase 3
CREB	<i>cAMP response element binding proteine</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIV	<i>days in vitro</i>
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
g	Gramm
GFAP	<i>glial fibrillary acidic proteine</i>
h	Stunden
Iba 1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IFN	Interferon
IκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
IKK	IκB-Kinase
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC	<i>lethal concentration</i>
LMP2	<i>low molecular mass protein 2</i>
LMP7	<i>low molecular mass protein 7</i>
LOAEL	<i>lowest observed adverse effect level</i>
mA	Milliampere
MAP2	<i>microtubule-associated proteine 2</i>
MECL-1	<i>multicatalytic endopeptidase complex subunit 1</i>
MGUS	<i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>

µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC1/2	<i>major histocompatibility complex 1/2</i>
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
MTD	<i>maximum tolerated dose</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOAEL	<i>no observed adverse effect level</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
pCREB	phospho-CREB (Serin 133)
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Protease-Inhibitor
PLP	Periodat-Lysin-Paraformaldehyd
PN	periphere Neuropathie
PNS	Peripheres Nervensystem
PS	Phospho-Stopp
PSMA6	<i>Proteasome subunit alpha type 6</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Syphy	Synaptophysin 1
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline
TBS-T	Tris gepufferte Saline mit 0,1% Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPA	<i>ubiquitinated protein aggregates</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Tumorerkrankungen sind laut der World Health Organisation weltweit gesehen die zweithäufigste Todesursache (WHO 2014). Maligne hämatologische Erkrankungen sind unter allen Tumorentitäten eine heterogene Gruppe. Zu ihnen gehört das Multiple Myelom (MM). Obwohl es eine geringe Inzidenz von ca. 6 auf 100.000 Einwohner in Europa hat (Sant et al. 2010), ist es eine häufige hämatologische Tumorerkrankung (Siegel et al. 2017). Die Entwicklung des ersten therapeutisch zugelassenen Proteasom-Inhibitors Bortezomib galt als Durchbruch, da die Ansprechens- und Überlebensrate von Patienten mit refraktärem und neu aufgetretenem MM deutlich verbessert werden konnten (Richardson et al. 2005, San Miguel et al. 2008). Inzwischen ist durch die Anwendung von Kombinationstherapien mit Bortezomib eine Verdoppelung des Überlebens im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie möglich (Ozaki et al. 2014). Zu den unerwünschten Nebenwirkungen von Bortezomib gehört jedoch, neben Thrombozytopenie, Störungen des Gastrointestinaltraktes und Müdigkeit, besonders die periphere Neuropathie als dosislimitierender off-target-Effekt (Richardson et al. 2003). Folglich haben neue therapeutische Ansätze in der Behandlung des MM die Entwicklung von Pharmaka mit verbessertem Sicherheitsprofil zum Ziel. Dazu gehört eine neue Gruppe von Proteasom-Inhibitoren, die selektiv an das sogenannte Immunoproteasom binden. ONX-0914 ist einer dieser Inhibitoren, der sich noch in der Evaluation befindet. Im Folgenden werden die molekularen Grundlagen für das Wirkprofil von Bortezomib und ONX-0914 dargestellt und ihre Bedeutung in der Behandlung des MM erläutert.

1.1. Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System

Der Großteil der zellulären Proteine in Eukaryoten wird über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut (Kornitzer und Ciechanover 2000). Dies betrifft fast alle Proteine, vor allem regulatorische Proteine entsprechend des momentanen metabolischen Zellstatus sowie auch fehlgefaltete und beschädigte Proteine.

Im Prozess der proteasomalen Proteindegradation erfolgt zunächst die Ubiquitinierung der zum Abbau bestimmten Proteine. Unter Spaltung von ATP geht das Enzym E1 eine

Bindung mit dem C-Terminus eines Ubiquitin-Moleküls ein. E2 transferiert das aktivierte Ubiquitin auf E3, eine Ubiquitinligase die während der Retranslokation von Proteinen aus dem ER ins Zytosol das Substrat markiert. Die Degradierung der polyubiquitinierten Proteinkette wird über die Bindung an die 19S-Einheiten des Proteasoms ermöglicht. Am Ende des Prozesses bleiben zerkleinerte Peptide aus 7 bis 8 Aminosäuren bestehen. Defekte im Ubiquitin-assoziierten Proteinabbau bedingen eine Reihe von Krankheitsbildern wie neurodegenerative Erkrankungen (Selkoe 2004), Kardiomyopathie (Gilda und Gomes 2017), Autoimmunerkrankungen (Wang und Maldonado 2006) und Erbkrankheiten (Ward et al. 1995).

1.2. Das Proteasom

Das 26S-Proteasom ist ein zytosolischer Proteinkomplex, der die Proteolyse von Proteinen über das UPS ermöglicht und somit zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase aller eukaryotischer Zellen beiträgt. Der zylindrisch geformte Multi-Protein-Komplex besteht aus einer proteolytisch aktiven 20S-Einheit und zwei regulatorisch wirksamen 19S-Einheiten. Die 20S-Einheit enthält vier heptamere Ringe; davon zwei periphere α -Ringe mit den Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 7$ und zwei mittlere β -Ringen aus den Untereinheiten $\beta 1$ - $\beta 7$. Die $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 5$ -Untereinheiten sind Threonin-Peptidasen mit Caspase-ähnlicher, tryptischer und chymotryptischer Aktivität (Heinemeyer et al. 1997). Sie spalten jeweils innerhalb von Proteinen nach sauren, basischen und hydrophoben Aminosäuren (Voutsadakis 2017).

Das Proteasom ist unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ein zentraler Bestandteil im Proteinabbau durch das UPS. Beispielsweise werden regulatorische Proteine je nach Anforderung an den Zellzyklus durch das Proteasom im Gleichgewicht gehalten. Besonders am Beispiel des Transkriptionsfaktors NF κ B, dessen Aktivierung ein Resultat der UPS-bedingten Reduktion seines Inhibitors I κ B ist, wird dies deutlich (Karin und Ben-Neriah 2000). Des Weiteren generiert das Proteasom Peptide für die Antigen-Präsentation und trägt zur synaptischen Plastizität bei (Hegde et al. 1997). Aber auch beschädigte Proteine und Proteinaggregate, die sich in Zellstresssituationen bilden, werden durch das Proteasom degradiert. Der Abbau von Proteinen durch das Proteasom erfolgt teilweise mit insuffizienter Kapazität und es kann vermehrt zur Akkumulation von Proteinabbauprodukten kommen (Ebstein et al. 2012). Bedingt durch diese

Vulnerabilität entwickelte sich das Proteasom in den letzten Jahren zu einem relevanten Ansatzpunkt in der Tumorthherapie (Grigoreva et al. 2015). Besonders hochsekretorische hämatologische Erkrankungen wie das MM können erfolgreich durch medikamentöse Unterbrechung des Proteinabbaus behandelt werden.

1.3. Das Immunoproteasom und seine LMP7-Untereinheit

Das Immunoproteasom ist eine induzierbare Isoform des Proteasoms. Als Anpassungsreaktion unter bestimmten Anforderungen an die zelluläre Homöostase können die induzierbaren Untereinheiten $\beta 1i$ /low molecular mass protein (LMP)2, $\beta 2i$ /Multicatalytic endopeptidase complex subunit (MECL)1 und $\beta 5i$ /LMP7 anstelle der Standard-Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ in das Proteasom inkorporiert werden (Yang et al. 1992).

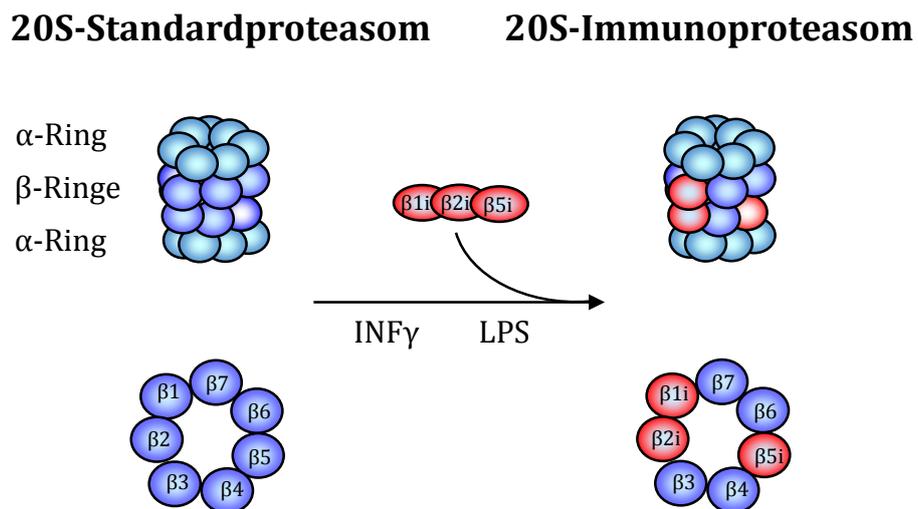


Abb. 1.1: **Induktion des Proteasoms zum Immunoproteasom** (modifiziert nach McCarthy und Weinberg 2015)

Das Immunoproteasom wird in Immunzellen konstitutiv exprimiert (Noda et al. 2000). Es kann allerdings in Stresssituationen, die die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IFN γ oder TNF α auslösen, auch in anderen Gewebearten induziert werden (Aki et al. 1994). Die induzierbaren Untereinheiten des Immunoproteasoms konnten ebenfalls im Hippocampus und Cerebellum des menschlichen Gehirns nachgewiesen werden (Piccinini et al. 2003). Speziell Mikroglia und Astrozyten scheinen das Immunoproteasom in Entzündungsmodellen zu exprimieren (Kremer et al. 2010).

Lange ging man nur von einer Rolle des Immunoproteasoms in der MHC-I-vermittelten Antigen-Präsentation aus (Yewdell 2005), die zu einer effizienteren Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen als Immunantwort (Kloetzel 2001) führt. Doch Seifert et al. und auch andere konnten zeigen, dass es noch andere Funktionen erfüllt. Bei Entzündungsprozessen kommt es neben der verstärkten Produktion von Zytokinen auch zur Bildung von Sauerstoffradikalen. Diese führen dazu, dass vermehrt geschädigte Proteinsubstrate anfallen, deren Abbau das Proteasom nicht bewältigen kann. Doch die gesteigerte Expression des Immunoproteasoms verhindert die Akkumulation von Proteinen und erhält so im IFN γ -induzierten oxidativen Stress die Proteinhomöostase aufrecht (Seifert et al. 2010). Hierfür weist es höhere Kapazitäten als das konstitutive Proteasom auf. In Ergänzung dazu zeigten LMP7-defiziente Zellen eine höhere Akkumulation von potenziell toxischen Proteinaggregaten und waren empfänglicher für apoptotische Signale (Seifert et al. 2010). Andere Ergebnisse in Immunoproteasom-defizienten Mäusen zeigten eine reduzierte Überlebensrate und verminderte proteasomale Aktivität in Inflammationsmodellen (Chou et al. 2008, Opitz et al. 2011). Im Gegensatz dazu scheint sich ein LMP7-Defizit bei Autoimmunkrankheiten (Schmidt et al. 2010) als vorteilhaft zu erweisen. Positive Effekte der LMP7-Defizienz/-Inhibition sind über Einflüsse auf die Differenzierung verschiedener T-Zell-Populationen zu erklären (Kalim et al. 2012). Auch in Tumormodellen bietet die LMP7-Defizienz/-Inhibition einen Überlebensvorteil (Koerner et al. 2017). Dieser Widerspruch ist jedoch nicht überraschend, da das Proteasom im Zellzyklus sowohl positive, als auch negative regulatorische Funktionen erfüllt (Naujokat und Hoffmann 2002). Als Bestandteil der angeborenen Immunität ist es in Situationen mit oxidativem Stress in der Lage, die Zellviabilität aufrecht zu erhalten. Dies geschieht, indem die Aggregation von toxischen Proteinkomplexen unterbunden wird. Als Teil des adaptiven Immunsystems wiederum ist das Immunoproteasom in der Lage Proteine aus pathogenen Quellen über effektive Proteolyse der Antigenpräsentation zugänglich zu machen (Kruger und Kloetzel 2012).

Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die gezielte Blockade des Immunoproteasoms in bestimmten Krankheitssituationen von therapeutischem Nutzen sein könnte. Ebenso wie das Proteasom zuvor gilt das Immunoproteasom seit kurzem als aussichtsreicher pharmakologischer Angriffspunkt. Besonders die LMP7-Untereinheit scheint ein effizienter Schlüssel zur Symptomreduktion in präklinischen Mausmodellen sein. Bisher erfolgte die Analyse mithilfe des Immunoproteasom-Inhibitors ONX vordringlich in der Therapie von Autoimmunkrankheiten (Basler et al. 2015). Doch auch eine LMP7-Inhibition als Wirkmechanismus in der Therapie von hämatologischen Primärtumoren liegt nahe (Ettari et al. 2016). Für selektive Immunoproteasom-Inhibitoren wie z.B. ONX steht diese Analyse noch aus.

1.4. Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine neoplastische Erkrankung des Knochenmarks und peripheren Blutes, an der jährlich etwa 3000 Männer und 2700 Frauen in Deutschland erkranken (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie 2013). Durch genetische Aberrationen entarten antikörperbildende Plasmazellen, eine finale Differenzierungsstufe der B-Zellreihe (Seidl et al. 2003). Diese sogenannte MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) gilt als Vorstufe des MMs (Landgren et al. 2009). Erst durch ein Zusammenspiel verschiedener molekularer und genetischer Mechanismen kommt es zur Progression und zum klinischen Ausbruch der Krankheit (Kuehl and Bergsagel 2002, Raab et al. 2009). Durch Bindung an bone marrow stromal cells (BMSCs) werden die Plasmazytomzellen aus dem peripheren Blut ins Knochenmark eingeschwemmt und setzen vielfältige Signalkaskaden in Gang (Podar et al. 2005). Die Zellen der normalen Hämatopoese werden verdrängt. Symptome sind Blutbildveränderungen wie Leukopenie, Anämie und Thrombopenie. Durch erhöhte Ausscheidung von Immunglobulinen kommt es zu Mikrozirkulationstörungen und Nierenschäden. Knochendestruktion ist ein Symptom der fortgeschrittenen Erkrankung (Herold 2011).

Als Initialtherapie stehen verschiedenen Chemotherapie-Regimen zur Verfügung (siehe Abb. 1.2). Die Prognose der Krankheit ist nur individuell abschätzbar und unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren wie z.B. Alter, Vorerkrankungen und Level einiger Laborparameter (Kiba et al. 2014). Die Proteasom-Konzentration und die

chymotryptische Aktivität im Blutplasma korrelieren mit dem IL-6 Level und sind ein Marker für die Tumorlast und ein Prognose-Indikator (Oldziej et al. 2014).

Dank vielfältiger Therapieoptionen konnte in den letzten 15 Jahren eine Verlängerung des Überlebens der Patienten erreicht werden (Sonneveld et al. 2017). Besonders die Zulassung der therapeutischen Anwendung von BZ hat dazu beigetragen und ist daher als Behandlungsoption des MM unerlässlich. Jedoch könnten speziell Patienten im refraktären Stadium der Krankheiten von der Entwicklung weiterer neuer Chemotherapeutika profitieren, da Einbußen in der Lebensqualität bei fortgeschrittener Erkrankung oft auf Nebenwirkungen der bisher verfügbaren Therapie zurückzuführen sind (Jordan et al. 2014).

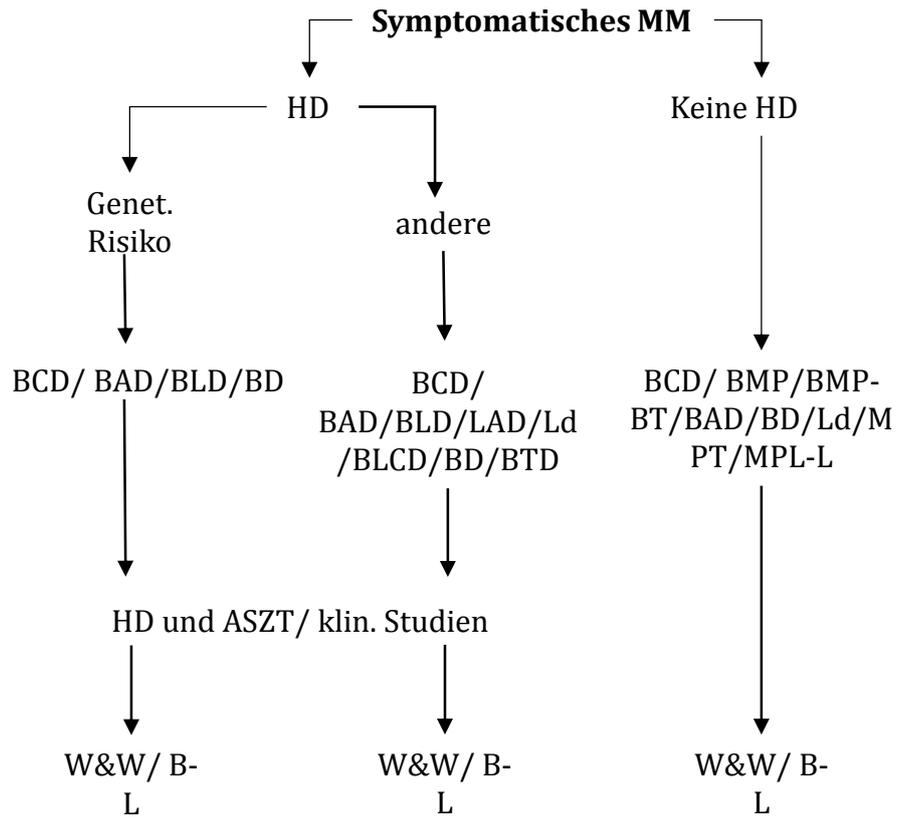
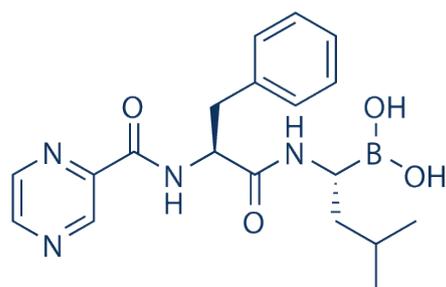


Abb. 1.2: **Therapieregime zur Behandlung des Multiplen Myeloms** (modifiziert nach DGHO 2013). A: Doxorubicin, B: BZ, C: Cyclophosphamid, D: Dexamethason Hochdosis, d: Dexmethason in niedriger Dosis, L: Lenalidomid, M: Melphalan, P: Prednisolon, T: Thalidomid, w&w: watch and wait (abwarten und beobachten), HD: Hochdosistherapie, ASZT: autologe Stammzeltransplantation

1.5. Proteasom-Inhibitoren

Neben BZ, das als erster therapeutischer Proteasom-Inhibitor zugelassen wurde, gibt es eine weitere Reihe pharmakologischer Substanzen, die hemmend auf das konstitutiv exprimierte Proteasom oder auf das induzierte Immunoproteasom wirken. Zu ihnen gehören weitere Borsäure-Derivate wie Ixazomib und Delanzomib, sowie Marizomib (ein nicht-peptidisches Lactazystin-Analogon), aber auch andere Peptid-basierte Proteasom-Inhibitoren, z.B. die Epoxyketone Carfilzomib und Oprozomib. Alle binden mit mehr oder weniger hoher Affinität sowohl an das Proteasom, als auch an das Immunoproteasom (Dou und Zonder 2014). Bisher wenig bekannt ist über alleinige Inhibitoren des Immunoproteasoms, zu denen das Epoxyketon ONX-0914 (ONX) gehört.

A



B

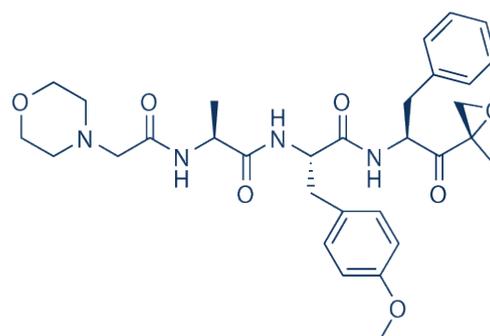


Abb. 1.3: **Chemische Struktur von BZ (A) und ONX (B)** (Quelle: Selleckchem.com)

1.5.1. *Bortezomib*

BZ ist ein Borsäure-Dipeptid-Derivat der Pyrazinsäure. Es hemmt reversibel die $\beta 5$ -Untereinheit des konstitutiven Proteasoms. Hierfür bindet die Borsäure-Gruppe an die Threonin-Hydroxyl-Gruppe des aktiven Zentrums der $\beta 5$ -Einheit und blockiert die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 26S-Proteasoms (Borissenko und Groll 2007).

BZ verteilt sich nach i.v. Applikation innerhalb von 10 min in den meisten Geweben, überwindet bei der Verteilung innerhalb des Organismus die Blut-Hirn-Schranke jedoch nicht (Hemeryck et al. 2007, Dou and Zonder 2014, Foran et al. 2016). Das Ausmaß der Proteasom-Inhibition ist dosisabhängig (Aghajanian et al. 2002, Papandreou et al. 2004). Die maximale Inhibition erfolgt nach 1 h, nach 72 h erreicht die Proteasom-Aktivität

wieder ein reguläres Level (Orlowski et al. 2002). BZ wird über oxidative Deboronierung im Cytochrom-P450-System der Leber zu seinen Metaboliten abgebaut (Pekol et al. 2005).

Die hohe Wirksamkeit von BZ gegen das MM wurde in mehreren klinischen Studien bewiesen (Jagannath et al. 2004, Jagannath et al. 2008, Richardson et al. 2003, Richardson et al. 2009). Mehrere molekulare Mechanismen tragen hierbei zu seiner antitumorösen Wirkung bei (Adams 2004, Mitsiades et al. 2005):

- Induktion der Apoptose
 - Duale Apoptose-Induktion über i) mitochondriale Ausschüttung von Cytochrom C und Aktivierung von Caspase 9 sowie ii) Aktivierung der Jun-Kinase und des Fas-Caspase-8-abhängigen proapoptotischen Signalweges (Mitsiades et al. 2002, Hideshima et al. 2001),
 - Induktion von ER-Stress durch akkumulierende Proteine bei gleichzeitiger Hemmung einer effektiven UPR (*unfolded proteins response*) (Lee et al. 2003),
 - Vermehrte Transkriptionsaktivität von AP1 und c-Myc und dadurch vermehrte Expression des Todesrezeptors Fas und Fas-Ligand (Mitsiades et al. 2002),
 - Stabilisierung/Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung (Hideshima et al. 2003, Williams und McConkey 2003),
 - Beeinträchtigung von Gen-Reparatur durch Spaltung von DNS-Proteinkinasen (Hideshima et al. 2003),
- Suppression der Anti-Apoptose
 - Verminderung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und XIAP (Mitsiades et al. 2002),
 - Blockade von NFκB als Überlebens- und Resistenzfaktor gegen DNS-zerstörende Chemotherapeutika (Mitsiades et al. 2005),
- Hemmung des Tumorwachstums von MM-Zelllinien (LeBlanc et al. 2002, Hideshima et al. 2001), u.a. durch Beeinflussung des IGF-1-Signalweges (Mitsiades et al. 2002),
- Wirkung auf Transkriptionsfaktoren
 - Blockade von NFκB durch Inhibition der Degradation von IκB (Kalogeris et al. 1999, Hideshima et al. 2001) und damit Einflussnahme auf darauf folgende Signalkaskaden,

- Beeinflussung des Knochenmark-Mikroenvironments
 - Verminderung der NFκB-abhängigen IL-6 Ausschüttung aus dem Knochenstroma und damit verminderte Bindung von MM-Zellen an BMSCs (Hideshima et al. 2001),
 - Inhibition der Osteoklastogenese (Metzler et al. 2007),
- Zellzyklus-Arrest
 - durch Stabilisierung von Zellzyklus-Proteinen (Adams et al. 1999, Shah et al. 2001),
- Überwindung von Therapie-Resistenzen
 - Synergistische Effekte mit anderen Chemotherapeutika (van Rhee et al. 2010),
 - Sensitivierung von MM-Zellen für andere Chemotherapeutika (Hideshima et al. 2003, Mitsiades et al. 2003),
- Anti-Angiogenese in Tumorzellen (Oikawa et al. 1998, Drexler et al. 2000, LeBlanc et al. 2002).

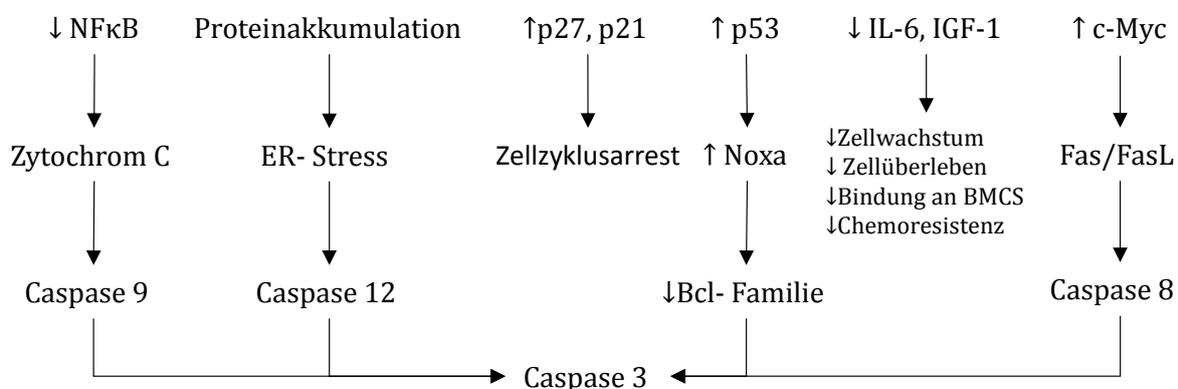


Abb. 1.4: **Apoptotische Wirkung der Proteasom-Inhibition**, modifiziert nach Almond und Cohen 2002, Adams 2004, Mitsiades et al. 2005.

Wie in Abb. 1.4 dargestellt bewirkt BZ die Apoptose nicht nur auf direktem Weg über intrinsische und extrinsische Kaskaden, sondern führt auch zur Suppression von anti-apoptotischen Signalen.

Zellen des MM sind sensitiver für die Proteasom-Inhibition als gesundes Gewebe (LeBlanc et al. 2002). Tumorzellen sind per se aufgrund ihrer gesteigerten Proliferationsrate anfälliger für die Proteasom-Inhibition (Drexler 1997). Da in

Tumorzellen die Mechanismen der Replikationskontrolle beeinträchtigt sind, kann BZ durch Verhinderung der DNA-Reparatur effektiver angreifen als in Zellen mit intakter Zykluskontrolle. Des Weiteren ist IL-6 als Wachstums- und Überlebensfaktor spezifisch in MM-Zellen bekannt (Barut et al. 1992, Kawano et al. 1988). Als Folge seiner Reduktion kommt es zur Verringerung der IL-6 vermittelten Chemoresistenz, zu einer erschwerten Bindung von MM-Zellen an BMSCs und zu vermindertem Zellwachstum (Hideshima et al. 2001). Das Protoonkogen c-Myc kann durch Mutationen in MM-Zellen dysreguliert und so in späten Krankheitsstadien vermehrt exprimiert sein (Shou et al. 2000). BZ trägt durch weitere Aktivitätssteigerung von c-Myc zur Induktion von proapoptotischen Effekten bei (Mitsiades et al. 2002). Ein weiterer erwünschter Effekt von BZ ist seine synergistische Wirkung mit Chemotherapeutika anderer Substanzklassen u.a. durch Chemo-Sensitivierung von MM Zellen (Mitsiades et al. 2003, van Rhee et al. 2010).

Diese Beobachtungen implizieren eine tolerable Toxizität von BZ. Im Tierversuch wird jedoch deutlich, welche eine hohe toxische Potenz BZ besitzt. Bei Nagetieren und Affen wurde eine geringe therapeutische Breite zwischen der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) von 0.6 mg/m² und der letalen Konzentration von ≥ 0.9 mg/m² festgestellt (Bross et al. 2004). Die dosislimitierende Nebenwirkung der BZ-Therapie bei MM-Patienten ist die periphere Neuropathie (PN). Sie tritt bei 35 % der Patienten neu nach Therapiebeginn auf oder verschlechtert eine bereits bestehende Symptomatik. Der Schweregrad ist dosisabhängig (Richardson et al. 2006). Die Beschwerden umfassen Sensibilitätsstörungen, motorische Beeinträchtigung und neuropathischen Schmerz (Richardson et al. 2009). Ein ursächlicher Mechanismus konnte noch nicht identifiziert werden. Off-target-Effekte wie Störungen der Calcium-Homöostase (Landowski et al. 2005), genetische Disposition (Broyl et al. 2010) und Autoimmunprozesse scheinen eine Rolle zu spielen (Miltenburg und Boogerd 2014). Im Maus-Modell konnte eine Reduktion der myelinisierten Nervenfasern mit daraus folgender funktioneller Beeinträchtigung gezeigt werden (Bruna et al. 2010). Auch bei Affen wurde eine Demyelinisierung der dorsalen Ganglien, peripherer Nerven und des Rückenmarks beobachtet (Bross et al. 2004). Eine vermehrte Ausschüttung von Zytokinen scheint besonders sensorische Nervenzellen zu beeinträchtigen (Ale et al. 2014). Die Formierung von ubiquitinierten Protein-Aggregaten (UPA) scheint spezifisch für die Proteasom-Inhibitor induzierte PN zu sein (Csizmadia et al. 2010), was im Gegensatz zu vorherigen Beispielen für einen on-target-Effekt spricht. Auch die Aktivierung von

Astrozyten durch BZ scheint eine Ursache für die Hypersensitivität nach mechanischen Stimuli zu sein (Robinson et al. 2014).

In den meisten Fällen ist die PN nach Beendigung der Therapie reversibel (Richardson et al. 2009). Die subkutane Gabe von BZ und auch die Dosisreduktion können das Auftreten der PN verringern (Moreau et al. 2011, Jagannath et al. 2004). Dennoch ist sie ein nicht zu unterschätzender sozio-ökonomischer Einflussfaktor. Darunter leidende Patienten geben körperliche Benachteiligung, emotionalen Stress und soziale Beeinträchtigung als Ursache für Einschränkungen der Lebensqualität im Alltag an (Bakitas 2007). Auch die Kosten, die durch den Arbeitsausfall von Patienten mit PN im Gesundheitswesen entstehen, sind jährlich um 25% höher als in Kontrollgruppen (Pike et al. 2012).

Eine weitere Limitation erfährt BZ durch die Ausbildung von Resistenzen der MM-Zellen gegen die Medikation oder gar das Nicht-Ansprechen von Patienten. Als ursächliche Mechanismen sind hier Genmutationen in kodierenden Abschnitten der $\beta 5$ -Untereinheit des 20S-Proteasoms (Lü et al. 2008), die Aktivierung von Hsp27 (Chauhan et al. 2003) und die Überexpression der $\beta 5$ -Untereinheit zu nennen (Oerlemans et al. 2008).

Obwohl BZ ein sehr effektives Chemotherapeutikum in der Behandlung des MM darstellt, ist die Weiterentwicklung spezifischerer Substanzen mit verbessertem Sicherheitsprofil und unter Umgehung der Resistenzmechanismen essentiell. Der selektive Immunoproteasom-Inhibitor ONX stellt einen erfolgversprechenden Kandidaten für neuartige Chemotherapien dar.

1.5.2. ONX-0914

Der Immunoproteasom-Inhibitor ONX gehört zur Gruppe der Epoxyketone. Der bisher bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das seit 2015 in Europa zugelassene Carfilzomib. Es erwies sich bereits als potentes Chemotherapeutikum in der Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen, sowie bei neu diagnostiziertem und refraktärem MM (O'Connor et al. 2009, Sonneveld et al. 2015, Stewart et al. 2015). Es wurde gezeigt, dass Carfilzomib die BZ-induzierte Chemoresistenz von B-Zellen überwinden kann und im refraktären Stadium der Krankheit sogar der BZ-Behandlung überlegen ist (Verbrugge et al. 2013, Dimopoulos et al. 2016). Auch für Oprozomib, ein oral verfügbares Struktur analogon zu Carfilzomib, konnte bereits die Wirksamkeit auf

humane MM-Zelllinien in vitro und in vivo gezeigt werden (Chauhan et al. 2010). ONX ist aus der Gruppe der Epoxyketone jedoch der spezifischste Immunoproteasom-Inhibitor, da es 20 bis 40-fach selektiver an die $\beta 5i$ / LMP7 Untereinheit des Immunoproteasoms als an die $\beta 5$ Untereinheit des konstitutiven Proteasoms bindet (Muchamuel et al. 2009). Es blockiert irreversibel das N-terminale Ende von Threonin im katalytisch aktiven Zentrum des Proteasoms. Die vergrößerte S1-Tasche der $\beta 5i$ Untereinheit macht diese Interaktion möglich (Huber et al. 2012).

Das Immunoproteasom, speziell seine $\beta 5i$ -Untereinheit, befindet sich immer noch in der biochemischen und strukturellen Evaluation (Huber et al. 2016). Selbiges gilt für seine irreversiblen Epoxyketon-basierten Inhibitoren wie ONX (Huber et al. 2015). Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass ONX als Immunmodulator fungieren kann. In tierischen Krankheitsmodellen der Hashimoto-Thyreoiditis (Nagayama et al. 2012), des systemischen Lupus erythematodes (Ichikawa et al. 2012), der Graft-versus-Host-Reaktion (Zilberberg et al. 2015) sowie der Colitis (Basler et al. 2010) und der Arthritis (Muchamuel et al. 2009) wurden ein Regress der Symptome mittels Immunoproteasom-Inhibition durch ONX erreicht. Auch in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (Basler et al. 2014) und dem Guillain-Barré-Syndrom (Liu H et al. 2017) zeigte ONX seine Wirksamkeit. Im Tiermodell verringerte es Symptome bei Konzentrationen von weniger als einem Zehntel der MTD und bietet damit ein therapeutisches Fenster, das durch unselektive Proteasom-Inhibitoren nicht erreicht werden kann (Groettrup et al. 2010). Sein anti-inflammatorischer Effekt ist durch die Reduktion der Immunantwort und Verhinderung eines Zytokinsturms bedingt (Althof et al. 2018). In humanen Lymphozyten und Monozyten blockiert es die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-27, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$), inhibiert die LMP7-spezifische Antigenpresentation und verhindert die Differenzierung von TH17-Helferzellen. Somit scheint es sowohl die frühe T-Zellaktivierung als auch die Zytokin getriggerte T-Zellentwicklung zu unterbinden (Muchamuel et al. 2009). Die Wirkung der LMP7-Inhibition auf die Balance zwischen TH17-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen spielt hierbei eine besondere Rolle und weist auf das Immunoproteasom als Therapieziel von Autoimmunkrankheiten hin (Kalim et al. 2012). Ähnlich wie Carfilzomib steht ONX im Verdacht die BZ-induzierte Chemoresistenz überwinden zu können (Verbrugge et al. 2013). Für den zweiten bekannten LMP7-Inhibitor, PR-924, konnte bereits die Wirksamkeit auf das Wachstum von MM-Zellen gezeigt werden (Singh et al. 2011). Hinweise auf ein verbessertes Sicherheitsprofil von

Immunoproteasom-Inhibitoren liefert eine Arbeit von Kuhn et al. Die Blockierung des Immunoproteasoms in Dosierungen, die effizient suppressiv auf hämatologische Tumorzellen wirken, wies eine geringere Toxizität auf neuroektodermales Gewebe in Vergleich zu BZ auf (Kuhn et al. 2009). ONX kann daher ebenfalls als vielversprechendes neues therapeutisches Agens in der MM-Therapie betrachtet werden. ONX wurde bisher nicht funktionell mit BZ verglichen, weder in seiner Antitumor-Aktivität noch in seiner Neurotoxizität.

1.6. Zielvorstellung

Durch einen Wirkmechanismus, der explizit nur das Immunoproteasom hemmt, bietet ONX die Möglichkeit verminderter off-target-Effekte im Vergleich zur unspezifischen Proteasom-Inhibition durch BZ. Bisher wurde die Neurotoxizität von ONX weder evaluiert noch mit der von BZ verglichen.

Ziel dieser Arbeit war es (i) neurotoxische Effekte von BZ und ONX aufzudecken, sowie (ii) die Wirkung beider Pharmaka auf Zellzahl, Synapsendichte und Proteinexpression zu ermitteln und (iii) diese auf ihre Abhängigkeit von Dosis und Behandlungszeit zu untersuchen. Hierfür wurden neuronale Zellen aus Primärkulturen der Ratte mit verschiedenen Konzentrationen beider Wirkstoffe für 24 h oder 48 h behandelt und anschließend zur Analyse aufbereitet. Durch Immunzytochemie konnten die Zellstruktur, die Zellzahl und die Synapsendichte mikroskopisch sichtbar gemacht und qualitativ sowie quantitativ erfasst werden. Effekte der Behandlung der Zellkulturen mit BZ und ONX auf die Expression ausgewählter Proteine wurden durch Western-Blot-Analyse charakterisiert. Zusammengefasst sollten die Befunde toxische Effekte von BZ und ONX auf neuronale Zellkulturen dokumentieren, ihre Wirkung auf Zellintegrität und Zellbiochemie miteinander vergleichen, sowie möglicherweise eine geringere Toxizität von ONX auf neuronales Gewebe bestätigen.

2. Material und Methoden

Zur Ermittlung der Wirkung der Proteasom-Inhibitoren BZ und ONX auf neuronale Zellkulturen wurde sich verschiedener etablierter Methoden bedient. Dazu zählen proteinbiochemische Analysen mittels SDS-PAGE und Western Blot und immunzytochemische Färbungen mit anschließender Erfassung durch ein konfokales Laserscanmikroskop.

2.1. Material

2.1.1. *Tiere*

Für die Herstellung primärer kortikaler Zellkulturen wurden Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Wistar verwendet. Da die Tiere ausschließlich der Präparation von Zellkulturen dienten, war kein gesonderter Tierversuchsantrag notwendig. Eine entsprechende Genehmigung lag vor. Die Zucht und Haltung erfolgte nach Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes im Gebäude des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Die Tiere wurden in Käfigen mit Wasser und Futter ad libitum gehalten. Der Tag-und Nacht-Rhythmus betrug 12 h, die Raumtemperatur lag bei 21 °C.

2.1.2. *Chemikalien*

Die meisten verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Bio-Rad, Invitrogen, Merck, Gibco, Roth, Sigma-Aldrich und Roche. Die Substanzen sind zu Beginn des Absatzes der jeweiligen Methode genannt. Spezielle Substanzen anderer Hersteller sind gesondert gekennzeichnet. Für die biochemischen Experimente wurde Roth-Wasser und für die Puffer zweifach destilliertes Wasser (ddH₂O) aus dem Milli Q-System von Millipore verwendet.

2.1.3. Proteasom-Inhibitoren

Die Proteasom-Inhibitoren BZ und ONX wurden von der Firma Selleckchem Chemicals (USA) bezogen und in einer 10 mM Stock-Lösung aufbewahrt. Aufgrund der Lösungseigenschaften der Stoffe wurde laut Herstellerempfehlung 100 %-iges DMSO von Sigma zur Solubilisierung verwendet.

2.1.4. Antikörper

Die für die einzelnen Experimente benötigten Antikörper sind mit der erforderlichen Verdünnung und Anwendung in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 aufgeführt.

2.1.4.1. Primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Klonalität</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Methode</i>	<i>Hersteller</i>
α -AMPA Rez.	rb	mono	1:2000	WB	Cell Signaling
α - β -Aktin	ms	mono	1:5000	WB	Sigma-Aldrich
α -Caspase 3	rb	poly	1:1000	WB	Cell Signaling
α -CREB	rb	mono	1:2000	WB	Cell Signaling
α -GFAP	chk	poly	1:10000 1:1000	WB IF	abcam
α -Iba 1	gt	poly	1:500	WB	abcam
α -MAP2	ms	mono	1:1000	IF	Sigma-Aldrich
α -phospho NF κ B p65	rb	mono	1:5000	WB	Cell Signaling
α -Synaptophysin 1	gp	poly	1:10000 1:2000	WB IF	Synaptic Systems
α -phospho-CREB	rb	mono	1:2000	WB	abcam
α -PSMA 6	rb	poly	1:1000	WB	Invitrogen

Tab. 2.1: **Primäre Antikörper** (rb: Kaninchen; ms: Maus; chk: Huhn; gt: Ziege; gp: Meerschweinchen; IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot)

2.1.4.2. Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Methode</i>	<i>Hersteller</i>
α -rb IgG Peroxidase konjugiert	do	1:7500	WB	Dianova
α -ms IgG Peroxidase konjugiert	gt	1:7500	WB	Dianova
α -chk IgG Peroxidase konjugiert	gt	1:7500	WB	Dianova
α -gp IgG Peroxidase konjugiert	do	1:7500	WB	Dianova
α -gt IgG Peroxidase konjugiert	do	1:7500	WB	Dianova
α -ms IgG, Alexa Flour® 488	do	1:2000	IF	Invitrogen
α -chk IgG, Alexa Flour® 647	do	1:1500	IF	Jackson Immunoresearch
α -gp IgG, Cy™3	do	1:2000	IF	Jackson Immunoresearch

Tab. 2.2: **Sekundäre Antikörper** (do: Esel; gt: Ziege)2.2. **Methoden**2.2.1. ***Herstellung und Kultivierung kortikaler Primärkulturen***

- NB+ Medium: Neurobasal Medium, B-27, 200 mM L-Glutamin

Die Tötungen der Muttertiere, Embryonenentnahme und Präparation der Primärkulturen wurden von Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie mit zertifizierter Qualifikation zur Durchführung von Tierversuchen vorgenommen.

Es wurden primäre kortikale Zellkulturen nach Banker und Goslin aus Embryonen im Entwicklungsstadium E18 hergestellt (Banker und Goslin 1988). Die Zellen wurden auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen einer 24-well Platte mit einer Dichte von 20×10^3 Zellen/well für die Immunfluoreszenzfärbungen ausgesät. Für biochemische Analysen wurden Zellen mit einer Dichte von 500×10^3 Zellen/well einer 6-well Platte oder mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen je Zellkulturflasche (75 cm^2) ausgesät. Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37 °C und 5% CO_2 -Gehalt kultiviert.

2.2.2. *Behandlung kortikaler Primärkulturen*

- BZ: 10 mM in DMSO
- ONX: 10 mM in DMSO
- DMSO

Die Behandlung der Zellkulturen erfolgte am 14. Tag in vitro (DIV 14). Zunächst erfolgte in ersten Untersuchungen die Behandlung mit beiden Inhibitoren für 1 h, 3 h, 24 h und 48 h in den Konzentrationen 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M und 2.0 μ M. Anschließend wurden für BZ und ONX unterschiedliche experimentelle Bedingungen festgelegt. Für BZ-Behandlungen wurden Konzentrationen von 0.001 μ M bis 0.5 μ M und für ONX-Behandlungen von 0.01 μ M bis 0.5 μ M gewählt. Diese Behandlungen erfolgten jeweils für 24 und 48 h. Stets wurde eine unbehandelte Kontrolle (Leerkontrolle) und eine DMSO-Kontrolle unter identischen Bedingungen mitgeführt. Die Verdünnung erfolgte frisch in NB+ Medium durch eine Verdünnungsreihe.

2.2.3. *Immunzytochemie*

- 1 x PBS pH 7.4: 37 mM NaCl, 4.3 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄
- PBS-MC: 1mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂ in 1 x PBS pH 7.4
- PLP-Fix: 16 % (w/v) Paraformaldehyd (Alfa Aesar), Lysin-Phosphat-Puffer (0.2 M Lysin-HCl in ddH₂O, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.2 M Phosphat-Puffer pH 7.4), 540 mg D-Glucose, 85 mg NaIO₄ (McLean und Nakane 1974)
- 20 % (v/v) Triton X-100
- B-Block: 10 % (w/v) Pferdeserum, 5 % (w/v) Sucrose, 2 % (w/v) BSA in 1 x PBS pH 7.4
- Polyvinylalkohol Mowiol® pH 8.5

Nach Behandlung mit den Inhibitoren für 24 h bzw. 48 h wurde das Medium abgesaugt und die Deckgläschen mit den kortikalen Zellkulturen mit 500 μ l PBS-MC gespült. Dann wurden die Zellen mit 300 μ l PLP-Fix für 30 min bei RT fixiert und anschließend 3 x 10 min mit 1 x PBS gewaschen, sowie mit B-Block + 0.2 % Triton für 1 h bei RT inkubiert

um unspezifische Bindungen der Antikörper zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen 3 x 10 min mit 1 x PBS + 0.2 % Triton gewaschen und anschließend für 1.5 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen 2 x 10 min mit 1 x PBS + 0.2% Triton und 1 x 10 min mit 1 x PBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen in ddH₂O gespült und die fixierten und gefärbten Zellen mit Mowiol® auf Objektträgern eingedeckelt.

2.2.4. Mikroskopie

Die Beurteilung und Analyse der kortikalen Zellkulturen nach Fluoreszenzfärbung erfolgte mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop von Carl Zeiss® Jena (LSM 710). Die Wellenlänge der Exzitation wurde entsprechend der verwendeten Fluorophore gewählt. Für die Analyse der Morphologie und die Quantifizierung der Synaptophysin-Signale wurde ein 63er Objektiv, für die Quantifizierung der Zellzahl ein 20er Objektiv gewählt. Das Optovar betrug stets 1.0. Die Aufnahme erfolgte mit der ZEN-lite 2012 Software als Stapel-Aufnahme, aus der eine Projektion der maximalen Intensitäten erstellt wurde. Innerhalb eines Experiments wurde der Aufnahmemodus beibehalten um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

2.2.5. Qualitative und quantitative Analyse der Primärkulturen

Die Betrachtung und Aufnahme der Zellen für die Festlegung pharmakologischer Grenzwerte erfolgte in höherer Vergrößerung. Veränderungen der Zellstruktur wurden dokumentiert und als morphologische Merkmale erfasst. Die Begriffe NOAEL (no observed adverse effects level), LOAEL (lowest observed adverse effect level) und LC (lethal concentration) wurden auf das Kultursystem übertragen und entsprechend der Zellvitalität den jeweiligen Dosierungen zugeordnet. Um die Zellzahl zu quantifizieren wurden 40 Bildausschnitte je Bedingung aufgenommen. Die Zählung erfolgte manuell mit der Software Photoshop Version 5. Die absoluten Werte wurden prozentual auf die Leerkontrolle bezogen. Für die Quantifizierung des Synaptophysin-Signals wurden große, vereinzelte Neurone mit einem gut erkennbaren Hauptdendriten, der nicht von anderen Dendriten überlagert wurde, aufgenommen. Je Kondition wurden 15-16 Zellen

fotografiert. Die Bilder wurden in der ImageJ Software Version 1.49m mit Fiji-Erweiterung bearbeitet (Schindelin et al. 2012). Der Hauptdendrit wurde mit dem Linienwerkzeug verfolgt und begradigt. Es wurde ein Ausschnitt erstellt, der die Synaptophysin-Signale als binäres Bild enthielt. In ImageJ 1.26 wurde mit dem Plugin punctae analyzer (Ippolito und Eroglu 2010) für jedes Experiment ein Schwellentonwert und die einzubeziehende Pixelgröße der Synapsen festgelegt und die erfassten punctae gezählt. Die Werte wurden prozentual auf die Leerkontrolle bezogen.

2.2.6. Proteinextraktion aus behandelter kortikaler Primärkultur

- 1 x PBS pH 7.4
- PBS-MC: 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂ in 1 x PBS pH 7.4
- 50 x Protease-Inhibitor Tabletten in Roth-Wasser (PI)
- 10 x Phospho-Stopp Tabletten in Roth-Wasser (PS)
- Benzonase Nuclease
- Ernte-Puffer: 1 x PBS pH 7.4, 1 x PI, 1 x PS, 0.33 µl Benzonase je ml Puffer
- 4 x Sodium-dodecyl-sulfat (SDS) Probenpuffer: 1 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 250 mM TRIS pH 6.8, 0.004 % (w/v) Bromphenolblau

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden mit PBS-MC gespült. Mit einem Zell-Kratzer wurde der Zellrasen in 250 µl Ernte-Puffer entnommen und in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proben wurden mittels Vortexer gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und 83 µl 4 x SDS hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben 10 min im Heizblock bei 95 °C erhitzt und für 10 min bei 4 °C mit 21130 x g zentrifugiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

2.2.7. Amidoschwarz Test

- 2 % (w/v) Bovines Serum Albumin (BSA)
- Methanol-Essigsäure: 10 % (v/v) Essigsäure in Methanol
- Färbelösung: 1.44 % (v/v) Amidoschwarz in 9:1 Methanol-Essigsäure
- 0.1 M NaOH

Der Amidoschwarz Test dient zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Proteinextrakten (Klenikova und Pevzner 1979, Wilson 1979).

Für die Eichreihe wurde eine Proteinstammlösung aus 200 µl BSA und 600 µl Roth-Wasser bereitet und in folgendem Verhältnis mit ddH₂O in Dreifachbestimmung aufgetragen (Tab. 2.3).

<i>Proteingehalt in µg</i>	0	2	4	8	12	16	20
<i>Stammlösung in µl</i>	0	4	8	16	24	32	40
<i>ddH₂O in µl</i>	100	96	92	84	76	68	60

Tab. 2.3: **Zusammensetzung des BSA-Standards in der Eichreihe**

Die aufgetauten Proben wurden vor jeder Verwendung mittels Vortexer gemischt, für 2 min bei 95 °C erhitzt und für 10 min auf höchster Stufe zentrifugiert. Je Probe wurden 5 µl in 95 µl ddH₂O in Dreifachbestimmung aufgetragen.

Eichreihe und Proben wurden mit 200 µl Färbelösung bei RT für 10 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300 µl Methanol-Essigsäure erneut zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt, der Überstand nochmals verworfen und das Pellet für 20 min bei 37 °C getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet mit 300 µl NaOH für 30 min gelöst und die Extinktion bei 620 nm in einem Photometer nach Lambert-Beer gemessen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.8. *Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

- Trenngelpuffer: 1.8 M Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS) pH 8.8
- Sammelgelpuffer: 0.5 M TRIS pH 6.8
- 1 x SDS Probenpuffer: 62.5 mM TRIS pH 6.8, 0.25 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.001 % (w/v) Bromphenolblau
- Marker: Page Ruler Protein Ladder (Thermo Scientific)
- 1 x Elektrophorese Puffer: 25 mM TRIS pH 8.3, 192 mM Glyzin, 0.1 % (w/v) SDS
- Coomassie Brilliant Blau: 0.05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol in ddH₂O
- Coomassie-Entfärbelösung: 7 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol in ddH₂O
- Gel-Trocknungs-Lösung: 50 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Glycerol in ddH₂O
- Zellophan-Folie

Mittels Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli werden Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt (Gallagher 2007). Für die SDS-PAGE wurden 5 % bis 20 % Gradientengele verwendet; ihre Zusammensetzung ist der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die Gele wurden mit 20 μ g Protein je Probe beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 12 mA je Gel in einem Hoefer Mighty Small System SE250 (Amersham Biosciences).

Mit jeder Probe wurde einmalig eine Coomassie-Färbung durchgeführt (s. Abb. 2.1). Hierfür wurden die Gele nach SDS-PAGE in Coomassie Brilliant Blau nach kurzem Erhitzen für 30 min gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung 30 min entfärbt. Das Gel wurde anschließend 10 min in Trocknungs-Lösung gelagert und in Zellophan eingebettet. Dies erlaubte eine qualitative Erfassung des Proteingehaltes und diente als Bezugsgröße für die spätere quantitative Auswertung (Wilson 1979).

		<i>Trenngel 5 %</i>	<i>Trenngel 20 %</i>	<i>Sammelgel</i>
<i>Trenngelpuffer</i>	ml	6.84	6.84	
<i>Sammelgelpuffer</i>	ml			6
<i>87 % Glycerol</i>	ml	1.8	7.2	5.52
<i>40 % Acrylamid</i>	ml	4.056	16.2	
<i>30 % Acrylamid</i>	ml			3.84
<i>0.2 M EDTA</i>	μl	316.8	316.8	240.1
<i>10 % SDS</i>	μl	316.8	316.8	240.1
<i>ddH₂O</i>	ml	18.94	1.392	7.92
<i>Bromphenolblau</i>	μl		48	
<i>Bromphenolrot</i>	μl			12
<i>10 % APS</i>	μl	115.2	72	148.2
<i>TEMED</i>	μl	21.6	21.6	18.2

Tab. 2.4: Zusammensetzung der 5-20 % Gradient-SDS-Polyacrylamidgele

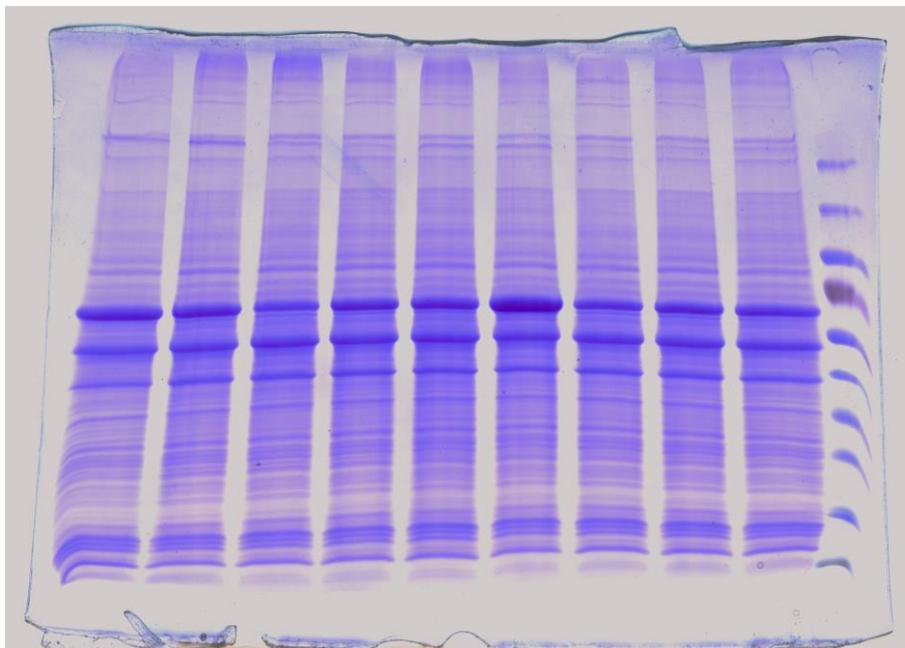


Abb. 2.1: 5-20 % SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie Brilliant Blau Färbung (Lane 1-9: Proteinproben, Lane 10: Page Ruler)

2.2.9. *Western Blot*

- 1 x Western Blot Transfer Puffer: 25 mM TRIS pH 9.3, 192 mM Glycin, 0.2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
- Nitrozellulose Membran: 0.22 µm, LI-COR® Biosciences GmbH
- Ponceau Färbelösung: 0,5 % (w/v) PonceauS, 3 % (v/v) Essigsäure in ddH₂O
- 1 x TBS (TRIS gepufferte Lösung): 20mM TRIS, 0.8 % (w/v) NaCl
- 1 x TBS-T: 1 x TBS Puffer, 0.1 % (v/v) Tween-20
- Blockierungspuffer: 5 % (w/v) BSA in 1 x TBS
- Elektrochemilumineszenz (ECL) Detektionslösung (Pierce®) und Extended Duration (DURA) Detektionslösung (Pierce®)

Durch den Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran können diese der Immuno-Detektion zugänglich gemacht werden (Towbin 2015, Burnette 2015).

Die Gele wurden auf Nitrozellulose Membran im Sandwich-Verfahren mit Filterpapier und Schaumstoff umschichtet und in die mit Transfer-Puffer gefüllte Kammer eingehängt. Die Gele wurden für 1.5 h mit 200 mA bei konstanter Temperatur von 4 °C und unter ständigem Rühren des Puffers geblottet. Anschließend wurden die Membranen mit Ponceau für 10 min gefärbt. Farbreste wurden mit ddH₂O entfernt, die Membranen über Nacht getrocknet und bis zur weiteren Verwendung in Färbeschalen bei 4 °C aufbewahrt. Als nächstes wurden die Membranen mit ddH₂O und 1 x TBS für jeweils 10 min gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit 5 % BSA in 1 x TBS blockiert. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper in Western Blot Schalen inkubiert. Am Folgetag wurde in vier Waschschritten mit 1 x TBS und 1 x TBS-T insgesamt 30 min gewaschen und der Blot für 2 h bei RT mit HRP-konjugiertem sekundären Antikörper (1:7500 mit 0.1 % BSA in 1 x TBS-T) der entsprechenden Spezies inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran mit 1 x TBS gespült und der Waschschriff wiederholt. Abschließend wurden die Proteinbanden mittels ECL- oder DURA-Detektionslösung in einem Odyssey Fc (LI-COR Biosciences® GmbH) mit Image Studio Software Version 2.1 bei einer Belichtungszeit von 10 min erfasst.

2.2.10. Signalquantifizierung der Proteinlevel im Western Blot

Die Quantifizierung der Chemilumineszenz-Intensitäten erfolgte ohne weitere Bildbearbeitung. Mit der LI-COR Images Studio Lite Software Version 5.0 wurden die detektierten Proteinbanden markiert und deren Graustufenwert ermittelt. Die Probensignale wurden auf das korrespondierende Coomassie-Gel normiert und der relative Prozentwert der Signale in Bezug auf die Leerkontrolle ermittelt.

2.2.11. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Inc., USA) statistisch ausgewertet. Die Zellzahlanalyse erfolgte mit einfacher ANOVA Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni-post-hoc Test. Die LC_{50} wurde durch Darstellung der Korrelation zwischen Inhibitor-Dosis und Neuronenzahl mittels einer *inhibitor-response-curve* mit nonlinearer Kurvenanpassung ermittelt. Für die Auswertung der Synaptophysin-Signale und die Analyse der Western-Blot-Signale wurde der t-Test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen verwendet. Zur Untersuchung des Verhältnisses von phospho-CREB zu CREB wurde der Mittelwert des Quotienten aus phospho-CREB und CREB mit dem Ein-Proben t-Test gegen den hypothetischen Wert 1 getestet. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Ein p-Wert von $p < 0.05$ galt in allen Quantifizierungen als signifikant.

Für die Proteinbiochemie wurden 3 unabhängige Experimente mit je 2–3 technischen Replikaten und für die immunzytochemischen Experimente 2–3 Experimente mit je 15–16 Replikaten (Synaptophysin) bzw. 40 Replikaten per Kondition (Zellzahl) in die Statistik einbezogen.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Proteasom-Inhibitors BZ und des Immunoproteasom-Inhibitors ONX-0914 auf neuronale Primärkulturen der Ratte untersucht. Die Experimente waren darauf ausgelegt, den Einfluss der Inhibitoren auf den Zellverband, die Zellstruktur und die Proteinhomöostase zu prüfen. Das Ziel war es, die toxischen Effekte beider Inhibitoren zu untersuchen, miteinander zu vergleichen und eine vermutete geringere Neurotoxizität von ONX nachzuweisen.

Es wurden unterschiedliche Effekte von BZ und ONX auf die Zellmorphologie, die Zellzahl, die Synapsendichte und die Proteinexpression festgestellt und analysiert.

3.1. Toxizität von DMSO

DMSO ist ein vielfach verwendetes Lösungsmittel, das als atoxisch gilt. Jedoch wurde gezeigt, dass DMSO dosisabhängig und schon bei geringen Konzentrationen Schädigungen neuronaler Zellen hervorruft (Hanslick et al. 2009, Galvao et al. 2014). Um eine eventuelle Beeinflussung der Zellkultur durch das verwendete Lösungsmittel DMSO auszuschließen, wurde es laut Empfehlungen des Stammdatenblattes der Firma Selleckchem in Konzentrationen unter 0.3 % angewendet.

In der immunzytochemischen Färbung zeigten sich nach 24 h und 48 h keine morphologischen Unterschiede zwischen unbehandelten Neuronen (Leerkontrolle) und Neuronen, die mit einer DMSO-Kontrolle behandelt wurden (Abb. 3.1). Im Western Blot konnte in keinem Fall ein signifikanter Unterschied der Proteinexpression nach DMSO-Behandlung zur Leerkontrolle festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). In der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die Absolutwerte daher stets auf die Leerkontrolle normiert.

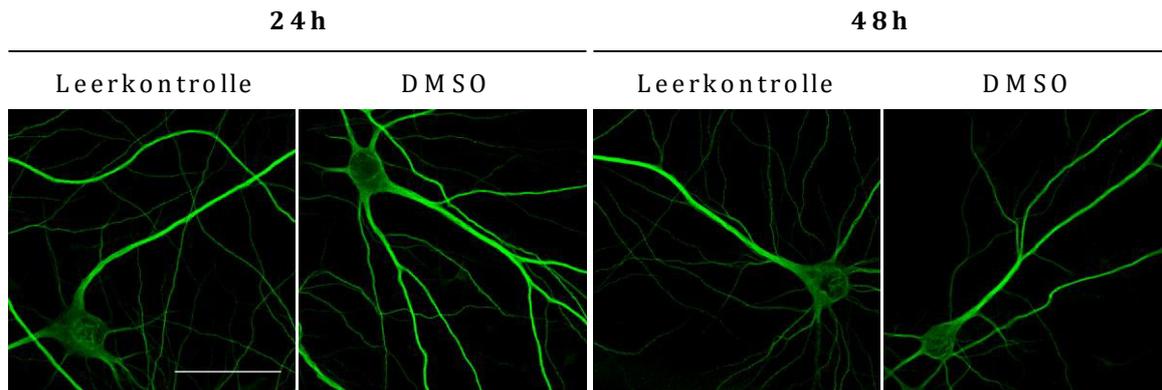


Abb. 3.1: **Vergleichende Immunfluoreszenzmikroskopie zwischen Leerkontrolle und DMSO-Kontrolle.**

Beispielhafte Aufnahmen MAP2-positiver Neurone ohne Behandlung (Leerkontrolle) und nach Behandlung mit DMSO für jeweils 24 und 48 h. Morphologisch unterschieden sich mit DMSO behandelte Neurone nicht von der Leerkontrolle. Maßstab 50 μm .

3.2. Neurodegeneration in der Zellkultur

Zunächst wurden die Zellkulturen mit beiden Inhibitoren in den Konzentrationen 0.1 μM , 0.5 μM , 1.0 μM und 2.0 μM für jeweils 1 h, 3 h, 24 h und 48 h behandelt und nach immunzytochemischer Färbung unter dem Mikroskop betrachtet. Nach Behandlung für 1 h und 3 h war bei keinem der beiden Inhibitoren ein Effekt auf die Zellen nachweisbar (Daten nicht dargestellt).

Nach 24h war jedoch eine toxische Wirkung beider Inhibitoren auf die Zellkultur zu erkennen. Nach Behandlung mit BZ in den Konzentrationen 0.1 μM , 0.5 μM , 1.0 μM und 2.0 μM kam es zu morphologischen Auffälligkeiten als Zeichen toxischer Schädigung (Abb. 3.2). Das Auftreten von Varikositäten war zu beobachten. Bei stärkerer Vergrößerung wurde eine Blasenbildung im Bereich der Zellmembran, ein sogenanntes blebbing, deutlich (Abb. 3.5). Die Stärke der MAP2-Färbung nahm in ihrer Intensität ab und die Färbung zeigte sich ungleichmäßiger über den Zellkörper verteilt. ONX führte nach dieser Behandlungsdauer erst in den Konzentrationen 1.0 μM und 2.0 μM zu sichtbaren Veränderungen der Zellstruktur. Nach 48h kam es durch die Behandlung mit BZ in allen Konzentrationen zur Degeneration sämtlicher Zellen in der Kultur. Vereinzelt waren stark morphologisch veränderte Neurone auffindbar (Abb. 3.2). Nach ONX-

Behandlung mit 0.1 μM blieb die Zellkultur intakt (siehe auch Abb. 3.4). In höheren Konzentrationen kam es jedoch ebenfalls zum Zelltod.

Beide Pharmaka wiesen nach hohen Dosierungen und einer langer Behandlungszeit eine neurotoxische Wirkung auf. Aufgrund der unterschiedlich starken Effekte in den jeweils entsprechenden Konzentrationen konnte jedoch weiterhin von einer geringeren Toxizität von ONX im Vergleich zu BZ ausgegangen werden.

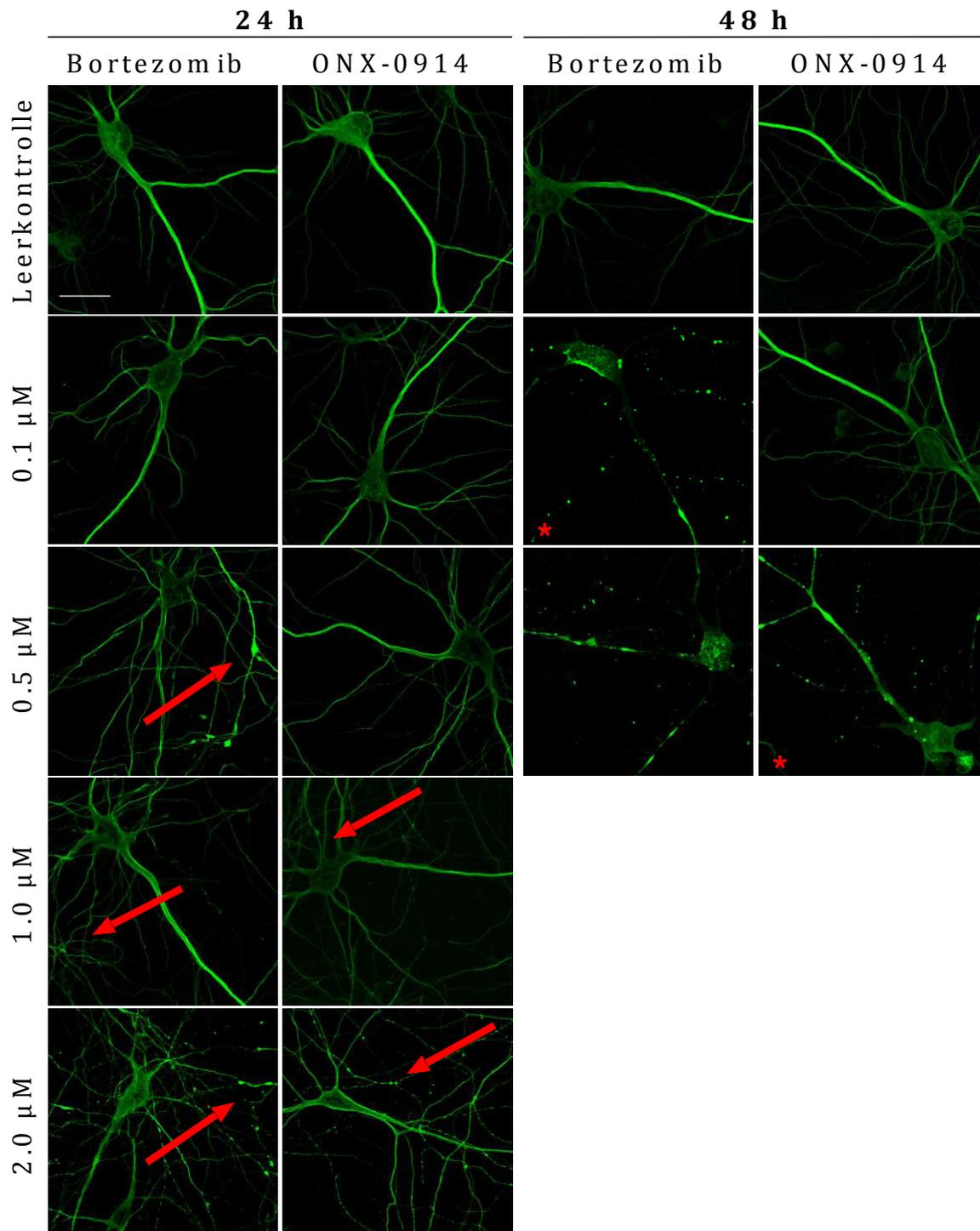


Abb. 3.2: **Map2-gefärbte Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h und 48 h.** Bereits nach 24 h zeigten mit BZ behandelte Zellen morphologische Auffälligkeiten (→), während es nach ONX-Gabe erst bei 1.0 µM und 2.0 µM zu einer sichtbaren Schädigung kam. Noch deutlicher wird die unterschiedliche Toxizität von BZ und ONX nach 48 h Behandlungszeit. BZ führte bei 0.1 µM zum Zelltod (*), ONX erst bei 0.5 µM. Maßstab 30 µm.

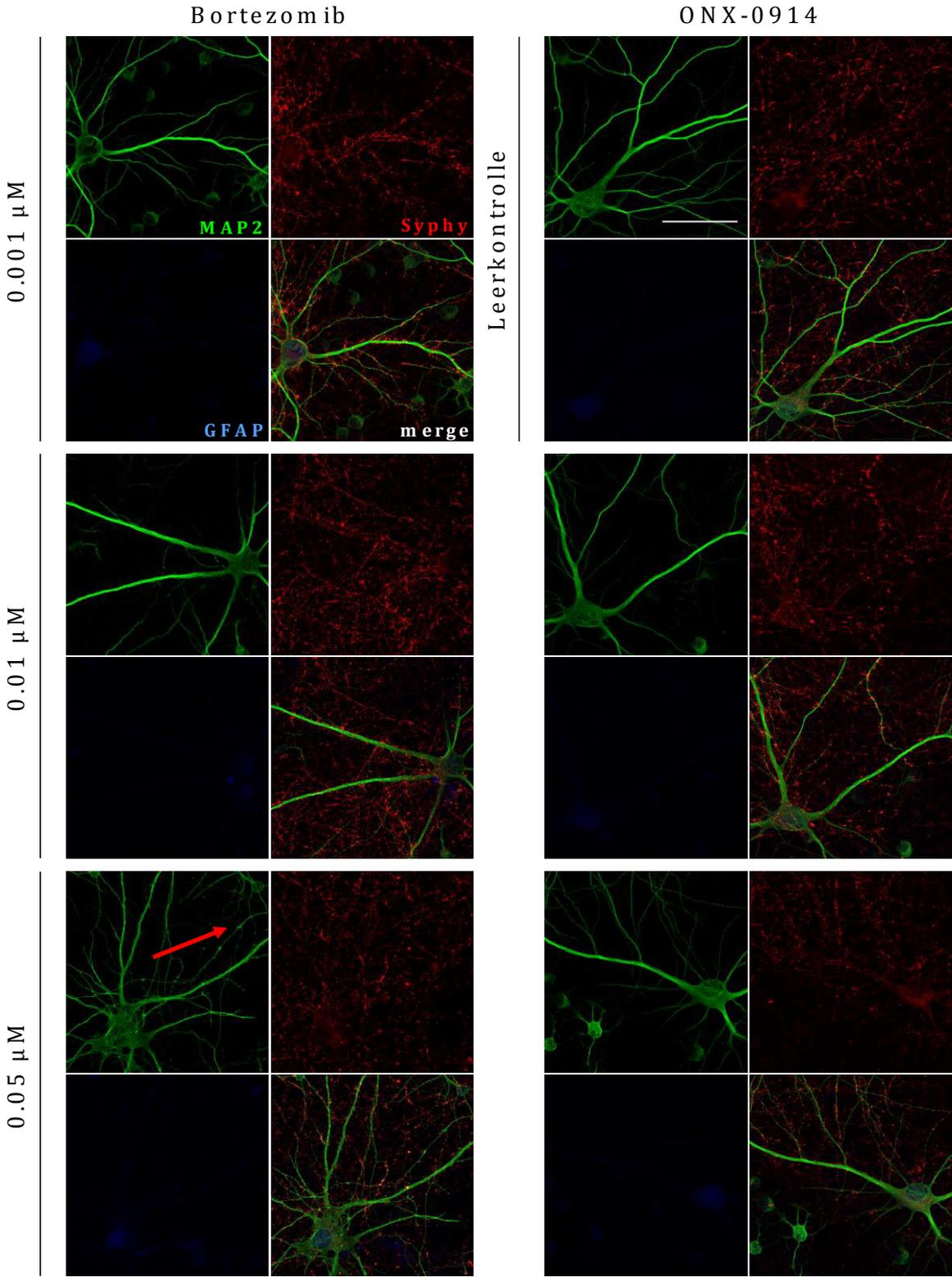
Für die weiteren immunzytochemischen Experimente wurden die Konzentrationen von BZ auf 0.001 μM , 0.005 μM , 0.01 μM , 0.05 μM , 0.1 μM und 0.5 μM verringert und für jeweils 24 h und 48 h auf die Zellkulturen angewendet.

Nach 24 h war in den Konzentrationen 0.001 μM , 0.005 μM (nicht dargestellt) und 0.01 μM kein toxischer Effekt von BZ nachweisbar (Abb. 3.3). Nach Behandlung in den Konzentrationen 0.05 μM , 0.1 μM und 0.5 μM wurden jedoch morphologische Veränderungen (\rightarrow) sichtbar. Es traten Varikositäten auf und die MAP2-Färbung zeigte sich ungleichmäßiger als bei der Leerkontrolle. Nach 48 h kam es durch Behandlung mit 0.01 μM BZ zu einer deutlichen Zellstrukturveränderung, welche bei 0.05 μM BZ noch stärker ausgeprägt war. In den Konzentrationen 0.1 μM und 0.5 μM waren keine intakten Zellkörper mehr vorhanden (Abb. 3.4). Es kam, wie bereits vorher gezeigt, zum kompletten Zelltod der gesamten Kultur (siehe auch Abb. 3.2).

Um weiterhin vergleichbare Konzentrationen von BZ und ONX analysieren zu können, wurden auch die Konzentrationen von ONX mit 0.01 μM , 0.05 μM , 0.1 μM und 0.5 μM angepasst und ebenfalls für 24 und 48 h auf die Zellkultur angewendet. Nach 24 h zeigte sich nach Behandlung der Neurone mit ONX kein morphologischer Unterschied zur Leerkontrolle (Abb. 3.3). Auch nach der Behandlung mit ONX für 48 h in den Konzentrationen 0.01 μM , 0.05 μM und 0.1 μM waren keine toxischen Effekte auf die Neurone nachweisbar (Abb. 3.4). Erst nach Behandlung der Zellen mit 0.5 μM kam es zum Zelltod in der gesamten Kultur (siehe auch Abb. 3.2).

Beide Pharmaka zeigten nach Verringerung der Dosierung in ihren jeweils niedrigsten Konzentrationen keine toxischen Effekte auf die Zellkultur. Eine toxische Wirkung von sowohl BZ als auch ONX auf neuronale Zellen konnte jedoch in höheren Konzentrationen und bei langer Behandlungszeit gesehen werden. Durch die Applikation des Proteasom-Inhibitors BZ war allerdings schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen eine Schädigung der Zellstruktur beobachtbar. Im Gegensatz dazu waren bei Steigerung der Konzentration von ONX zunächst keine morphologischen Auffälligkeiten zu sehen. Erst nach 48 h kam es durch Applikation von 0.5 μM ONX zum Zelltod der Kultur.

24 h Behandlung



24 h Behandlung

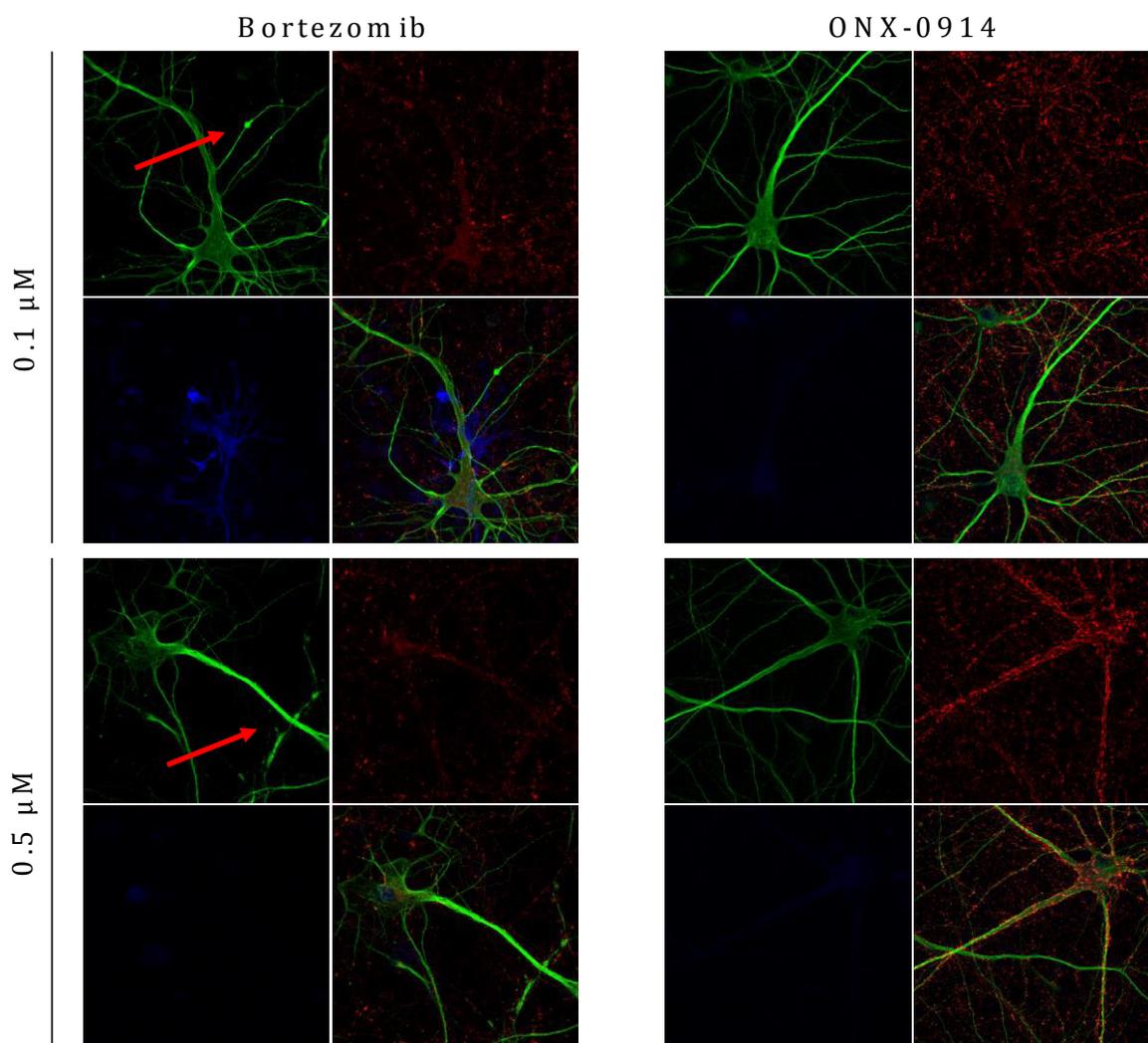
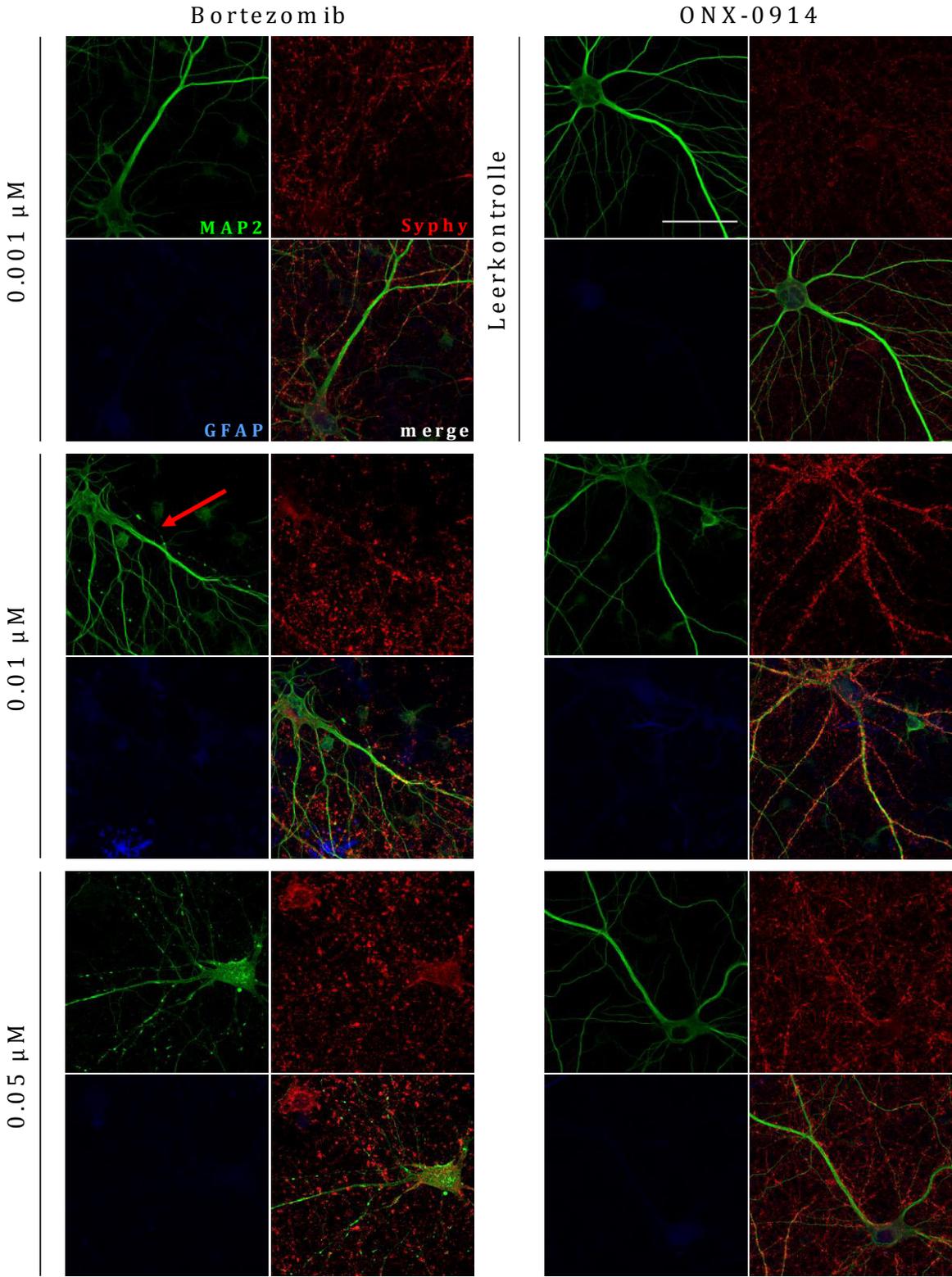


Abb. 3.3: Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h.

Darstellung repräsentativer Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX. Es erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen MAP2, Synaptophysin und GFAP. Während die Behandlung mit BZ schon bei 0.05 μM und höheren Konzentrationen zu sichtbaren Zellschäden führte, war ein solcher Effekt nach ONX-Gabe nicht erkennbar. Besonders die Färbung mit MAP2 ermöglichte das Erkennen morphologischer Auffälligkeiten als Korrelat toxischer Schädigung (→). Maßstab 50 μm.

48 h Behandlung



48 h Behandlung

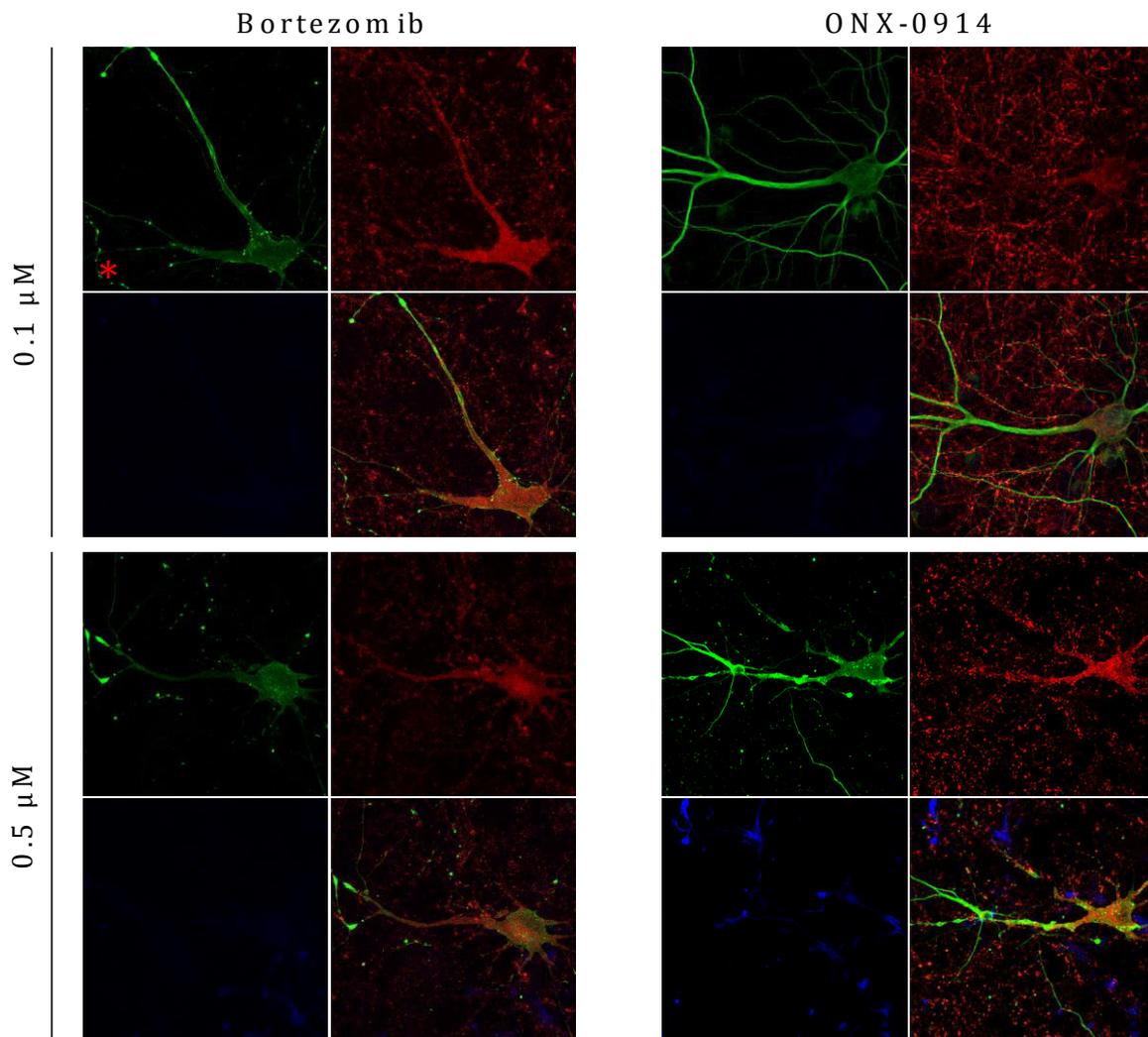


Abb. 3.4: Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX für 48 h.

Darstellung repräsentativer Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX. Außer in seiner geringsten Konzentration $0.001 \mu\text{M}$ war BZ toxisch für neuronale Zellen, sichtbar an den morphologischen Auffälligkeiten in der MAP2-Färbung (\rightarrow). ONX zeigte erst in der höchsten Konzentration von $0.5 \mu\text{M}$ toxische Effekte. Besonders deutlich wurde die unterschiedliche Toxizität von BZ und ONX nach Behandlung mit jeweils $0.1 \mu\text{M}$ (siehe auch Abb. 3.2). Mit BZ behandelte Neurone zeigten in dieser Konzentration starke Schädigungen (*), während nach ONX-Behandlung die strukturelle Integrität der Neurone vollständig erhalten blieb. Maßstab $50 \mu\text{m}$.

3.3. Veränderungen der Zellmorphologie

Die schon bei geringen Konzentrationen auftretenden morphologischen Veränderungen von neuronalen Zellen waren ein Hinweis auf neurotoxische Effekte von BZ und ONX (Abb. 3.3, Abb. 3.4). Es kam zur Bildung von Varikositäten, zu einem blebbing der Zellmembranen und zur Dendritenzerfaserung als sichtbares Korrelat des beeinträchtigten Zytoskeletts (Abb. 3.5). Die vollständige Retraktion der Dendriten war Merkmal des Zelltodes nach Behandlung mit höheren Konzentrationen. Entsprechend dazu veränderte sich die Verteilung von MAP2 in den Neuronen qualitativ. In der Leerkontrolle war MAP2 gleichmäßig durch Immunfluoreszenz detektierbar, die dendritischen Fortsätze zeigten sich deutlich gefärbt. Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen stellte sich die Färbung besonders in den Dendriten fragmentiert dar. Um bereits geringfügige morphologische Auffälligkeiten nachzuweisen, wurde daher ebenfalls die Struktur von Dendriten genauer betrachtet. Es wurden erneut Unterschiede hinsichtlich der Toxizität von BZ und ONX deutlich (Abb. 3.6). Nach 24 h kam es durch BZ bereits bei 0.1 μM , nach 48 h bei 0.01 μM zu morphologischen Auffälligkeiten. Infolge der ONX-Behandlung waren nach 24 h erst bei 1.0 μM und nach 48 h bei 0.5 μM Schäden der Dendritenstruktur sichtbar. Diese Beobachtungen entsprachen den vorherigen Ergebnissen, in denen diese Konzentrationen bereits als toxische Konzentrationen identifiziert wurden (Abb. 3.3, Abb. 3.4). Anhand der Konzentrationen, bei denen morphologische Abweichungen zur Leerkontrolle und damit eine toxisch bedingte Neurodegeneration sichtbar wurden, konnten die toxikologischen Kenngrößen NOAEL, LOAEL und LC (Tab. 3.1) festgelegt werden.

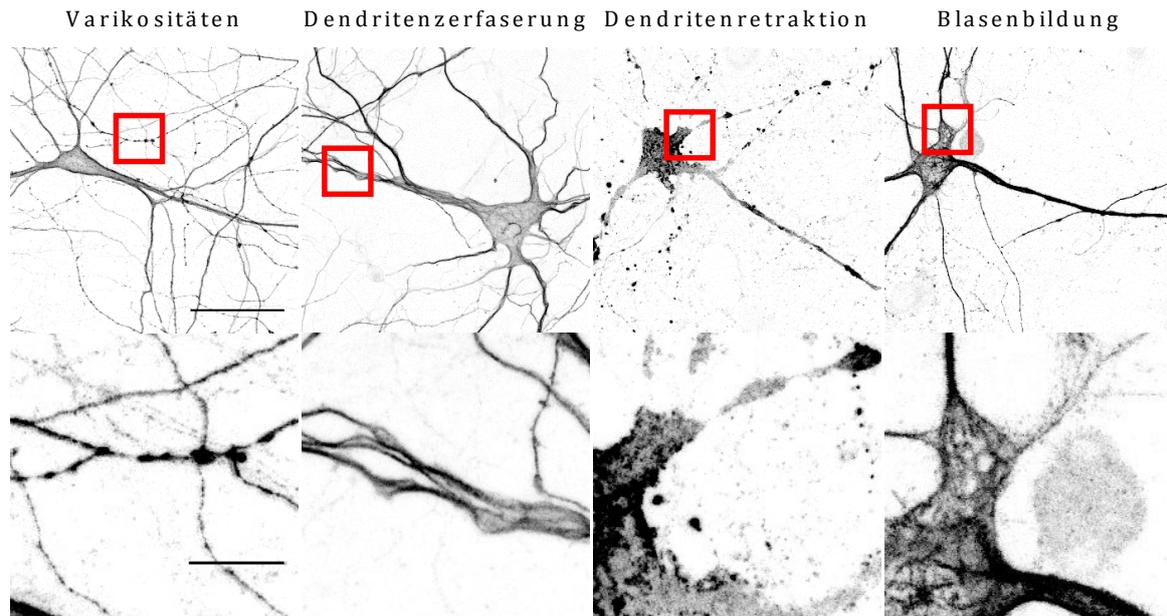


Abb. 3.5: Charakteristische morphologische Veränderungen als Merkmale der Neurodegeneration nach Applikation von BZ und ONX.

MAP2-positive Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX. Varikositätenbildung, Blasenbildung der Zellmembran, Dendritenzerfaserung und Dendritenretraktion traten im Rahmen neuronaler Schädigung auf. Sie dienten zur Identifikation der toxischen Konzentrationen von BZ und ONX. Maßstab obere Reihe 50 µm, untere Reihe 10 µm.

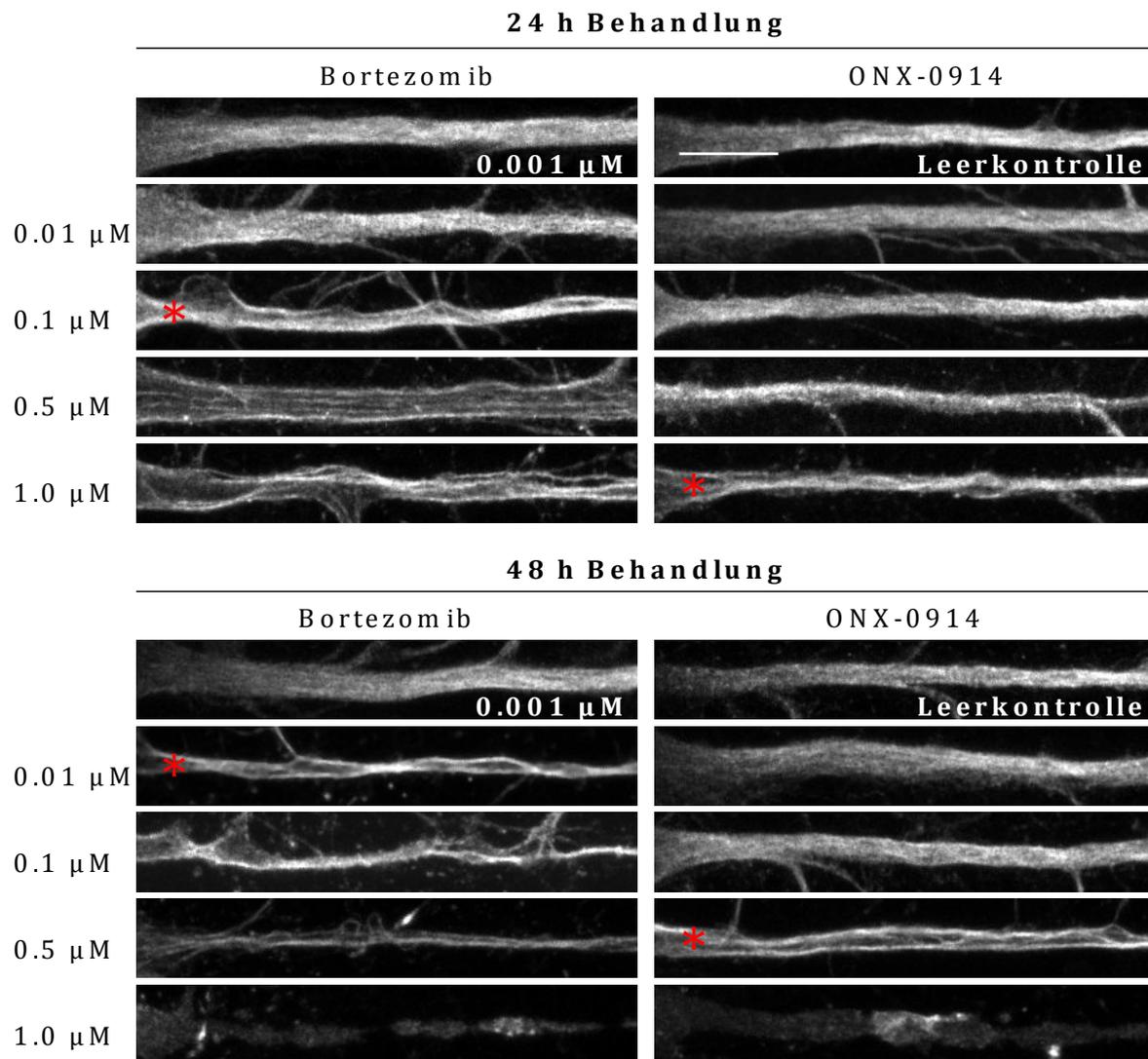


Abb. 3.6: Veränderung der Dendritenstruktur nach Behandlung mit BZ und ONX.

Ausschnitte von Dendriten MAP2-positiver Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX in verschiedenen Konzentrationen. Erkennbar waren Strukturschädigungen in Form von Zerfaserung, Retraktion und ungleichmäßiger MAP2-Färbung der Dendriten (*). Wie auch hier sichtbar führte die Behandlung mit BZ in deutlich geringeren Konzentrationen zu morphologischen Veränderungen als die ONX-Applikation. Nach 24 h kam es durch BZ bereits bei 0.1 μM , nach 48 h bei 0.01 μM zu Auffälligkeiten. Nach ONX-Behandlung waren nach 24 h erst bei 1.0 μM und nach 48 h bei 0.5 μM Veränderungen sichtbar. Maßstab 10 μm .

3.4. Pharmakologische Grenzwerte von Bortezomib und ONX-0914

Die toxikologischen Kenngrößen von BZ und ONX wurden nach mikroskopischer Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Zellkulturen festgelegt (Abb. 3.2, Abb. 3.3, Abb. 3.4, Abb. 3.6). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1. dargestellt. Die LC (*lethal concentration*) wurde definiert als die Konzentration, bei der eindeutig keine intakten Zellen mehr aufzufinden waren. Die Dosis, bei der Merkmale neuronaler Zellschädigung (Abb. 3.5) eintraten, die jedoch nicht zum Zelltod führte, wurde als LOAEL (*lowest observed adverse effect level*) festgelegt. Die NOAEL-Dosis (*no observed adverse effect level*) entsprach in dieser Arbeit einer Konzentration, bei der mikroskopisch keine Veränderung der Zellstruktur im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgemacht werden konnte.

	24 h BZ	24 h ONX	48 h BZ	48 h ONX
LC	-	-	≥0.1 µM	≥0.5 µM
LOAEL	≥0.05 µM	1 µM	≥0.01 µM	0.1µM<x<0.5µM
NOAEL	≤0.01 µM	≤0.5 µM	≤0.001 µM	≤0.1 µM

Tab. 3.1: **Toxikologische Schwellenwerte nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h und 48 h.**

Wie in Abb. 3.2 und 3.3 ersichtlich kam es nach einer Behandlungszeit von 24 h bei keinem der beiden Wirkstoffe in den getesteten Konzentrationen zum Zelltod. Es konnte keine LC für diesen Zeitpunkt ermittelt werden. Toxische Effekte traten nach 24 h nach BZ-Behandlung schon bei einer Konzentration von 0.05 µM auf. Dies war nach ONX-Behandlung erst bei einer Konzentration von 2.0 µM der Fall. Nach BZ-Behandlung für 24 h war unterhalb der Konzentration von 0.01 µM kein toxischer Effekt beobachtbar. Nach ONX-Behandlungen trat bei niedrigen Konzentrationen bis einschließlich 0.5 µM ONX keine Toxizität auf.

Nach 48 h Behandlungszeit wiesen beide Pharmaka eine letale Dosierung auf. Diese lag bei 0.1 µM BZ und 0.5 µM ONX (Abb. 3.2, 3.4). Dementsprechend war die LC nach BZ-Gabe 0.1 µM und nach ONX-Gabe 0.5 µM (Tab. 3.1). Nach ONX-Behandlung war unterhalb der Konzentration von 0.5 µM keine Toxizität beobachtbar. Über die LOAEL von ONX für 48 h war daher keine genaue Angabe möglich, da sie vermutlich zwischen

0.1 μM und 0.5 μM lag. Erste toxische Effekte durch BZ-Behandlung für 48 h traten eindeutig bei der Konzentration 0.01 μM auf. Bei Behandlung mit BZ in der Konzentration 0.001 μM waren keine toxischen Effekte mehr beobachtbar.

Die mikroskopisch sichtbaren Zellschäden (Abb. 3.5) ermöglichten die eindeutige Bestimmung der toxischen Konzentrationen von BZ und ONX. Hierbei konnte zwischen atoxischen, toxischen und letalen Konzentrationen unterschieden werden. Diese Abstufung führte zur Bestimmung der pharmakologischen Grenzwerte NOAEL, LOAEL und LC. Im Vergleich zeigten sich differierende Grenzwerte zwischen BZ und ONX, welche auf eine geringere Neurotoxizität von ONX hinwiesen.

3.5. Veränderung der Neuronenzahl

Neben morphologischen Veränderungen der Zellen bei geringen Konzentrationen von BZ und ONX fiel auch eine starke Beeinträchtigung des zellulären Netzwerkes auf. Es kam bei hohen Konzentrationen beider Inhibitoren zum Zelltod in der Kultur, so dass nur noch wenige Neurone bildlich dokumentiert werden konnten (Abb. 3.2). Um das neuronale Zellüberleben der kortikalen Primärkulturen nach Behandlung mit BZ und ONX vergleichen zu können, wurde daher die Anzahl der Neurone erfasst. Die Ermittlung der Zellzahl ist eine etablierte Methode zur Überprüfung der Lebensfähigkeit zellulärer Kulturen. Besonders in Toxizitätsanalysen kann die Zellzahlquantifizierung zur einfachen Erfassung der Dosis-Wirkungs-Beziehung in neuronalen Ko-Kulturen dienen (Ivanov et al. 2016).

Nach 24 h Behandlungszeit ergab sich bei keinem der Inhibitoren ein Anhalt für einen Rückgang der Neuronenzahl im Mikroskop. Im Gegensatz dazu zeigten sich nach 48 h eindeutig unterschiedliche Effekte der Inhibitoren auf die Dichte der Zellkultur. Eine Verminderung der Zellzahl war nach Behandlung mit BZ in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.05 μM erkennbar (Abb. 3.7). Infolgedessen war auch das dendritische Netzwerk weniger ausgeprägt. In der Konzentration 0.005 μM schien BZ keinen Einfluss auf die Zellzahl zu haben. Nach ONX-Behandlung für 48 h in den Konzentrationen 0.05 μM und 0.1 μM unterschied sich die Zelldichte mikroskopisch nicht von der Leerkontrolle (Abb. 3.7). Nach Gabe von 0.5 μM ONX kam es jedoch zu einer starken Reduktion der Neuronenzahl, vergleichbar mit dem Effekt von 0.05 μM BZ.

Schlussfolgernd zeigte der Proteasom-Inhibitor BZ schon bei einem Zehntel der Dosis von ONX einen vergleichbar toxischen Effekt.

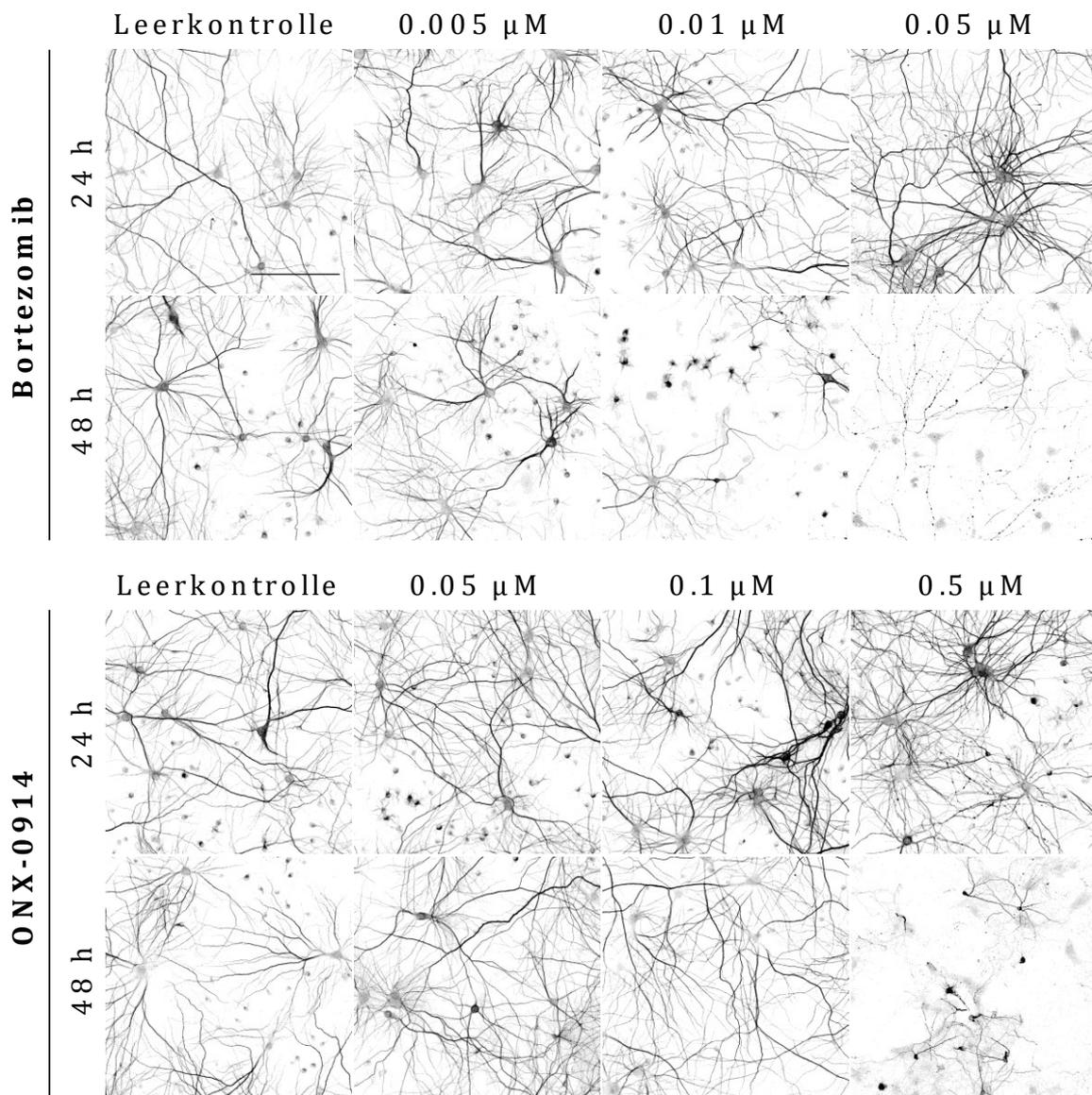


Abb. 3.7: **Mikroskopisch erkennbare Zellzahlreduktion nach Gabe von BZ und ONX.**

Die Darstellung zeigt repräsentative Aufnahmen nach Immunfluoreszenzmikroskopie MAP2-positiver Neurone. Die Leerkontrolle wies nach 24 h und 48 h ein dichtes neuronales Netzwerk mit zahlreichen Zellkörpern auf. Nach 24 h Behandlung mit BZ und ONX waren optisch keine Veränderungen der Zellzahl festzustellen. Jedoch war nach 48 h die Zellzahl nach Behandlung mit 0.01 μM und 0.05 μM BZ, sowie mit 0.5 μM ONX deutlich vermindert. Maßstab 150 μm

In der quantitativen Auswertung wurde ein unterschiedlicher Effekt der Inhibitoren auf die Zellzahl bestätigt (Abb. 3.8). Nach 24 h bestanden keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl nach Behandlung mit 0.001 μM bis 0.05 μM BZ und 0.01 μM bis 0.5 μM ONX im Vergleich zur Leerkontrolle. Nach BZ-Behandlung für 48 h sank die Zellzahl bei einer Konzentration von 0.01 μM und erreichte das Minimum von 7.5 % der Leerkontrolle bei einer Konzentration von 0.05 μM . Dieser Effekt war bei ONX in den gleichen Konzentrationen nicht beobachtbar. Erst nach der Behandlung mit 0.5 μM ONX für 48 h fiel die Zellzahl auf 5.7 % der Leerkontrolle.

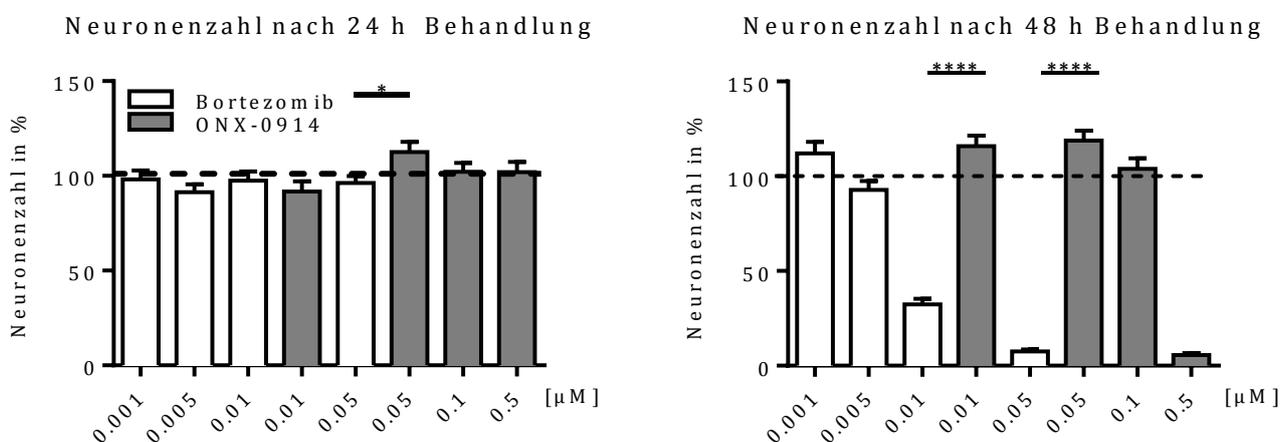


Abb. 3.8: **Quantifizierung MAP2-positiver Neurone nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Neuronenzahl bezogen auf die Leerkontrolle nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h und 48 h. Wie bereits mikroskopisch ersichtlich, zeigten BZ und ONX konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte auf die Zellzahl.

Nach 24 h bewirkte eine Behandlung mit beiden Pharmaka keine Veränderung der Zellzahl. Nach 48 h zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen BZ und ONX nach Behandlung mit den Konzentrationen 0.01 μM und 0.05 μM . (Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler, 2-3 unabhängige Experimente, 40 technische Replikate je Kondition, One-way-ANOVA, * $p=0.0223$, **** $p<0.0001$)

Es ließ sich eine toxische Wirkung von BZ im Sinne einer Zellzahlreduktion bereits bei einer Konzentration von 0.01 μM nachweisen. ONX führte im Vergleich dazu erst bei 0.5 μM zu einer Verminderung der Neuronenzahl. Die signifikanten Unterschiede zwischen BZ und ONX in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.05 μM bewiesen eine geringere Neurotoxizität von ONX.

3.6. Dosis-Wirkungs-Analyse

Durch Dosis-Wirkungs-Analysen ist es möglich, die akute Toxizität eines Stoffes zu charakterisieren (Hodgson 2004, S. 217). Indem Organismen dem Stoff in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt werden, lässt sich die Dosis-Wirkungs-Beziehung in logarithmischer Auftragung grafisch darstellen. Aus der Kurve ist die LC_{50} die Dosis, welche bei 50 % der exponierten Organismen zum Tod führt, ermittelbar (Hodgson 2004, S. 4). Aufgrund des eindeutigen Effekts (siehe Abb. 3.7 und Abb. 3.8) von BZ und ONX auf die Zellzahl in der Immunzytochemie wurde die Korrelation zwischen Dosis und Zellzahlminderung erfasst und die Dosis-Wirkungs-Beziehung graphisch dargestellt (Abb. 3.9).

Hierbei zeigten sich unterschiedliche Charakteristiken der beiden Pharmaka. Die Kurve nach BZ-Behandlung ist zu geringeren Konzentrationen verschoben. Bei der geringsten Konzentration ($0.001 \mu\text{M}$) liegt das erste Kurvensegment auf dem Ausgangsniveau der Leerkontrolle. Der Kurvenabfall beginnt zwischen den getesteten Konzentrationen $0.001 \mu\text{M}$ und $0.005 \mu\text{M}$. Der Abfall ist im Vergleich zu ONX weniger steil. Die LC_{50} liegt bei $\sim 0,0073 \mu\text{M}$. Bei einer Konzentration zwischen $0.01 \mu\text{M}$ und $0.5 \mu\text{M}$ flacht die Kurve ab. Der Verlauf der Kurve nach ONX-Behandlung ist zu höheren Konzentrationen verschoben. Das erste Segment bleibt noch bei den Konzentrationen $0.01 \mu\text{M}$ und $0.05 \mu\text{M}$ auf dem Ausgangsniveau. Erst zwischen Konzentrationen von $0.05 \mu\text{M}$ und $0.1 \mu\text{M}$ fällt die Kurve sehr steil ab. Die LC_{50} liegt bei $\sim 0,1212 \mu\text{M}$. Die Abflachung tritt erst kurz vor der letzten getesteten Konzentration ($0.5 \mu\text{M}$) ein. Die LC_{50} von BZ liegt zwischen den beiden mittleren getesteten Dosierungen und ist mit $0.0073 \mu\text{M}$ geringer als die LC_{50} von ONX. Der steile Abfall der Dosis-Wirkungs-Kurve von ONX wird durch die Lage der LC_{50} zwischen den beiden höchsten getesteten Konzentrationen für diesen Wirkstoff, $0.1 \mu\text{M}$ und $0.5 \mu\text{M}$, bedingt.

Die graphische Auftragung der Zellzahl in einer Dosis-Wirkungs-Kurve konnte die Toxizität von sowohl BZ als auch ONX auf die Zellkultur verdeutlichen. BZ führte jedoch im Vergleich mit ONX bereits in deutlich geringeren Konzentrationen zu einer Verringerung der Neuronenzahl (Abb. 3.7, Abb. 3.8). Dies ergänzt die vorherige Beobachtung einer stärkeren Schädigung von Neuronen durch BZ als durch ONX, sichtbar an den morphologischen Veränderungen (Abb. 3.2, Abb. 3.3, Abb. 3.4, Abb. 3.6). In Zusammenfassung der Ergebnisse ist das Überleben der kortikalen Primärkultur bei vergleichbaren Konzentrationen durch ONX weniger stark beeinträchtigt als durch BZ.

Zellzahlreduktion nach 48 h Behandlung

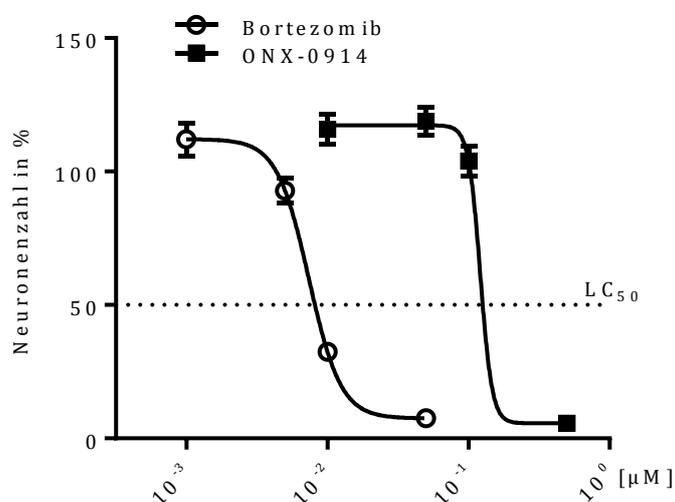


Abb. 3.9: **Toxizitätscharakteristika von BZ und ONX in der Dosis-Wirkungs-Kurve.**

Graphische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von BZ und ONX nach 48 h Behandlung in Bezug auf die Zellzahl. Sichtbar sind unterschiedliche Verläufe der Kurven von BZ und ONX. Die Kurve von BZ ist zu niedrigen Konzentrationen verschoben, die LC_{50} beträgt $0.0073 \mu\text{M}$. Die Kurve von ONX ist zu höheren Konzentrationen verschoben, der Abfall ist steiler und die LC_{50} beträgt $0.1212 \mu\text{M}$. (Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler, 2-3 unabhängige Experimente, 40 technische Replikate je Kondition, Transposition und *inhibitor-response*-Analyse mit *nonlinear-fit*)

Um jedoch nicht nur das generelle Überleben der Zellkultur nach Proteasom- bzw. Immunoproteasom-Inhibition zu untersuchen, erfolgte auch die Analyse der Zellvitalität durch Quantifizierung synaptischer Dornen (3.7) sowie wichtiger Proteine der Zellhomöostase (3.8).

3.7. Quantität synaptischer Dornen

Die interzelluläre Übertragung von Signalen in kortikalen Zellen ist abhängig von Qualität und Quantität der Synapsen. Sind diese beeinträchtigt, kommt es zu Störungen der zellulären Kommunikation und Plastizität. Um Unterschiede des Effekts von BZ und ONX auf die synaptische Funktion herauszustellen, wurden synaptische Dornen von Neuronen gezählt und quantifiziert. Hierfür ist die Signalerfassung des präsynaptischen Vesikelproteins Synaptophysin ein anerkanntes Verfahren (Wiedenmann und Franke 1985, Calhoun et al. 1996). Um die Analyse vitaler Zellen sicherzustellen, wurde für den direkten Vergleich beider Pharmaka nur die getestete Konzentration $0.01 \mu\text{M}$ berücksichtigt (Abb. 3.4). Auch wurde nur eine Behandlungsdauer von 48 h untersucht, da zu diesem Zeitpunkt bereits in vorherigen Untersuchungen eindeutige Ergebnisse erzielt werden konnten.

Zusätzlich zu den bereits festgestellten Strukturveränderungen der Dendriten (Abb. 3.6), konnte nach Behandlung mit BZ auch eine Veränderung der Synapsendichte beobachtet werden. Die Behandlung mit BZ in der Konzentration $0.01 \mu\text{M}$ führte nach 48 h sichtbar zur Reduktion des Synaptophysinsignals als Korrelat zur Anzahl synaptischer Dornen (Abb. 3.10). ONX schien in den untersuchten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Qualität von Synaptophysin zu haben.

Dieser Eindruck konnte quantitativ bestätigt werden. Nach Behandlung der neuronalen Zellen für 48h bestand ein signifikanter Unterschied zwischen BZ und ONX bei jeweils $0.01 \mu\text{M}$ (Abb. 3.11). Des Weiteren zeigte sich eine ebenfalls reduzierte Synapsenzahl durch BZ-Behandlung im Vergleich zur Leerkontrolle. Im Gegensatz dazu waren zwischen der Synapsenzahl nach Behandlung mit ONX und der Leerkontrolle keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

48 h Behandlung

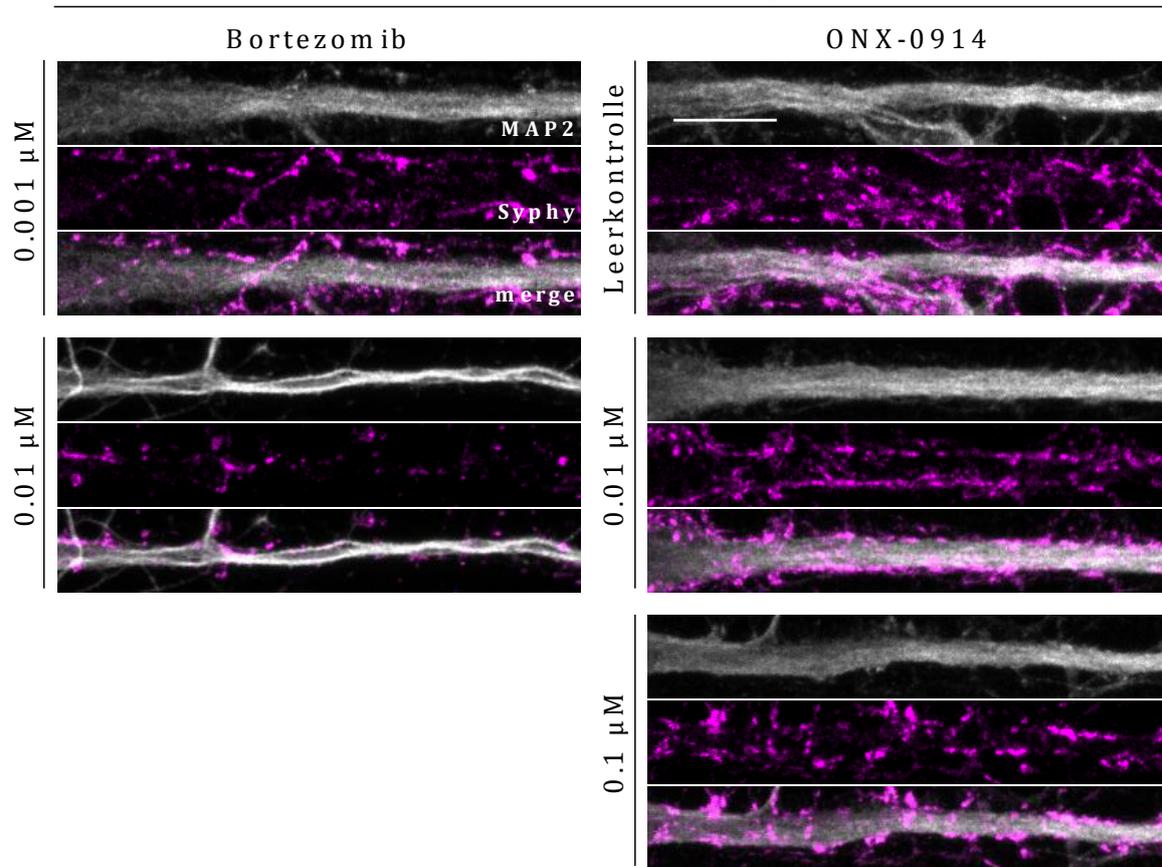


Abb. 3.10: **Verminderung des Synaptophysinsignals durch Behandlung mit BZ.**

Ausschnitte MAP2- und Synaptophysin-gefärbter Dendriten. Mikroskopisch war ein Verlust synaptischer Dornen nach Gabe von 0.01 μM BZ zu erkennen. Bei Behandlung mit ONX trat dieser Effekt in den untersuchten Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM nicht ein. Maßstab 10 μm .

Synaptophysin-Signal nach 48h Behandlung

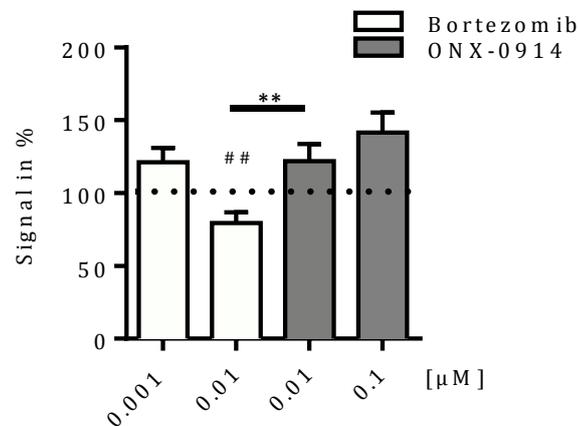


Abb. 3.11: **Quantifizierung von Synaptophysin nach Behandlung mit BZ und ONX für 48 h.**

Die Zellkultur wurde an DIV 14 mit jeweils 0.01 μM BZ und ONX für 48 h behandelt. Nach Immunfluoreszenzfärbung erfolgte die Quantifizierung der synaptischen Dornen mit dem Plugin *punctae analyzer* in ImageJ. Die Graphik zeigt die unterschiedliche Quantität des Synaptophysinsignals nach BZ-Gabe im Vergleich zu ONX. Bei jeweils 0.01 μM bestand ein signifikanter Unterschied. Die Synapsenzahl war nach BZ-Behandlung auch im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert (##). (Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler, 2-3 unabhängige Experimente, 16 technische Replikate je Kondition, t-Test nach Student, ** $p=0.003$, ## $p=0.0063$)

3.8. Beeinflussung der Proteinhomöostase

In dieser Arbeit wurde der Effekt von BZ und ONX auf ausgesuchte Signal-, Effektor- und Strukturproteine untersucht, um einen globalen Überblick über ihre Wirkung auf die Proteinhomöostase kortikaler Primärkulturen zu erhalten. Mittels Western Blot konnten bei einigen Proteinen Veränderungen der Signalintensität der Banden nach Behandlung mit BZ und ONX nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Nach 24 h zeigten phospho-NF κ B, CREB und phospho-CREB eine verminderte Intensität nach Behandlung mit BZ in den Konzentrationen 0.01 μ M und 0.1 μ M, sowie bei 0.5 μ M ONX. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei den Proteinbanden des AMPA-Rezeptors. Der Apoptosemarker Caspase 3 wies eine leicht erhöhte Intensität nach 0.01 μ M und 0.1 μ M BZ auf (Abb. 3.12). Zu diesem Zeitpunkt erschienen die Banden der anderen untersuchten Proteine nicht beeinflusst zu sein. Die verlängerte Behandlungszeit von 48 h führte zur Verstärkung dieser beobachteten Effekte. Es konnten deutlich verminderte Intensitäten von phospho-NF κ B, CREB und phospho-CREB nach Behandlung mit 0.01 μ M BZ, 0.1 μ M BZ und 0.5 μ M ONX detektiert werden. Auch zeigten AMPAR und GFAP verminderte Intensitäten in diesen Konzentrationen (Abb. 3.12). Eine Veränderung der Signale von Alpha 6, β -Aktin, Synaptophysin und Iba 1 war qualitativ nicht eindeutig zu erkennen, jedoch auch nicht sicher auszuschließen. Eindeutig waren erneut gesteigerte Level von Caspase 3 durch BZ in den Konzentrationen 0.01 μ M und 0.1 μ M nachzuweisen.

Um diese qualitativen Beobachtungen zu bestätigen und auch geringere Signalveränderungen zu erfassen, erfolgte die quantitative Analyse der Proteinbanden des Western Blots.

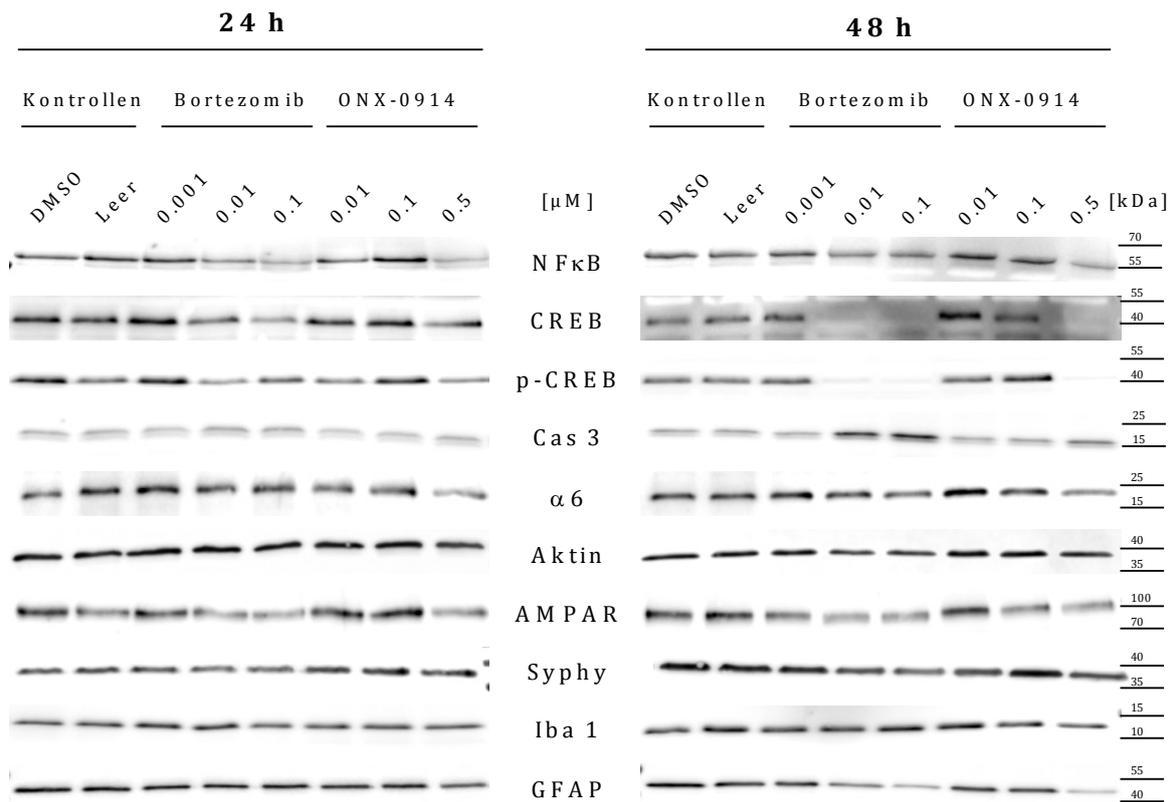


Abb. 3.12: **Veränderte Proteinexpression nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Repräsentative Ausschnitte von WB-Banden nach Proteindetektion. Erkennbar sind unterschiedliche Effekte von BZ und ONX auf die Level bestimmter Proteine in Abhängigkeit von Behandlungszeit und Konzentration. Besonders stark beeinflusst sind NF κ B, CREB, phospho-CREB und Caspase 3.

Da BZ als bekannter Suppressor von NFκB gilt (Hideshima et al. 2001), wurde vergleichend die Expression von phosphoryliertem NFκB (p65-Domäne) nach Behandlung mit BZ und ONX untersucht. Durch BZ-Behandlung konnte nach 24 h bei Konzentrationen von 0.01 μM und 0.1 μM sowie durch 0.5 μM ONX eine Reduktion von phospho-NFκB beobachtet werden. Geringere Konzentrationen der jeweiligen Agenzien hatten in dieser Behandlungszeit keinen Einfluss auf den Grad der Phosphorylierung von p65. Nach 48 h BZ-Behandlung bei der Konzentration 0.1 μM und durch 0.5 μM ONX lag eine Signalreduktion vor (Abb. 3.13). Im Kontrast dazu zeigte sich ein Anstieg von p65 im Vergleich zur Kontrolle bei geringen Konzentrationen von BZ (0.001 μM und 0.01 μM) und ONX (0.01 μM und 0.1 μM). Die Behandlung mit BZ führte in geringeren Konzentrationen als ONX zu einer Verringerung von phosphoryliertem NFκB, während nach ONX-Behandlung in geringen Konzentrationen eher eine Zunahme von phospho-NFκB beobachtbar war. In den jeweils höchsten Konzentrationen bewirkten beide Pharmaka jedoch eine Reduktion der Phosphorylierung von p65.

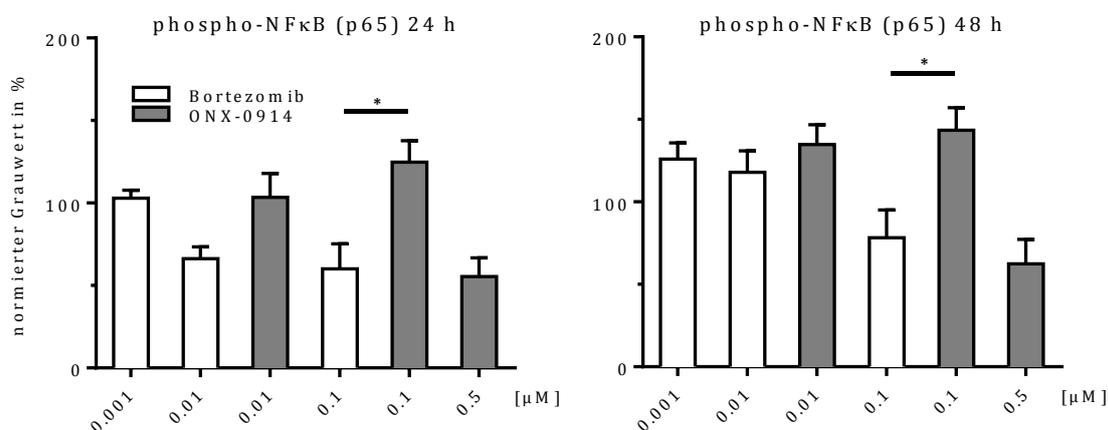


Abb. 3.13: **Quantifizierung des Proteinlevels von phospho-NFκB nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h war bereits eine Signalreduktion durch BZ mit steigender Konzentration zu erkennen. ONX verminderte das Proteinlevel erst bei 0.5 μM. Nach 48 h kam es eher zu einer Steigerung des Proteinlevels von phospho-NFκB im Vergleich zur Leerkontrolle. Nur bei 0.1 μM BZ und 0.5 μM ONX sank das Signal unter 100%. Zu beiden Zeitpunkten bestanden signifikante Unterschiede zwischen BZ und ONX in der jeweiligen Konzentration 0.1 μM. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Der Transkriptionsfaktor CREB spielt eine große Rolle bei Plastizität, Differenzierung und Zellüberleben in neuronalen Geweben (Lonze und Ginty 2002). Die CREB-Signalkaskade kann über das Prinzip der Phosphorylierung modifiziert werden.

Nach 24 h war, nach BZ-Behandlung deutlich sowie nach ONX-Behandlung mit leichter Tendenz, eine dosisabhängige Verminderung der Proteinlevel von CREB im Vergleich zur Leerkontrolle sichtbar (Abb. 3.14). Nach 48 h zeigte sich dieser Effekt verstärkt. Die Proteinexpression von CREB war bereits bei 0.01 μM und 0.1 μM BZ stark vermindert. Im Vergleich dazu bewirkte ONX erst bei 0.1 μM eine leichte und bei 0.5 μM eine starke Reduktion der CREB-Expression. In dieser Behandlungszeit kam es in den jeweils geringsten getesteten Konzentrationen beider Pharmaka zu einer leichten Expressionssteigerung von CREB. Die BZ-Behandlung bewirkte nach 24 h in der Konzentration 0.1 μM und nach 48 h in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM eine signifikante Reduktion der Expression von CREB im Vergleich zu ONX.

Nach 24 h führte die BZ-Behandlung ebenfalls zu einer Reduktion von phosphoryliertem CREB mit steigender Dosierung, während die Gabe von ONX für diese Behandlungszeit keinen eindeutigen Effekt bewirkte. Nach 48 h war die Phosphorylierung von CREB jedoch deutlich beeinträchtigt. BZ führte schon bei 0.01 μM zu einer starken Signalmindering, während ONX erst bei 0.5 μM einen reduzierenden Effekt hatte. Analog zur Analyse von CREB zeigte sich eine signifikant verminderte Phosphorylierung von CREB durch BZ nach 24 h in der Konzentration 0.1 μM und nach 48 h in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM im Vergleich zu ONX (Abb. 3.15).

Die Proteasom-Inhibition und die Immunoproteasom-Inhibition schienen gleichwertige Effekte auf die Expression von CREB und den Grad seiner Phosphorylierung aufzuweisen, jedoch führte die Behandlung mit BZ in geringeren Konzentrationen als ONX zu einer verminderten Expression und Phosphorylierung von CREB.

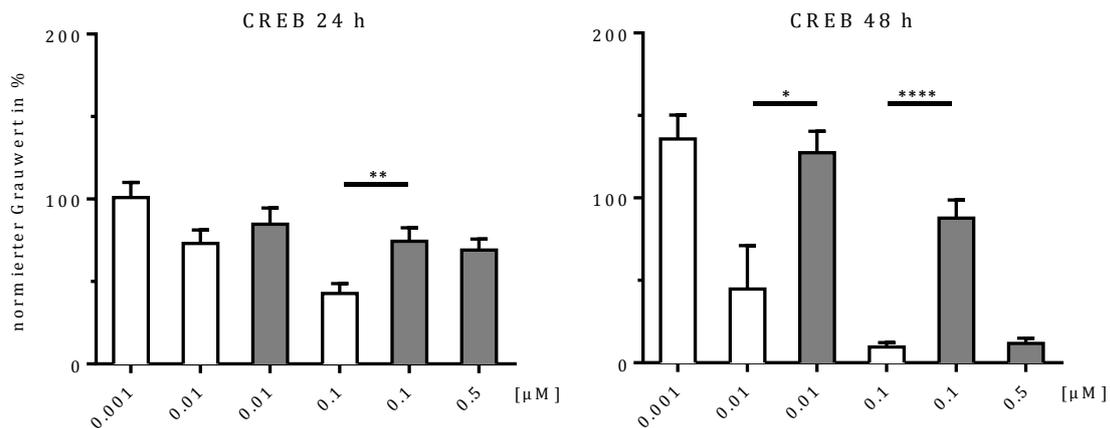


Abb. 3.14: **Quantifizierung des Proteinlevels von CREB nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h war eine Signalreduktion durch BZ mit steigender Konzentration zu beobachten. Die ONX-Behandlung wies eine ähnliche, aber weniger ausgeprägte Tendenz auf. Nach 48 h kam es zu einer Steigerung des Proteinlevels über 100 % bei 0.001 μM BZ und 0.01 μM ONX. Die Gabe höherer Konzentrationen beider Pharmaka führte jedoch zu einer Reduktion der CREB-Expression, wobei BZ im Vergleich zu ONX einen stärkeren Effekt aufwies. Signifikante Unterschiede konnten zwischen BZ und ONX in der jeweiligen Konzentration 0.1 μM zu beiden Zeitpunkten und 0.01 μM nach 48 h festgestellt werden. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

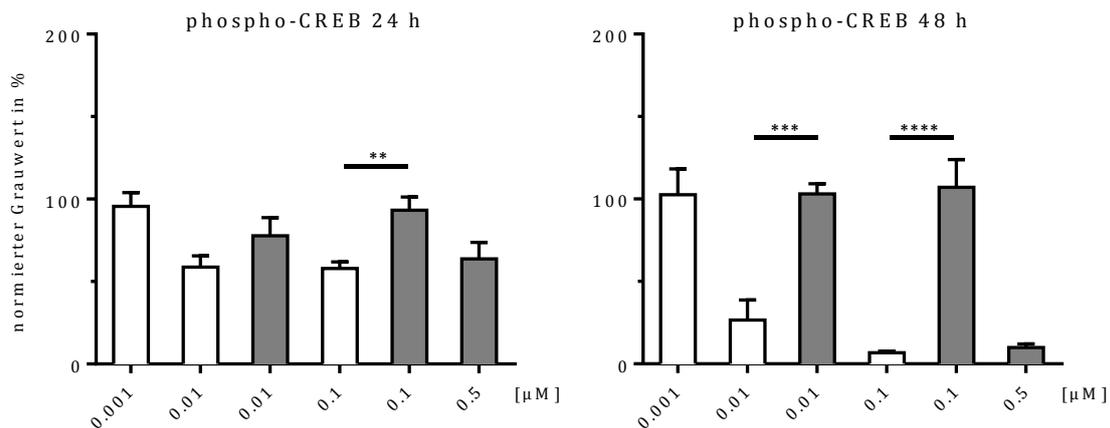


Abb. 3.15: **Quantifizierung des Proteinlevels von phospho-CREB nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h zeigte die Behandlung mit BZ eine Signalreduktion in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM . Die ONX-Gabe führte bei 0.1 μM zu keiner Signalveränderung im Vergleich zur Leerkontrolle, während sich die Proteinlevel nach 0.01 μM und 0.5 μM ONX auf einem niedrigen Niveau befanden. Nach 48 h kam es zur massiven Signalreduktion bei 0.01 μM und 0.1 μM BZ, während ONX erst bei 0.5 μM zu einer Abnahme des Proteinlevels führte. Signifikante Unterschiede konnten zwischen BZ und ONX in der jeweiligen Konzentration 0.1 μM zu beiden Zeitpunkten und 0.01 μM nach 48 h festgestellt werden. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

In dieser Arbeit wurde das Vorkommen und die Veränderung der Expression von Caspase 3 nach Behandlung mit BZ und ONX im Western Blot untersucht um Apoptose proteinbiochemisch nachzuweisen. Nach BZ-Behandlung für 24 h in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM und nach ONX-Gabe in der Konzentration 0.5 μM konnte eine Verdopplung der Proteinexpression beobachtet werden. Dieser Effekt wurde durch 48 h Behandlungszeit verstärkt. Nach BZ-Gabe in der Konzentration 0.01 μM stieg die Expression um das 4-fache und etwas geringer bei der Konzentration 0.1 μM an. Nach Behandlung mit ONX für die gleiche Zeitspanne konnte bei der Konzentration 0.5 μM eine deutliche Steigerung gesehen werden. Signifikante Unterschiede der Proteinexpressionslevel von Caspase 3 fanden sich zwischen BZ und ONX nach 48 h Behandlung mit der Konzentration 0.01 μM und 0.1 μM (Abb. 3.16). Generell war ersichtlich, dass durch BZ die Proteinexpression von Caspase 3 schon in geringeren Konzentration und mit stärkerer Wirkung gesteigert wurde (Abb. 3.12). Nach ONX-Behandlung trat dieser Effekt weniger stark und erst in der höchsten angewandten Konzentration auf.

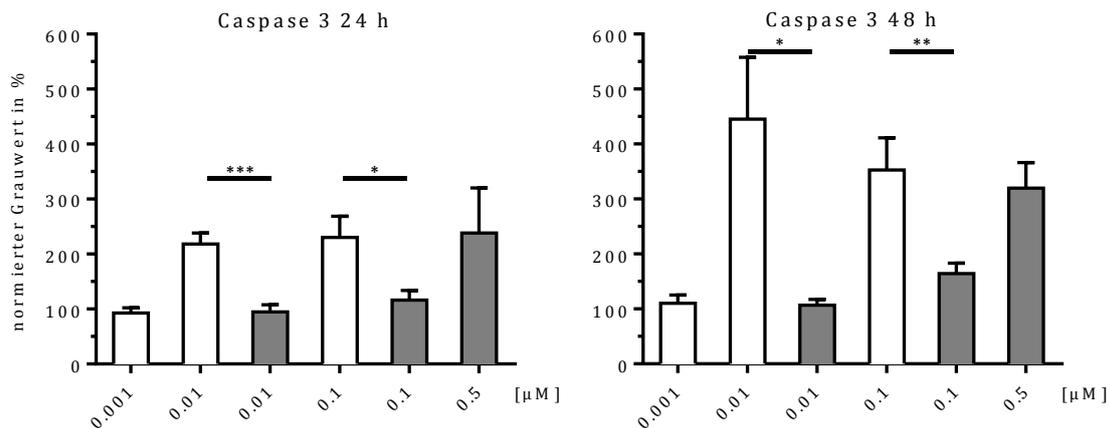


Abb. 3.16: **Quantifizierung des Proteinlevels von Caspase 3 nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Bereits nach 24 h kam es bei 0.01 μM und 0.1 μM BZ zu einer deutlichen Steigerung des Proteinlevels. Dieser Effekt trat bei ONX-Behandlung erst bei 0.5 μM ein. Nach 48 h kam es bereits bei 0.01 μM BZ zu einer über viereinhalbfachen Signalzunahme. ONX führte mit steigender Konzentration ebenfalls zu erhöhten Proteinleveln von Caspase 3, erreichte jedoch in seiner höchsten Konzentration nur eine dreifache Signalzunahme. In den niedrigsten Konzentrationen (0.001 μM BZ und 0.01 μM ONX) hielten sich die Proteinlevel zu beiden Zeitpunkten auf dem Niveau der Leerkontrolle. Signifikante Unterschiede konnten zwischen BZ und ONX in den jeweiligen Konzentrationen 0.1 μM und 0.01 μM zu beiden Zeitpunkten festgestellt werden. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Um den Einfluss der Inhibitoren auf den Proteinkomplex des Proteasoms bzw. Immunoproteasoms zu untersuchen, wurden Western Blots mit dem gegen die $\alpha 6$ -Untereinheit gerichteten PSMA6-Antikörper durchgeführt.

Nach 24 h Behandlungszeit war mit steigender Konzentration von BZ und ONX eine Tendenz zur Signalabnahme zu erkennen. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Pharmaka und die Signalstärken lagen jederzeit über dem Niveau der Kontrolle. Eine Behandlung für 48 h zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bereits nach 24 h beobachtet (Abb. 3.17). Die Behandlung mit BZ führte in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM zu einem verringerten Proteinlevel als ONX bei gleichen Konzentrationen. Nach ONX-Behandlung mit den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM lag die Proteinexpression auf einem höheren Ausgangsniveau von knapp 150 % und sank erst bei der Konzentration 0.5 μM . Auch nach 48 h lag die Proteinexpression von $\alpha 6$ bei keiner Kondition unterhalb der Leerkontrolle (Abb. 3.17).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen BZ und ONX beobachtet werden, wobei BZ nach 48 h die Proteinexpression von $\alpha 6$ stärker zu vermindern schien als ONX.

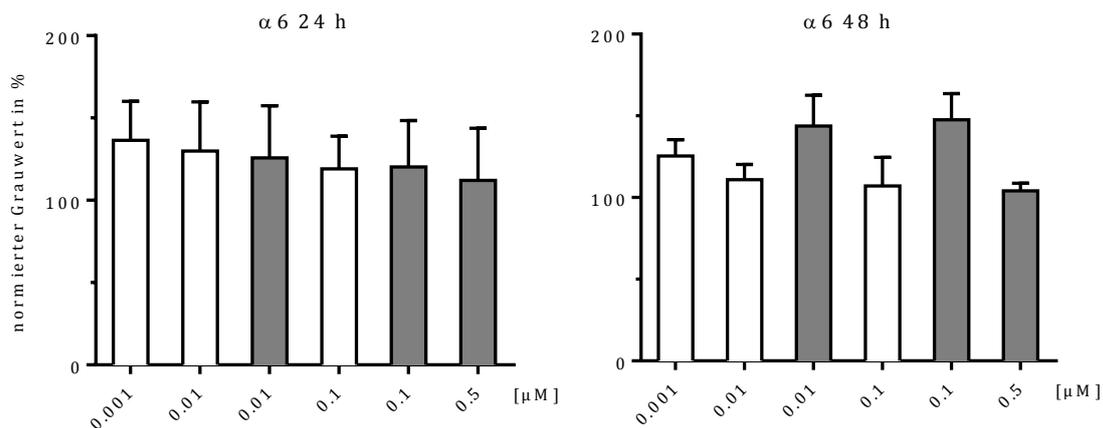


Abb. 3.17: **Quantifizierung des Proteinlevels von $\alpha 6$ nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h ließ sich ein leichter Trend der Signalabnahme mit steigender Konzentration von BZ und ONX erkennen, wobei bei geringen Konzentrationen beider Inhibitoren ein höheres Ausgangslevel der Proteinexpression bestand. Nach 48 h zeigten sich die Proteinlevel nach BZ-Behandlung kaum verändert. ONX führte in seinen beiden geringeren Konzentrationen zu einer Signalsteigerung. Die Behandlung, weder mit BZ noch mit ONX, ließ die Proteinlevel nie unterhalb 100% sinken. Signifikante Unterschiede zwischen BZ und ONX wurden nicht festgestellt. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Um Veränderungen des Zytoskeletts nach Behandlung mit BZ und ONX erfassen zu können, wurde β -Aktin im Western Blot quantifiziert. Keiner der Inhibitoren hatte nach 24 h einen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression von β -Aktin (Abb. 3.18). Während das Signal nach ONX-Gabe über 48 h nie unterhalb der Intensität der Leerkontrolle lag, kam es nach BZ-Gabe in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM zu einer signifikanten Verminderung der Proteinexpression.

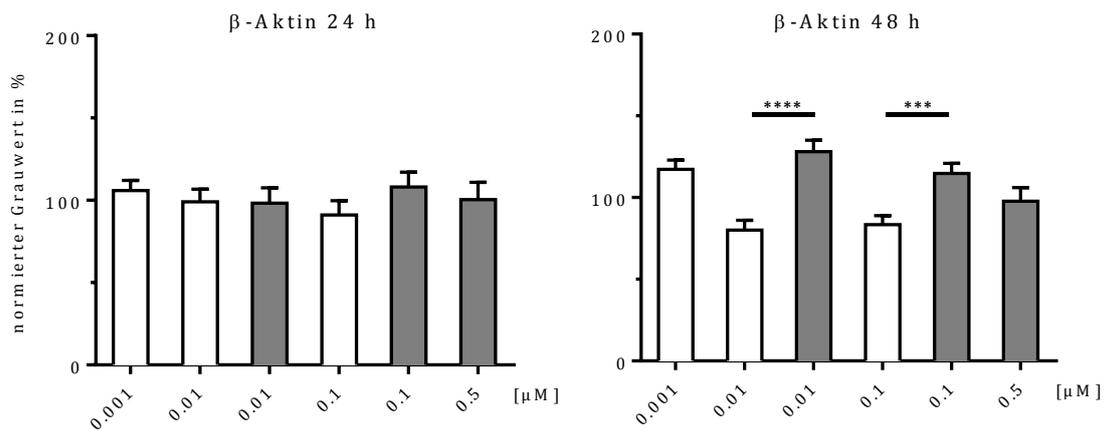


Abb. 3.18: **Quantifizierung des Proteinlevels von β-Aktin nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h zeigte sich kein Effekt der Pharmaka auf die Proteinlevel. Nach 48 h kam es jedoch zu einer Signalabnahme bei hohen Konzentrationen im Vergleich zur niedrigsten Konzentration des jeweiligen Inhibitors, da in den jeweils niedrigsten Konzentrationen die Proteinlevel leicht gesteigert waren. Im Vergleich zur Leerkontrolle verringerte Signalintensitäten ließen sich nur bei 0.01 μM und 0.1 μM BZ feststellen. Signifikante Unterschiede konnten zwischen BZ und ONX in den jeweiligen Konzentrationen 0.1 μM und 0.01 μM nach 48 h nachgewiesen werden. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Durch die proteinbiochemische Analyse der Synaptophysin-Level wurde versucht, die in der Immunfärbung beobachtete Synapsenreduktion zu bestätigen. Nach 24 h ließ sich kein Effekt der Behandlungen auf die Expressionslevel von Synaptophysin erkennen. Die Proteinexpression von AMPAR, ein postsynaptischer Neurotransmitter-Rezeptor, lag nach 24 h bei jeder Kondition unterhalb der Kontrolle und erschien dosisabhängig vermindert zu sein (Abb. 3.19). Nach Behandlung über 48 h differierten die Proteinexpressionen bei den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM deutlich voneinander, sowohl bei Synaptophysin (Abb. 3.20) als auch bei AMPAR. In diesen Konzentrationen führte BZ im Gegensatz zu ONX zu einer Verminderung der Proteinexpression (Abb. 3.12). ONX reduzierte die Proteinquantität von Synaptophysin erst in seiner höchsten Konzentration von 0.5 μM leicht unterhalb des Niveaus der Leerkontrolle.

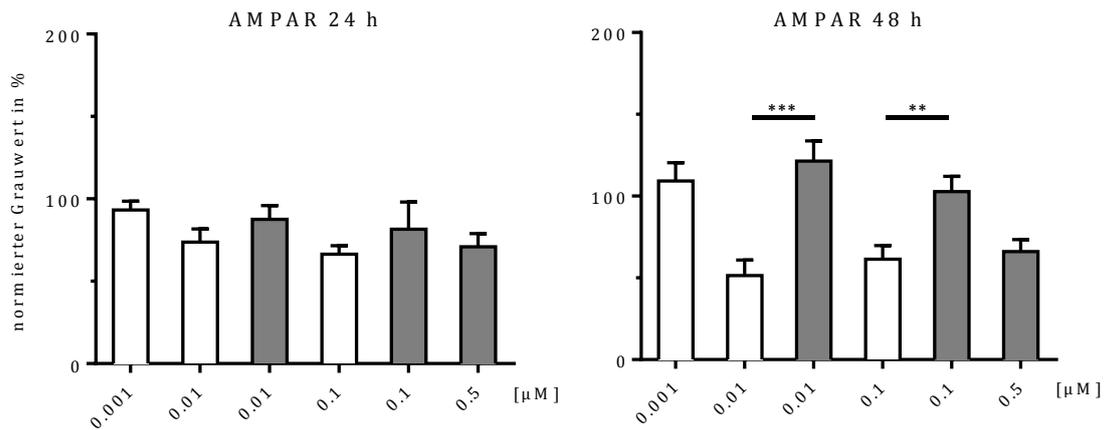


Abb. 3.19: **Quantifizierung des Proteinlevels von AMPA-Rezeptor nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h kam es mit steigender Konzentration beider Inhibitoren zu einer leichten Signalabnahme bis unterhalb des Niveaus der Leerkontrolle. Nach 48 h verminderten 0.01 μM und 0.1 μM BZ das Signal deutlich. ONX wies erst bei 0.5 μM einen ähnlichen Effekt auf. Signifikante Unterschiede konnten zwischen BZ und ONX in den jeweiligen Konzentrationen 0.1 μM und 0.01 μM nach 48 h festgestellt werden. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

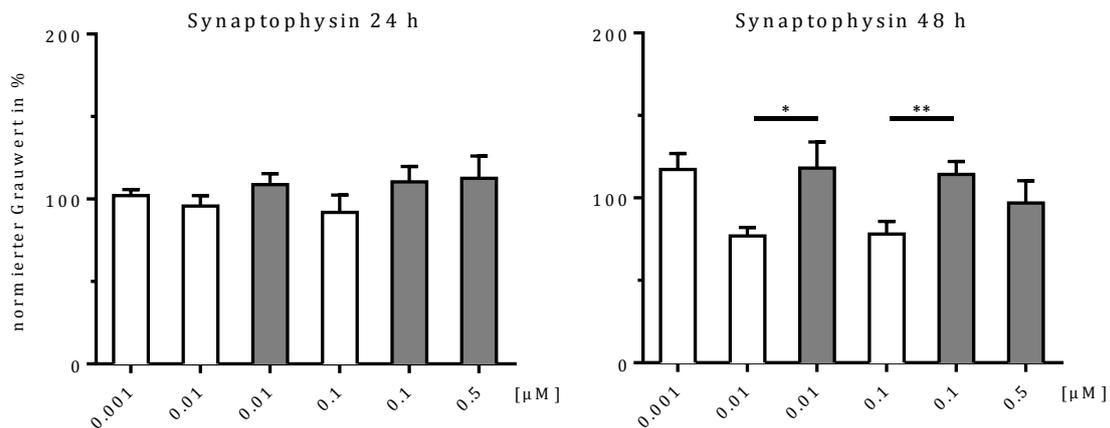


Abb. 3.20: **Quantifizierung des Proteinlevels von Synaptophysin nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h hatten die Inhibitoren keinen erkennbaren Einfluss auf die Proteinlevel von Synaptophysin. Nach 48 h sanken die Proteinlevel nach Behandlung mit 0.01 μM und 0.1 μM BZ. ONX bewirkte keine Signalabnahme im Vergleich zur Leerkontrolle. Signifikante Unterschiede konnten zwischen BZ und ONX in den jeweiligen Konzentrationen 0.1 μM und 0.01 μM nach 48 h festgestellt werden. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Im Western Blot wurden zur quantitativen Beurteilung der Gliazellen in der Ko-Kultur die Proteine Iba 1, ein Mikroglia-Marker, und GFAP, ein zellspezifisches Protein von Astrozyten, analysiert. Das Iba 1-Signal wurde durch beide Inhibitoren weder nach 24 h noch nach 48 h Behandlung signifikant alteriert (Abb.3.21). Die Expressionslevel von GFAP zeigten mit steigender Konzentration von BZ nach 24 h einen leichten Abwärtstrend. Im Gegensatz dazu trat eine Signalerhöhung von bis zu 150 % der Kontrolle bei Behandlung mit ONX in den Konzentrationen 0.1 μM und 0.5 μM auf (Abb. 3.22). Nach Behandlung mit BZ für 48 h in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM sanken die Proteinlevel deutlich (Abb. 3.12). Bei ONX-Behandlung zeigte sich das Signal in den gleichen Konzentrationen kaum beeinflusst und in der Konzentration 0.5 μM vermindert. Verglichen mit ONX führte BZ zu einer signifikanten Beeinträchtigung der GFAP-Proteinexpression in geringeren Konzentrationen (Abb. 3.22). Die Behandlung mit ONX schien nach 24 h die Expression von GFAP sogar zu steigern und führte erst nach 48 h in höchster Konzentration zur Signalminderung.

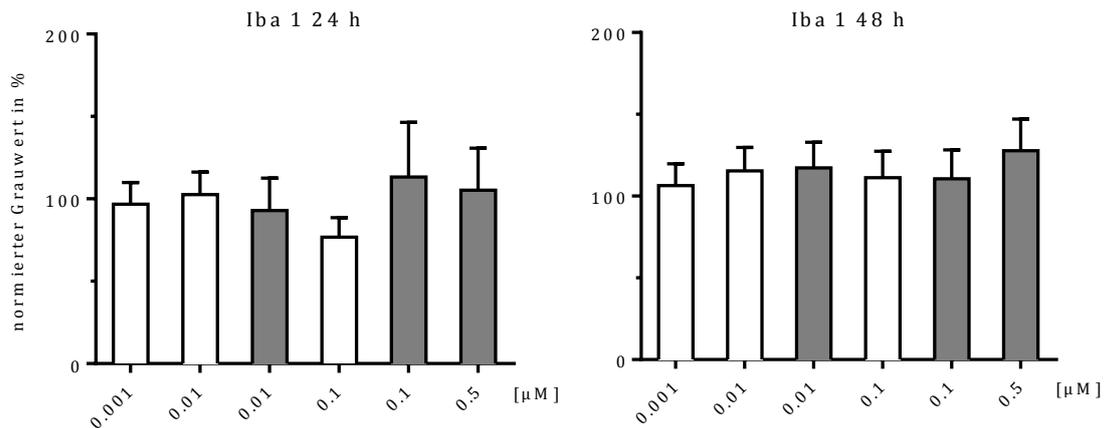


Abb. 3.21: **Quantifizierung des Proteinlevels von Iba 1 nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h schien die Gabe von 0.1 μM BZ zu einer leichten Signalminderung zu führen. Im Gegensatz dazu schien ONX in seinen beiden höheren Konzentrationen eher eine leichte Signalsteigerung zu bewirken. Nach 48 h waren kaum Abweichung der Proteinlevel von der Leerkontrolle zu erkennen. Es zeigte sich eine Steigerung bei 0.5 μM ONX. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen BZ und ONX festgestellt werden. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

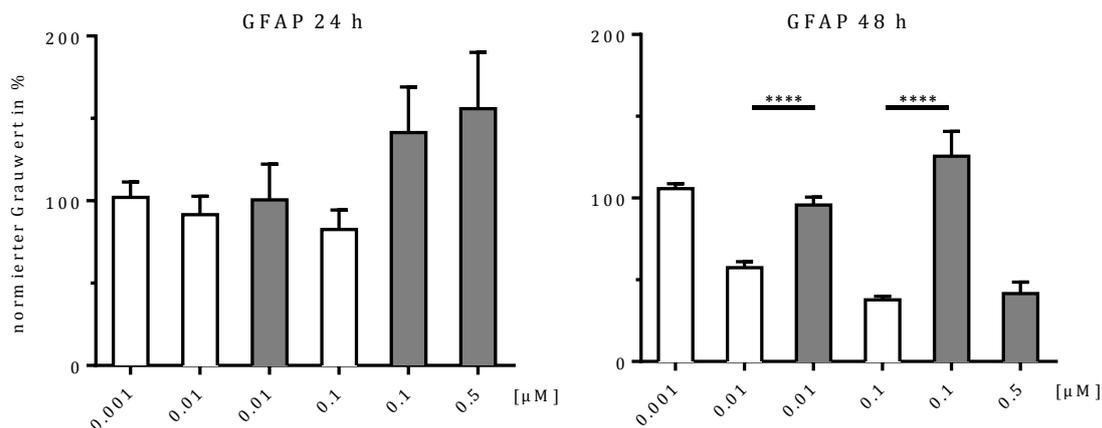


Abb. 3.22: **Quantifizierung des Proteinlevels von GFAP nach Behandlung mit BZ und ONX.**

Graphische Darstellung der Signalintensitäten der Proteinbanden des WB nach Grauwertanalyse. Nach 24 h zeigte die BZ-Gabe mit steigender Konzentration eine leichte Signalabnahme. Die Proteinlevel nach Gabe von ONX verhielten sich dazu gegensätzlich. Bei 0.1 μM und 0.5 μM kam es zu einer starken Zunahme des Proteinlevels von GFAP. Nach 48 h wurde eine Reduktion des Proteinlevels mit steigender Konzentration von BZ deutlich. ONX führte in der Konzentration 0.1 μM erneut zu einer Signalzunahme. Bei 0.5 μM ONX sank jedoch das Proteinlevel auf eine ähnliches Niveau wie nach 0.1 μM BZ ab. Signifikante Unterschiede konnten zwischen BZ und ONX in den jeweiligen Konzentrationen 0.1 μM und 0.01 μM nach 48 h festgestellt werden. (t-test nach Student zwischen gleichen Konzentrationen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

3.9. Phosphorylierung von CREB zu phospho-CREB

Die Phosphorylierung ist ein vielfach vorkommendes Prinzip der zellulären Modifizierung von Signalkaskaden. Die Untersuchung des Verhältnisses von CREB zur seiner phosphorylierten Form lässt Rückschlüsse auf die Regulation der CREB-Signalkaskade durch die verwendeten Inhibitoren zu.

Nach 24 h zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung von CREB bei 0.1 μM nach der Applikation beider Inhibitoren, sowie nach 48 h bei 0.01 μM BZ und 0.1 μM ONX. Diese war jedoch nicht signifikant. Eine verringerte Phosphorylierung schien nach 24 h bei 0.01 μM BZ sowie nach 48 h bei 0.001 μM BZ, 0.01 μM ONX (#), 0.1 μM BZ und 0.5 μM ONX vorzuliegen (Abb. 3.23).

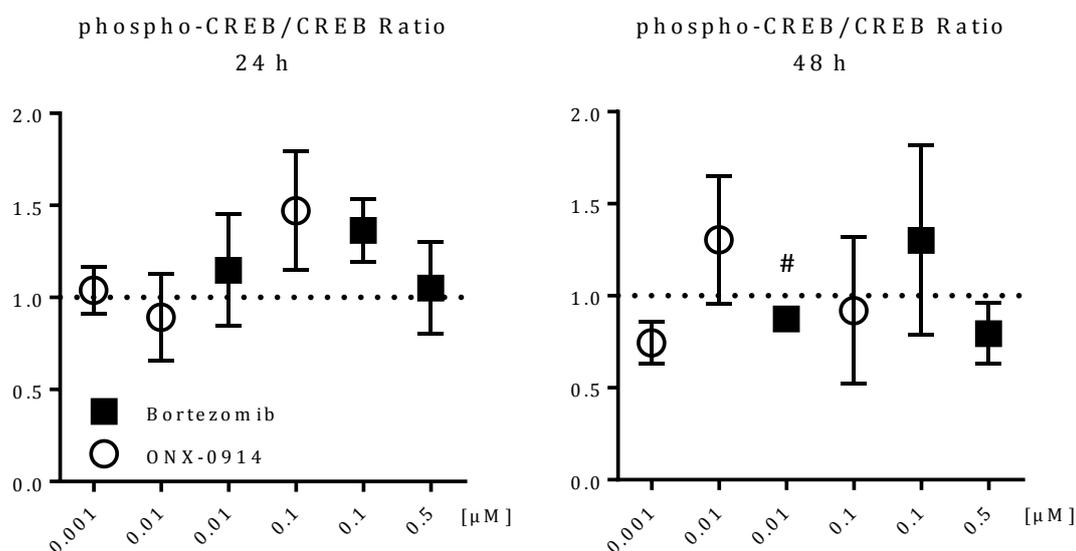


Abb. 3.23: **Verhältnis der Expression von CREB zu phosphoryliertem CREB nach Behandlung mit BZ und ONX für 24 h und 48 h.**

Zur Bestimmung des Verhältnisses von phospho-CREB zu CREB wurden die Signale des Western Blot innerhalb eines Experiments gemittelt und anschließend die Ratio von phospho-CREB zu CREB auf die Leerkontrolle normiert. Nach 48 h schien durch Behandlung mit ONX in der Konzentration 0.01 μM die Phosphorylierung vermindert. (Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler, 3 unabhängige Experimente, 2-3 technische Replikate je Kondition, Einstichproben t-Test gegen hypothetischen Wert 1, # p=0.0499)

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Neurotoxizität des spezifischen Immunoproteasom-Inhibitors ONX im Vergleich mit BZ auf Zellvitalität, Zellmorphologie und Proteinhomöostase in neuronalen Primärkulturen der Ratte untersucht.

Die Hauptidee dieser Analysen sind: (i) BZ und ONX haben einen unterschiedlich starken Einfluss auf das Überleben neuronaler Zellen *in vitro*, hierbei sind toxische Effekte konzentrations- und zeitabhängig, (ii) die LC_{50} von BZ ist geringer als von ONX, (iii) BZ vermindert die Synapsendichte im Vergleich zu ONX und (iv) BZ und ONX alterieren die Proteinexpression neuronaler Primärkulturen in unterschiedlichem Maße.

4.1. Behandlung kortikaler Primärkulturen der Ratte und ihre Verwendung als Modellorganismus

Das Chemotherapeutikum BZ führt als dosislimitierende Nebenwirkung zur peripheren Neuropathie (Richardson et al. 2006). Der selektive Immunoproteasom-Inhibitor ONX ist ein vielversprechendes Therapeutikum in der Therapie von Erkrankungen inflammatorischer und autoimmuner Genese (Miller et al. 2013). Er wurde jedoch bisher nicht auf sein neurotoxisches Potenzial untersucht.

Als Modellorganismus dienten die kortikale Primärkulturen der Ratte (Brewer und Price 1996). Das Zellalter DIV 14 galt als optimaler Kompromiss zwischen kurzer Kultivierungszeit und ausreichender Zellentwicklung mit ausdifferenzierten neuronalen Prozessen und synaptischen Kontakten. Das Kultursystem erlaubte daher eine schnelle Untersuchung des zellulären Überlebens und der Proteinhomöostase in neuronalen Zellen *in vitro*.

Da die Regeneration im ZNS langsamer vonstattengeht als im PNS (Siegel 2006, S. 118), ermöglichte uns die Verwendung der kortikalen Primärkultur einen unmittelbaren Eindruck der schädigenden Einflüssen der Chemotherapeutika. Auch konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass BZ nicht nur auf das PNS, sondern auch auf das Rückenmarkes als Teil des ZNS toxisch wirkt (Joh et al. 2009, Carozzi et al. 2013). Bei Krankheiten, in denen die Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigt ist, z.B. Multiple Sklerose, können auch peripher wirkende Chemotherapeutika in das ZNS gelangen (Ortiz et al. 2014). Ihre toxische Wirkung auf neuronale Zellen sollte daher charakterisiert sein. Die

meisten Ergebnisse, die bisher bei der Untersuchung der BZ-induzierten PN erzielt werden konnten, stützen sich auf Untersuchungen in neuronalen Zelllinien, kaum auf in-vitro-Studien mit Primärkulturen (Ale et al. 2014).

Die verwendeten Konzentrationen für BZ (0.0001 μM bis 0.1 μM) und ONX (0.01 μM bis 0.5 μM) wurden in Pilotversuchen ermittelt. Hier zeigten sich bei der Testung von Konzentrationen von 0.1 μM bis 2 μM bereits gravierende Unterschiede zwischen beiden Pharmaka. Nach Behandlung mit BZ für 48h kam es in jeder dieser Konzentrationen zum vollständigen Zelltod. Um die NOAEL und LOAEL von BZ festlegen zu können, wurde BZ daher in allen Experimenten in geringeren Konzentrationen verwendet. Eine Anpassung der Testkonzentrationen von ONX war ebenfalls nötig, jedoch in geringerem Maße.

Die deutlichen Unterschiede in der Toxizität der einzelnen Konzentrationen sprechen für eine präzise Durchführung der Experimente in diesem Kultursystem. Das verwendete Lösungsmittel DMSO konnte ebenfalls als neurotoxischer Auslöser ausgeschlossen werden, da im WB kein Unterschied der Proteinexpression zwischen mit DMSO behandelten Zellen und der Leerkontrolle festgestellt wurde. Toxische Effekte der Inhibitoren sind daher mit großer Sicherheit auf ihre spezifische Wirkweise zurückzuführen.

Zum Ausgleich des intraexperimentellen Fehlers wurden im WB technische Replikate durchgeführt und es erfolgten vielfache Aufnahmen von Neuronen eines Objektträgers in der konfokalen Mikroskopie. Hohe Signifikanzniveaus in der statistischen Auswertung zeigen, dass eine Erhöhung der Anzahl der unabhängigen Experimente keine Verbesserung der Signifikanz bewirken würde. Auch wurde sich für die Western-Blot-Analyse zweier unterschiedlicher Kultursysteme bedient, die unabhängig voneinander die gleichen Ergebnisse zeigten. Eine Beschränkung der Ergebnisse auf nur eine experimentelle Situation ist damit ausgeschlossen.

Auch die Verwendung des Coomassie-Gels als Bezugsgröße zur Normalisierung der Ergebnisse des WB erwies sich als richtiges Vorgehen. Eine Normierung auf β -Aktin hätte weniger eindeutige Ergebnisse erbracht, da es als Kontrolle die Voraussetzung einer stabilen Expression nicht erfüllt hätte. Diese Beobachtung unterstützt den Dogmen-Wechsel von Housekeeping-Proteinen oder - Genen wie β -Aktin oder GAPDH hin zu Biomarkern, die einer geringeren biologischen Varianz unterliegen (Lin und Redies 2012).

Die Übertragung der Ergebnisse auf die Situation in vivo erreicht mit der verwendeten Kultur jedoch ihre Grenzen, da keine Aussage über die Toxizität von BZ und ONX im PNS

getroffen werden kann. Weiterführende Untersuchungen unter Verwendung von Neuronen des PNS sind daher empfehlenswert.

4.2. Toxikologische Charakterisierung von BZ und ONX

Das Ziel toxikologischer Studien ist die Ermittlung der pharmakologischen Potenz eines Stoffes. Die Suche nach einer Dosis, unterhalb derer kein Effekt beobachtet werden kann, steht hierbei am Anfang. Die sogenannte NOAEL impliziert die Sicherheit eines Wirkstoffes bis zu dieser Konzentration und ist Voraussetzung für die Übertragung der Ergebnisse eines Tierexperiments auf Humanstudien (Hodgson 2004, S.536, U.S. Department of Health and Human Services 2005). Doch ein erwünschter therapeutischer Effekt kann mit dieser Dosierung meist nicht erreicht werden. Daher ist es hilfreich auch die letale Dosis (LC) und die geringste Dosis, bei der toxische Effekte auftreten (LOAEL), zu ermitteln.

Endpunkte in toxikologischen Studien sind z.B. die Aufnahme bestimmter Farbstoffe (Propidium-Jodid) in die Zellen oder die Formation von Oberflächenveränderungen, sogenannte blebs, welche auf Störungen der Zytoskelettstruktur hinweisen (Hodgson 2004, S.16). In dieser Arbeit wurde daher die morphologische Veränderung der Zellstruktur erfasst, um einen kurzfristigen Effekt der Pharmaka auf neuronale Zellen nachzuweisen. In Anlehnung an präklinische toxikologische Studien wurden die Begrifflichkeiten für die toxikologischen Grenzwerte NOAEL, LOAEL, und LC für die Fragestellung dieser Arbeit abgeleitet und beziehen sich auf strukturelle Veränderungen der Zellkultur.

In einer Dosis-Wirkungs-Kurve konnte die akute Toxizität von BZ und ONX hinsichtlich der Zellzahlreduktion graphisch dargestellt werden. Während die Kurven von wenig spezifischen Toxinen flach ansteigen, zeigen spezifisch interagierende Toxine steilere Anstiege (Hodgson 2004, S.218). Der Abfall der Dosis-Wirkungs-Kurve von ONX ist extremer als von BZ (Abb. 3.6). Dies könnte den zugrundeliegenden Wirkmechanismus der spezifischen Hemmung von LMP7 bestätigen. Die LOAEL von ONX für 48h war jedoch nicht ermittelbar, da sie sich zwischen 0.1 μM und 0.5 μM befand. Daher ist auch die Darstellung der ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurve für ONX als Annäherung zu betrachten. Besonders im wichtigen mittleren Segment, das die Kurvensteilheit und damit auch das Toxin und seinen Wirkmechanismus charakterisiert, fehlt im Fall von

ONX die Testung von Konzentrationen in geringeren Intervallen (Abb. 3.6). Für weiterführende Experimente sind andere Studienendpunkte, die eine rein objektive Erfassung der pharmakologischen Grenzwerte mittels Surrogat-Markern zulassen, zu empfehlen. Hier wäre z.B. ein LDH- oder MTT-Assay als Zytotoxizitäts-/Wachstumshemmungs-Test denkbar.

Die in dieser Arbeit ermittelten LC und LC₅₀ für neuronale Primärkulturen (Tab. 3.1) zeigten sich ähnlich mit der Arbeit von Hideshima und Kollegen. Auch hier wurde für BZ eine LC von 0.1 µM und eine LC₅₀ von 0.006 µM in Bezug auf das Zellwachstum von Myelom-Zelllinien nach 48 h im MTT-Assay nachgewiesen (Hideshima et al. 2001). Es konnte somit gezeigt werden, dass BZ in seinen auf Tumorzellen wirksamen Konzentrationen in vitro auch gesunde Nervenzellen beeinträchtigt. Im Kontrast dazu stehen die für Myelomzellen ermittelte LC und LC₅₀ von PR-924, einem anderen selektiven LMP7-Inhibitor. In einer Arbeit von Singh et al. lag die LC₅₀ im MTT-Assay nach 48 h je nach Zellreihe zwischen 3 µM und 7 µM, therapieresistente Zellreihen eingeschlossen (Singh et al. 2011). Die LC war nach 48 h dementsprechend erst bei Konzentrationen um 20 µM erreicht. Jedoch wurden normale PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von gesunden Spendern in diesen Konzentrationen nicht toxisch beeinträchtigt. Daher scheinen selektive Immunoproteasom-Inhibitoren zwar erst in höheren Dosierungen als die unselektiven Vorgängermoleküle erwünschte therapeutische Effekte auf Tumorzellen zu zeigen, in diesen aber auf gesunde Zellen nicht toxisch zu wirken. Da ONX über einen ähnlichen Wirkmechanismus wie PR-924 verfügt, lassen sich daher vergleichbare Effekte erwarten. Die Ergebnisse dieser Arbeit unter Testung neuronaler Primärkulturen wurden nicht durch einen MTT-Assay wie in den vorherigen genannten Arbeiten objektiviert. Sie zeigten jedoch in Bezug auf die Zellviabilität bereits eine höhere LC und LC₅₀ von ONX im Vergleich zu dem unspezifischen Proteasom-Inhibitor BZ.

Die Frage nach einer geringeren Neurotoxizität von ONX im Vergleich zu BZ scheint damit beantwortet zu sein. Ob jedoch ONX in Konzentrationen, welche effektiv auf MM-Zellen wirken, keine neurotoxischen Effekte zeigt, konnte in dieser Arbeit nicht erwiesen werden. Hier stehen noch vergleichende Experimente mit MM-Zelllinien aus. Sollte sich in Zukunft herausstellen, dass auf Kosten neuronaler Schäden ebenfalls hohe Dosierungen von ONX notwendig sind, um MM-Zellen zu schädigen, muss ONX hinsichtlich seiner synergistischen Wirkung mit anderen Chemotherapeutika betrachtet werden.

4.3. Neurodegeneration durch Proteasom-/Immunoproteasom-Inhibition

Es ließ sich eindeutig eine konzentrations- und zeitabhängige Toxizität beider Pharmaka feststellen. Dies betraf sowohl die strukturelle Integrität der Neurone als auch die Zahl ihrer synaptischen Dornen.

Charakteristische morphologische Veränderungen (Abb. 3.5) spiegeln sich durch die Festlegung der LOAEL wieder. Nach Behandlung mit ONX in geringeren Konzentrationen traten keine morphologischen Veränderungen der Zellstruktur auf (Abb. 3.3, Abb. 3.4). Das Zytoskelett neuronaler Zellen blieb trotz Immunoproteasom-Inhibition intakt, ersichtlich auch am Erhalt der Proteinlevel von β -Aktin im WB (Abb. 3.6.18). Der neurotoxische Effekt von BZ zeigte sich im Vergleich zu ONX abhängig von Behandlungszeit und Konzentration verstärkt. Dementsprechend findet sich eine geringere LOAEL von BZ. Auch eine Zellzahlreduktion nach 48 h Behandlung mit BZ in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.05 μM deutet auf eine stärkere Neurotoxizität von BZ hin, da in diesen Konzentration ein Effekt von ONX auf die Zellzahl ausblieb (Abb. 3.7, Abb. 3.8). Diese Beobachtungen bestätigten eine geringere Neurotoxizität von ONX.

Auch der unterschiedliche Effekt von BZ und ONX auf die synaptische Integrität wurde deutlich. Erwiesenermaßen haben Proteasomen eine große Bedeutung in der Aufrechterhaltung der synaptischen Kommunikation. Im Rahmen synaptischer Stimulation kommt es zu einer Verlagerung von Proteasomen aus dem Schaft in die synaptischen Dornen zum Zweck der lokalen Proteindegradation (Bingol and Schuman 2006). Eine Proteasom-Inhibition kann daher den Zusammenbruch der synaptischen Proteinhomöostase und die Degradation synaptischer Verbindungen zur Folge haben. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. BZ führte in der Konzentration von 0.01 μM zur Abnahme des Signals von Synaptophysin 1 und beeinträchtigte damit die Quantität präsynaptischer Anlagen. ONX hatte diese Wirkung nicht. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Immunoproteasom wenig zur Aufrechterhaltung der synaptischen Signalübertragung beiträgt oder präsynaptisch nicht im Zytoplasma enthalten ist. In einer Arbeit von Bajic et al., konnte ebenfalls eine deutliche Abnahme von Synaptophysin durch Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren gezeigt werden. Die Postsynapse scheint jedoch besonders vulnerabel in Bezug auf die Proteasom-Inhibition zu sein und ein Verlust von synaptischen Proteinen geht dem Verlust der zellulären Integrität der kortikalen Primärkultur voraus (Bajic et al. 2012). Die Wahl eines

postsynaptischen Markers könnte eine höhere Sensitivität für synaptische Fehlfunktion im Rahmen der spezifischen Immunoproteasom-Inhibition ermöglichen.

Sowohl die morphologischen Veränderungen wie z.B. *membrane blebbing* (Domnina et al. 2004, Kerr et al. 1972), als auch die Synapsenreduktion im Zusammenhang mit einer erhöhten Proteinexpression der Caspase 3 im Western Blot (Erturk et al. 2014) sprechen für den Vorgang apoptotischer Prozesse. Um ergänzend eine quantitative Erfassung aller apoptotischen Zellen zu erreichen, wäre die Durchführung eines TUNEL-Assays oder eines Propidium-Jodid-Assays denkbar.

Eine Beeinflussung der primären Zellkulturen durch BZ und ONX im Sinne einer Neurodegeneration ist offensichtlich. Die Neurotoxizität der beiden Pharmaka unterscheidet sich jedoch in ihrer Stärke. ONX führte in höherer Dosierung zum Zelluntergang, während eine Behandlung mit BZ schon in geringen Konzentration hinsichtlich Zellzahl, Zellstruktur und Synapsendichte schädigend wirkt.

4.4. Proteinanalyse

Um die Wirkung der Inhibitoren auf die zelluläre Proteinhomöostase neuronaler Zellen zu ermitteln, wurde die Analyse ausgesuchter Struktur- und Signalproteine mittels Western Blot durchgeführt (Abb. 3.12 - 3.22).

Der Transkriptionsfaktor NFκB gilt als ein entscheidender Regulator von Apoptose, Wachstum und Plastizität in neuronalen Zellen. Der Charakter des aktivierenden Stimulus entscheidet hierbei über NFκB als Vermittler von Neuroprotektion oder Neurodegeneration (Mincheva-Tasheva und Soler 2013). Die Phosphorylierung von NFκB ist notwendig für eine suffiziente Aktivierung des Transkriptionsfaktors, daher analysierten wir die Expression von phosphoryliertem NFκB (p65) im Western Blot.

BZ wirkt über die Blockade der IκB-Degradation als Suppressor von NFκB (Hideshima et al. 2001). Wir sahen in den BZ-behandelten Zellen daher wie erwartet eine Signalreduktion von p65 mit einem ausgeprägtem Effekt bei der Konzentration 0.1 μM (Abb. 3.13). Dies ließ sich bei ONX erst in der Konzentration 0.5 μM beobachten. Die Signalreduktion in diesen Konzentrationen trat bereits nach 24 h, deutlicher jedoch nach 48 h auf. Die Inhibition von NFκB führt über die verminderte Expression von Wachstumsfaktoren, Stress-Enzymen und Apoptose-Inhibitoren zum Zelltod (Adams 2004). Dies konnten wir morphologisch in der Immunzytochemie bestätigen: Bei

Behandlung mit BZ über 48 h in der Konzentration 0.1 μM waren keine vitalen Zellen mehr erfassbar, eine entsprechende Wirkung trat unter Behandlung mit ONX nach 48 h in der Konzentration 0.5 μM auf (Abb. 3.2). Eine Signalreduktion von p65 im WB korreliert daher aufgrund der vitalitätserhaltenden Funktion des Transkriptionsfaktors NF κ B mit dem Ausmaß des Zelltodes in der Immunzytochemie.

Doch nicht nur NF κ B, auch der Transkriptionsfaktor CREB spielt eine große Rolle in Plastizität, Differenzierung und Zellüberleben (Lonze und Ginty 2002). Voraussetzung für die Bindung im Zellkern ist seine Phosphorylierung an Serin-133 durch die PKA (Gonzalez und Montminy 1989). Phospho-CREB vermittelt die cAMP-induzierte Transkription, um in Situationen oxidativen Stresses die Zelle vor dem Zelltod zu bewahren. Dies involviert die Geninduktion von Überlebensfaktoren (Lee et al. 2009) und Anti-Apoptose-Effektoren (Mabuchi et al. 2001), aber auch Mechanismen der DNS-Reparatur nach ROS-induzierter Hochregulation von CREB (Pregi et al. 2017).

BZ führte in den Konzentrationen 0.01 μM und 0.1 μM deutlich zu Reduktion von phospho-CREB und CREB (Abb. 3.13, Abb. 3.15). Dies weist auf eine Verminderung der CREB-Expression hin. Entsprechend dazu kam es in genau diesen Konzentrationen zur Beeinträchtigung der Zellvitalität. ONX alterierte die CREB-Expression in diesen Konzentrationen nicht. Die Immunoproteasom-Inhibition scheint die Proteinhomöostase stabil zu halten und wenig Einfluss auf den CREB-Signalweg als zelluläres Überlebensprogramm zu haben.

Die Analyse des Verhältnisses von phospho-CREB zu CREB zeigte keine Änderungen der Phosphorylierung, wahrscheinlich bedingt durch eine übereinstimmende Verminderung von phospho-CREB und CREB (Abb. 3.23). Daher hat die BZ-Behandlung eine verminderte Expression der CREB-Proteine zur Folge, scheint aber nicht das Maß ihrer Aktivierung als Zellstress-Antwort zu ändern. Jedoch ist eine genaue Aussage über den Einfluss der Pharmaka auf die Modulation des CREB-Signalweges nicht zu treffen, da er vielfältigen Einflussfaktoren unterliegt und im Rahmen der gewählten Experimente keine komplette Analyse dieses oder anderer Signalwege möglich war.

In dieser Arbeit lag der Fokus vornehmlich auf der generellen Darstellung wichtiger Signalproteine unter Beeinflussung der Proteasom- und Immunoproteasom-Inhibition. Caspase 3 steht hier stellvertretend als Signalmolekül der Apoptose, da es ein wichtiges Effektorprotein dieser in neuronalen Zellen ist (Kuan et al. 2000). Seine Funktion ist Voraussetzung für morphologischen Veränderungen wie DNS-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation während des programmierten Zelltodes (Janicke 1998).

Mikroskopisch sichtbare Veränderungen der Zellstruktur nach Behandlung mit BZ und ONX, die durch immunzytochemische Färbung sichtbar gemacht werden konnten, deuteten bereits zu Beginn der Experimente auf apoptotische Vorgänge hin. Daher wurde die Expression von Caspase 3 im WB untersucht. Hier zeigten sich nach Behandlung mit BZ schon in der Konzentration $0.01 \mu\text{M}$ stark erhöhte Level (Abb. 3.16). Obwohl in dieser Konzentration sogar nach BZ-Behandlung über 48 h noch intakte Zellkörper in der Immunzytochemie vorhanden waren, kam es proteinbiochemisch bereits zu einem mehr als 4-fachen Anstieg des Caspase 3-Signals. Nach Gabe von ONX ließ sich kein so starker Anstieg von Caspase 3 nachweisen. Das apoptotische Potenzial von ONX scheint daher geringer zu sein bzw. erst bei Überdosierung auch in gesunden Zellen aufzutreten. Neurone sind offensichtlich empfindlicher für die Proteasom-Inhibition als für die Immunoproteasom-Inhibition. Dies könnte einerseits daran liegen, dass im Fall der Proteasom-Inhibition durch BZ schneller Proteinaggregate anfallen und die Proteinhomöostase zusammenbricht. Andererseits findet sich hier ein Hinweis darauf, dass das Immunoproteasom unter physiologischen Bedingungen in Neuronen wenig bis gar nicht exprimiert sein könnte, da seine Inhibition nicht zum frühen Zelltod führt.

Ein Nachweis von proteasomalen Bestandteilen ist durch die Erfassung von einzelnen Untereinheiten möglich. Die proteasomale $\alpha 6$ -Untereinheit ist Bestandteil der 20S-Untereinheit des Proteasoms und des Immunoproteasoms (Ferrington und Gregerson 2012). Als Komponente der äußeren α -Ringe des proteasomalen Kernpartikels ermöglichen sie den Eintritt von Proteinsubstraten zur Degradierung durch Assoziation mit den regulatorischen 19S-Untereinheiten (Groll et al. 2000). Es wird diskutiert, ob Polymorphismen im PSMA6-Gen ein prognostischer Faktor für Patienten mit MM sein können (Bachmann et al. 2010). Die Behandlung der Zellkultur mit beiden Pharmaka für 24 und 48 h zeigte keine signifikant veränderte Proteinexpression von $\alpha 6$ (Abb. 3.17). Es bestand jedoch die Tendenz zu einer leicht gesteigerten Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies stellt möglicherweise einen kompensatorischen Mechanismus dar. Besonders nach Behandlung mit ONX über 48 h in den Konzentrationen $0.01 \mu\text{M}$ und $0.1 \mu\text{M}$ war das Signal auf fast 1,5-faches Niveau der Leerkontrolle erhöht, während die Proteinexpression durch BZ-Gabe in den gleichen Konzentrationen nicht gesteigert war. Da die Expression von $\alpha 6$ im Gegensatz zu anderen Proteinen in keiner experimentellen Situation vermindert war, beeinträchtigen

die Pharmaka wahrscheinlich nicht die generelle Quantität der Proteasomen, sondern direkt ihre Funktionsweise.

Auch die Evaluation struktureller Proteine war entscheidend für die weitere Charakterisierung von BZ und ONX. Da bereits nach immunzytochemischer Färbung mit MAP2 bei bestimmten Konzentrationen der Inhibitoren eine veränderte Zellstruktur erkennbar war, sollte dies anhand von β -Aktin genauer quantifiziert werden. β -Aktin ist ein Strukturprotein neuronaler Zellen und wird bei vielen proteinbiochemischen Methoden als Kontrollprotein verwendet (Cheever and Ervasti 2013). Die Expressionslevel von β -Aktin zeigten nach BZ-Behandlung über 48 h in den Konzentrationen 0.01 μ M und 0.1 μ M eine abnehmende Tendenz (Abb. 3.18). Dies war nach Behandlung mit ONX nicht zu beobachten, die strukturelle Integrität der neuronalen Zellen blieb in vergleichbaren Konzentrationen erhalten. Neuronale Struktur-Proteine scheinen also durch die Proteasom-Inhibition stärker beeinträchtigt zu sein als durch die Immunoproteasom-Inhibition.

Wie im Fall von β -Aktin sollte die proteinbiochemische Untersuchung von Synaptophysin 1 die immunzytochemische Beobachtung ergänzen. Das präsynaptische Vesikelprotein Synaptophysin und der postsynaptische AMPA-Rezeptor sind verantwortlich für die Kommunikation zwischen neuronalen Zellen. Der AMPA-Rezeptor ist, zusammen mit vielen anderen Proteinen, bekannt für seine wichtige Rolle in der neuronalen Plastizität bei der Formierung des Langzeitgedächtnisses (Maren et al. 1993). Synapsenreduktion, Ausdünnung des dendritischen Baumes und Rückgang synaptischer Proteine sind ebenfalls Marker für neuronale Schädigung in neurodegenerativen Erkrankungen oder nach traumatischen Läsionen (Kamat et al. 2014, Fiala et al. 2002). Eine Arbeit von Ertürk et al. konnte zeigen, dass die Verkleinerung von synaptischen Dornen abhängig von Caspase 3 und damit ein apoptotischer Prozess ist (Erturk et al. 2014). In dieser Arbeit konnten wir sowohl mikroskopisch als auch proteinbiochemisch nachweisen, dass die Proteasom-Inhibition zu einer Synapsenreduktion führt (Abb. 3.10, Abb. 3.11, Abb. 3.20). Dies konnte für den Immunoproteasom-Inhibitor ONX nicht gezeigt werden. Auch nach ONX-Gabe bei beiden getesteten Zeitpunkten in der Konzentration 0.5 μ M blieb das Expressionslevel von Synaptophysin stabil (Abb. 3.20). Auch AMPAR wurde durch BZ signifikant stärker reduziert als durch ONX in den gleichen Konzentrationen (Abb. 3.19). Diese Ergebnisse zeigen die spezifisch neurotoxische Wirkung von BZ auf morphologischer Ebene. Da der Mechanismus der Chemotherapie-induzierten peripheren Neuropathie bisher nicht

gänzlich geklärt ist, sollte die Bedeutung synaptischer Schäden in die Überlegungen einbezogen werden, da sie hier explizit nach der Gabe von BZ nachgewiesen werden konnte. Das Wirkprofil von ONX scheint dagegen, obwohl es in hohen Dosierungen ebenfalls schädlich auf gesunde Zellen wirkt, speziell für Neurone weniger toxisch zu sein. Die Immunoproteasom-Inhibition verhinderte in dieser experimentellen Konstellation den Verlust synaptischer Dornen und erhielt somit die zelluläre Integrität. Ob allerdings die synaptische Plastizität und Kommunikation nach Inhibition des Immunoproteasoms besser erhalten bleibt, wurde hier nicht untersucht. Hierzu müsste vergleichend eine Funktionsanalyse der synaptischen Signalübertragung nach Gabe von BZ und ONX durchgeführt werden.

Für das zelluläre Überleben spielen nicht nur Verbindungen zwischen Neuronen, sondern auch zwischen Neuronen und Gliazellen eine Rolle. Astrozyten und Mikroglia sind essentiell für das Überleben von Neuronen. Sie erfüllen zahlreiche Funktionen in der Aufrechterhaltung der Kommunikation, der Zellvitalität und der gezielten Abwehr von schädigenden Einflüssen (Takuma et al. 2004). Die Expressionslevel des Mikroglia-Markers Iba1 blieben unter allen Konditionen nahezu konstant (Abb. 3.21). Dies wurde hier weniger durch einen fehlenden Effekt der Proteasom- bzw. Immunoproteasom-Inhibition bedingt gesehen, sondern eher durch eine geringe Anzahl von Mikroglia in der Ko-Kultur. Da bekannt ist, dass in Mikroglia auch in Kultur das Immunoproteasom nach Induktion exprimiert wird (Stohwasser et al. 2000), kann auch eine fehlende Aktivierung von Mikroglia vorliegen. Diese ist *in vitro* durch externe Stimuli schwer zu erreichen. Mikrogliazellen stellen jedoch die wichtigsten Immunzellen des ZNS dar. Zurzeit wird vermutet, dass sie das Immunoproteasom konstitutiv exprimieren (u.a. Säring et al., unveröffentlicht). Daher ist die weitere Forschung mit Glia-Kulturen zur weiteren Charakterisierung der Wirkweise von ONX in neuronalen Zellen indiziert.

Dagegen zeigte sich die Expression von GFAP durch BZ erneut stärker reduziert als durch ONX. Der Immunoproteasom-Inhibitor führte sogar unter bestimmten Konditionen (bei 24 h in den Konzentrationen 0.1 μM und 0.5 μM , bei 48 h in der Konzentration 0.1 μM) zu einer Signalsteigerung (Abb. 3.22). Ob dies im Rahmen einer Immunantwort durch Aktivierung von Astrozyten passiert, ist unklar. Wie bereits bei Robinson et al. diskutiert wurde, beinhaltet die Astrozyten-Aktivierung bei gleichzeitiger fehlender Hochregulation der Mikroglia durch Proteasom-Inhibition kontroverse Aspekte in der Rolle der peripheren Neuropathie (Robinson et al. 2014).

Die einzelne Bedeutung der Immunzellen des Nervensystems unter Proteasom- bzw. Immunoproteasom-Inhibition muss weiterhin erforscht werden.

4.5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutige Unterschiede in der Wirkung des Proteasom-Inhibitors BZ und des Immunoproteasom-Inhibitors ONX. Man könnte daher annehmen, dass die beobachteten Effekte auf die unterschiedliche Wirkweise von BZ und ONX zurückzuführen sind. Wahrscheinlich aber haben beide Pharmaka viele off-target-Effekte und bewirken nicht nur eine spezifische Inhibition der $\beta 5$ - bzw. der LMP7-Untereinheit. Ob Neurone überhaupt eine basale oder induzierbare Expression des Immunoproteasoms aufweisen wird diskutiert. In einem Schlaganfall-Modell scheinen sie die Hauptquelle für LMP7 nach zerebraler Ischämie zu sein (Lü und Wang 2012). Eine andere Arbeit widerlegt dies (Chen et al. 2015). Ein hier beobachteter passiv neuroprotektiver Effekt von ONX ist daher nicht unbedingt nur auf seine Wirkweise, sondern auf eine verminderte bzw. fehlende Expression des Immunoproteasoms in Neuronen zurückzuführen. Da hier Glia-Zellen, die in der Diskussion sind das Immunoproteasom sicher zu exprimieren, nicht untersucht wurden, konnte keine Auswirkung von BZ und ONX auf diese Zelltypen ermittelt werden. Möglicherweise sind Mikroglia sogar geeignetere Zellen, um die direkte Wirkung der Immunoproteasom-Inhibition zu ermitteln. Eine ONX-vermittelte Reduktion der durch Mikroglia ausgelösten Inflammation nach ZNS-Traumata ist bereits erwiesen (Moritz et al. 2017). Hier sollten weitere Untersuchungen erfolgen.

Das ZNS und das PNS müssen jedoch stets als Netzwerk aus allen neuronalen Zellspezies betrachtet werden. Eine Betrachtung der Wirkung von Pharmaka auf vereinzelte Zellarten wird der Situation *in vivo* nie gerecht. Nichtsdestotrotz ist mit der Untersuchung der Wirkung von ONX auf Neurone ein wichtiger Teilschritt in seiner Evaluation als Alternative zu BZ erfolgt. Eine weniger toxische Wirkung auf neuronale Zellen lässt auf eine geringere Ausprägung der PN in der Therapie des MM hoffen. BZ wirkt in seinen effektiven Konzentrationen nämlich nicht nur auf Tumorzellen des MM, sondern auch toxisch auf gesunde Zellen als off-target-Effekt. Eine weitere Dosissteigerung zur Therapieoptimierung wird dadurch unmöglich. Immunzellen, in denen das Immunoproteasom vermehrt exprimiert wird (Kim et al. 2014), sind

anfälliger für die Apoptose durch die selektive LMP7-Inhibition mit ONX. Eine gezielte Immunmodulation, mit geringerer einhergehender Zytotoxizität für andere Zellarten, wird daher durch den Immunoproteasom-Inhibitor ONX ermöglicht. Besonders bei entzündlichen Erkrankungen spielt die vermehrte Expression des Immunoproteasoms und damit seine Inhibition als therapeutische Option eine Rolle (Griffin et al. 1998). In Autoimmun-Modellen konnte die Zytokinproduktion, die Antikörpersekretion autoreaktiver Zellen und die humorale Immunantwort durch ONX blockiert werden (Muchamuel et al. 2009, Ichikawa et al. 2012, Liu R-T et al. 2017). Untersuchungen, ob ONX auch auf pathologische hämatopoetische Zellen einen Einfluss hat, stehen noch am Anfang. Für eine Zelllinie von MM-Zellen konnte bereits die Zell-Penetration und selektive LMP7-Inhibition von ONX-Analoga gezeigt werden (Bruin et al. 2014). Ein Effekt von ONX auf die Immunologie peripherer Blutzellen (PBMC) bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität auf Nichtimmunzellen wurde ebenfalls nachgewiesen (Eleftheriadis et al. 2017).

Der bisherige Stand der Forschung, in Kombination mit den Erkenntnissen dieser Arbeit, deutet auf eine effektive Zytotoxizität von ONX auf MM-Zellen bei gleichzeitiger reduzierter Neurotoxizität hin. Um letztendlich eine Aussage über den Vorteil von ONX in der Therapie des MM treffen zu können, stehen vergleichende präklinische und klinische Studien mit BZ aus. Hier sollte die Inhibition der Proliferation von Tumorzellen für beide Inhibitoren auf die gleiche Zellreihe ermittelt werden. Für BZ wurden bereits je nach MM-Zelllinie stark variierende Werte der IC_{50} zwischen $0.2 \mu\text{M}$ und $26 \mu\text{M}$ nach 1 h Behandlungszeit festgestellt (Dettmer et al. 2016). Klinisch müssen vergleichende Studien über das Therapieergebnis von Patienten mit Erfassung der peripheren Neuropathie nach Behandlung mit BZ und ONX angeschlossen werden.

Die momentane Forschung entwickelt bereits weitere selektive Inhibitoren, die auch die selektive Inhibition anderer Untereinheiten des konstitutiven Standardproteasoms und des Immunoproteasoms zum Ziel haben (Ettari et al. 2017). Die Suche nach einem potenten Heilmittel maligner hämatologischer Erkrankungen bleibt weiterhin eine hohe Priorität.

5. Zusammenfassung

Das **Multiple Myelom (MM)** ist eine maligne hämatologische Erkrankung des Menschen. Erst in den letzten 10 bis 15 Jahren konnte eine Verbesserung der Krankheitsprognose erzielt werden. Dazu beigetragen hat besonders die **Therapie mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib (BZ)**. Sein spezieller Wirkmechanismus führt über die Hemmung des UPS zur Akkumulation ubiquitiniertes Proteinabbauprodukte und letztendlich zum **Zusammenbruch der Zellhomöostase in Tumorzellen**. Eine häufige **Nebenwirkung** des Chemotherapeutikums ist die **periphere Neuropathie**. Parästhesien, Sensibilitätsstörungen und motorische Beeinträchtigung bewirken eine deutliche Abnahme der Lebensqualität der Patienten und führen oft zum Abbruch der Behandlung.

Die gezielte Hemmung des **Immunoproteasoms** ist ein **neuer Ansatz** in der Entwicklung der Chemotherapie von Tumorerkrankungen wie dem MM. Durch den spezifischen Angriff der induzierten Untereinheit **LMP7** könnte **ONX-0914 (ONX)** den Vorteil eines verminderten Nebenwirkungsprofils im Vergleich zu BZ aufweisen. Die Wirksamkeit von ONX ist bereits präklinisch bei Autoimmunkrankheiten gezeigt worden, allerdings steht eine weitere Evaluation für Zwecke der Chemotherapie noch aus. Da die periphere Neuropathie die limitierende UAW von BZ darstellt, liegt es nahe, die **Wirkung von ONX auf neuronale Zellen** zu untersuchen, um einen Vergleich der toxischen Potenz beider Pharmaka zu erreichen.

Unter dieser Zielstellung wurde das experimentelle Design dieser Arbeit gestaltet. Als Versuchorganismus dienten **kortikale Primärkulturen der Ratte**. Diese wurden an DIV 14 mit BZ und ONX in verschiedenen Konzentrationen behandelt, über 24 h und 48 h mit den Pharmaka inkubiert und anschließend für **immunzytochemische oder proteinbiochemische Methoden** aufbereitet.

Mittels Immunzytochemie wurde mikroskopisch die **Zellzahl** vergleichend analysiert. Hierbei zeigten sich nach 24 h keine toxischen Effekte, wohingegen nach 48 h die Zellzahl durch Behandlung mit BZ schon in Konzentrationen ab 0.01 μM deutlich reduziert wurde. Im Vergleich dazu trat dieser Effekt nach Behandlung mit ONX erst bei 0.5 μM ein. In einer **Dosis-Wirkungs-Kurve** wurde die Relation zwischen

Konzentration und Zellzahlminderung und damit respektive Zelltod dargestellt. Die LC_{50} von BZ lag demnach bei ca. $0.007 \mu\text{M}$ und von ONX bei $0.121 \mu\text{M}$.

Die Erfassung von Veränderungen der **Zellmorphologie** nach Immunfluoreszenzfärbung diente der Charakterisierung des toxischen Potentials der Chemotherapeutika und der Festlegung pharmakologischer Schwellenwerte.

Für 24 h waren die Werte wie folgt:

- | | | | |
|------------|--------------------|-----------|-------------------|
| • BZ NOAEL | 0.01 μM | ONX NOAEL | 0.5 μM |
| • BZ LOAEL | 0.05 μM | ONX LOAEL | 1.0 μM |
| • BZ LC | - | ONX LC | - |

Für 48 h konnten folgende Werte ermittelt werden:

- | | | | |
|------------|---------------------|-----------|---|
| • BZ NOAEL | 0.001 μM | ONX NOAEL | 0.1 μM |
| • BZ LOAEL | 0.01 μM | ONX LOAEL | $0.1 \mu\text{M} < x < 0.5 \mu\text{M}$ |
| • BZ LC | 0.1 μM | ONX LC | 0.5 μM |

Auch **Veränderungen in der Synapsendichte**, mit Hinweisen auf eine Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kommunikation, wurden mittels Immunzytochemie betrachtet. Bei einer Konzentration von $0.01 \mu\text{M}$, mit einer Behandlungszeit von 48 h, reduzierte BZ das Synaptophysin-Signal signifikant im Vergleich zu ONX.

Die Analyse der **Proteinexpressionslevel wichtiger Struktur- und Signalproteine** ergab insgesamt eine stärkere Signalminderung durch BZ bei CREB, phospho-CREB, NF κ B, Synaptophysin, AMPAR, GFAP und β -Aktin als durch ONX. Caspase 3 zeigte eine Expressionssteigerung durch BZ, die stärker war als nach Behandlung mit ONX. Keine signifikanten Signaländerungen waren bei $\alpha 6$ und Iba 1 beobachtbar. **Veränderungen im Prozess der Phosphorylierung** von CREB, durch Untersuchung des Verhältnisses von phospho-CREB zu CREB waren nur bei 48h $0.01 \mu\text{M}$ ONX signifikant nachweisbar.

Ein vermutetes **geringeres Nebenwirkungsprofil von ONX** in Bezug auf neuronale Zellen scheint damit **möglich** zu sein. Um vermehrt Erkenntnisse über das neurotoxische Potenzial des Immunoproteasom-Inhibitors ONX zu erhalten, sind jedoch weitere Experimente, vor allem mit Kulturen peripherer Nervenzellen sowie *in vivo* Experimente, durchzuführen. Auch die Wirkung von ONX auf das MM muss noch evaluiert werden. Mit dieser Arbeit ist ein weiterer wichtiger Schritt zur Erforschung von Immunoproteasom-Inhibitoren erfolgt.

6. Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel

"Low neurotoxicity of ONX supports the idea of specific immunoproteasome inhibition as a side-effect-limiting, therapeutic strategy."

durch folgende Autoren

Laura von Brzezinski ¹, Paula Säring ¹, Peter Landgraf ¹, Clemens Cammann ²,
Ulrike Seifert ², Daniela C. Dieterich ^{1,3}

(**1** Neural Plasticity and Communication, Institute for Pharmacology and Toxicology, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, Magdeburg, Germany, **2** Friedrich Loeffler Institute for Medical Microbiology, Greifswald, Germany, **3** Center for Behavioral Brain Sciences, Magdeburg, Germany)

in der Zeitschrift

"European Journal of Microbiology and Immunology, Volume 7, Issue 3, Pages 234-245",

unter der DOI: 10.1556/1886.2017.00025 veröffentlicht.

7. Literaturverzeichnis

1. Adams J: The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*. 5. 417–421 (2004).
2. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research*. 59. 2615–2622 (1999).
3. Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J, Elliott PJ, Sabbatini P, Miller V, Hensley ML, Pezzulli S, Canales C, Daud A, Spriggs DR: A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 8. 2505–2511 (2002).
4. Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A: Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *Journal of biochemistry*. 115. 257–269 (1994).
5. Ale A, Bruna J, Morell M, van de Velde H, Monbaliu J, Navarro X, Udina E: Treatment with anti-TNF alpha protects against the neuropathy induced by the proteasome inhibitor bortezomib in a mouse model. *Experimental neurology*. 253. 165–173 (2014).
6. Ale A, Bruna J, Navarro X, Udina E: Neurotoxicity induced by antineoplastic proteasome inhibitors. *Neurotoxicology*. 43. 28–35 (2014).
7. Almond JB, Cohen GM: The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 16. 433–443 (2002).
8. Althof N, Goetzke CC, Kespohl M, Voss K, Heuser A, Pinkert S, Kaya Z, Klingel K, Beling A: The immunoproteasome-specific inhibitor ONX 0914 reverses susceptibility to acute viral myocarditis. *EMBO molecular medicine* (2018).
9. Bachmann HS, Novotny J, Sixt S, Liebisch P, Frey UH, Duhrsen U, Siffert W, Nuckel H: The G-Allele of the PSMA6-8CG polymorphism is associated with poor outcome in multiple myeloma independently of circulating proteasome serum levels. *European journal of haematology*. 85. 108–113 (2010).
10. Bajic N, Jenner P, Ballard CG, Francis PT: Proteasome inhibition leads to early loss of synaptic proteins in neuronal culture. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 119. 1467–1476 (2012).

11. Bakitas MA: Background noise: the experience of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Nursing research*. 56. 323–331 (2007).
12. Banker G, Goslin K: Developments in neuronal cell culture. *Nature*. 336. 185–186 (1988).
13. Barut BA, Zon LI, Cochran MK, Paul SR, Chauhan D, Mohrbacher A, Fingerroth J, Anderson KC: Role of interleukin 6 in the growth of myeloma-derived cell lines. *Leukemia research*. 16. 951–959 (1992).
14. Basler M, Dajee M, Moll C, Groettrup M, Kirk CJ: Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 185. 634–641 (2010).
15. Basler M, Mundt S, Bitzer A, Schmidt C, Groettrup M: The immunoproteasome. A novel drug target for autoimmune diseases. *Clinical and experimental rheumatology*. 33. S74-9 (2015).
16. Basler M, Mundt S, Muchamuel T, Moll C, Jiang J, Groettrup M, Kirk CJ: Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *EMBO molecular medicine*. 6. 226–238 (2014).
17. Bingol B, Schuman EM: Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature*. 441. 1144–1148 (2006).
18. Borissenko L, Groll M: 20S proteasome and its inhibitors. Crystallographic knowledge for drug development. *Chemical reviews*. 107. 687–717 (2007).
19. Brewer GJ, Price PJ: Viable cultured neurons in ambient carbon dioxide and hibernation storage for a month. *Neuroreport*. 7. 1509–1512 (1996).
20. Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, Bradley S, Gobburu JV, Goheer A, Lee S-L, Leighton J, Liang CY, Lostritto RT, McGuinn WD, Morse DE, Rahman A, Rosario LA, Verbois SL, Williams G, Wang Y-C, Pazdur R: Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 10. 3954–3964 (2004).
21. Broyl A, Corthals SL, Jongen JLM, van der Holt B, Kuiper R, Knegt Y de, van Duin M, el Jarari L, Bertsch U, Lokhorst HM, Durie BG, Goldschmidt H, Sonneveld P: Mechanisms of peripheral neuropathy associated with bortezomib and vincristine in patients with newly diagnosed multiple myeloma. A prospective analysis of data from the HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *The Lancet Oncology*. 11. 1057–1065 (2010).

22. Bruin G de, Huber EM, Xin B-T, van Rooden EJ, Al-Ayed K, Kim K-B, Kisselev AF, Driessen C, van der Stelt M, van der Marel GA, Groll M, Overkleeft HS: Structure-based design of β 1i or β 5i specific inhibitors of human immunoproteasomes. *Journal of medicinal chemistry*. 57. 6197–6209 (2014).
23. Bruna J, Udina E, Ale A, Vilches JJ, Vynckier A, Monbaliu J, Silverman L, Navarro X: Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice. *Experimental neurology*. 223. 599–608 (2010).
24. Burnette WN: Western blotting: remembrance of things past. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1312. 9–12 (2015).
25. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR: Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol*. 25. 821–828 (1996).
26. Carozzi VA, Renn CL, Bardini M, Fazio G, Chiorazzi A, Meregalli C, Oggioni N, Shanks K, Quartu M, Serra MP, Sala B, Cavaletti G, Dorsey SG: Bortezomib-induced painful peripheral neuropathy: an electrophysiological, behavioral, morphological and mechanistic study in the mouse. *PloS one*. 8. e72995 (2013).
27. Chauhan D, Li G, Shringarpure R, Podar K, Ohtake Y, Hideshima T, Anderson KC: Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer research*. 63. 6174–6177 (2003).
28. Chauhan D, Singh AV, Aujay M, Kirk CJ, Bandi M, Ciccarelli B, Raje N, Richardson P, Anderson KC: A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 116. 4906–4915 (2010).
29. Cheever TR, Ervasti JM: Actin isoforms in neuronal development and function. *International review of cell and molecular biology*. 301. 157–213 (2013).
30. Chen X, Zhang X, Wang Y, Lei H, Su H, Zeng J, Pei Z, Huang R: Inhibition of immunoproteasome reduces infarction volume and attenuates inflammatory reaction in a rat model of ischemic stroke. *Cell death & disease*. 6. e1626 (2015).
31. Chou B, Hisaeda H, Shen J, Duan X, Imai T, Tu L, Murata S, Tanaka K, Himeno K: Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. *Microbes and infection*. 10. 241–250 (2008).

32. Csizmadia V, Csizmadia E, Silverman L, Simpson C, Raczynski A, O'Brien L, Gallacher M, Cardoza K, Kadambi VJ, Fedyk ER, Alden CL: Effect of proteasome inhibitors with different chemical structures on the ubiquitin-proteasome system in vitro. *Veterinary pathology*. 47. 358–367 (2010).
33. Dettmer S, Theile D, Schäfer J, Seckinger A, Burhenne J, Weiss J: Proteasome inhibition correlates with intracellular bortezomib concentrations but not with antiproliferative effects after bolus treatment in myeloma cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 389. 1091–1101 (2016).
34. Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie: Multiples Myelom — Onkopedia.
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@view/html/index.html>, zuletzt geprüft am: 16.10.2017.
35. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A, Joshua D, Pour L, Hajek R, Facon T, Ludwig H, Oriol A, Goldschmidt H, Rosinol L, Straub J, Suvorov A, Araujo C, Rimashevskaya E, Pika T, Gaidano G, Weisel K, Goranova-Marinova V, Schwarzer A, Minuk L, Masszi T, Karamanesht I, Offidani M, Hungria V, Spencer A, Orlowski RZ, Gillenwater HH, Mohamed N, Feng S, Chng W-J: Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *The Lancet Oncology*. 17. 27–38 (2016).
36. Domnina LV, Ivanova OY, Pletjushkina OY, Fetisova EK, Chernyak BV, Skulachev VP, Vasiliev JM: Marginal blebbing during the early stages of TNF-induced apoptosis indicates alteration in actomyosin contractility. *Cell biology international*. 28. 471–475 (2004).
37. Dou QP, Zonder JA: Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies. Perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Current cancer drug targets*. 14. 517–536 (2014).
38. Drexler HC: Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94. 855–860 (1997).
39. Drexler HC, Risau W, Konerding MA: Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 14. 65–77 (2000).
40. Ebstein F, Kloetzel P-M, Kruger E, Seifert U: Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 69. 2543–2558 (2012).
 41. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadi G, Liakopoulos V, Stefanidis I: A comparative analysis between proteasome and immunoproteasome inhibition in cellular and humoral alloimmunity. *International immunopharmacology*. 50. 48–54 (2017).
 42. Erturk A, Wang Y, Sheng M: Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 34. 1672–1688 (2014).
 43. Ettari R, Previti S, Bitto A, Grasso S, Zappala M: Immunoproteasome-Selective Inhibitors: A Promising Strategy to Treat Hematologic Malignancies, Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Current medicinal chemistry*. 23. 1217–1238 (2016).
 44. Ettari R, Zappalà M, Grasso S, Musolino C, Innao V, Allegra A: Immunoproteasome-selective and non-selective inhibitors: A promising approach for the treatment of multiple myeloma. *Pharmacology & therapeutics* (2017).
 45. Ferrington DA, Gregerson DS: Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Progress in molecular biology and translational science*. 109. 75–112 (2012).
 46. Fiala JC, Spacek J, Harris KM: Dendritic spine pathology. Cause or consequence of neurological disorders? *Brain research. Brain research reviews*. 39. 29–54 (2002).
 47. Foran E, Kwon DY, Nofziger JH, Arnold ES, Hall MD, Fischbeck KH, Burnett BG: CNS uptake of bortezomib is enhanced by P-glycoprotein inhibition. Implications for spinal muscular atrophy. *Neurobiology of disease*. 88. 118–124 (2016).
 48. Gallagher SR: One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current protocols in cell biology*. Chapter 6. Unit 6.1 (2007).
 49. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF: Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 28. 1317–1330 (2014).
 50. Gilda JE, Gomes AV: Proteasome dysfunction in cardiomyopathies. *The Journal of physiology* (2017).

51. Gonzalez GA, Montminy MR: Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. 59. 675–680 (1989).
52. Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Kaer LV, Monaco JJ, Colbert RA: Immunoproteasome assembly. Cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *The Journal of experimental medicine*. 187. 97–104 (1998).
53. Grigoreva TA, Tribulovich VG, Garabadzhiu AV, Melino G, Barlev NA: The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies. *Oncotarget*. 6. 24733–24749 (2015).
54. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M: Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nature reviews. Immunology*. 10. 73–78 (2010).
55. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D: A gated channel into the proteasome core particle. *Nature structural biology*. 7. 1062–1067 (2000).
56. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB: Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of disease*. 34. 1–10 (2009).
57. Hegde AN, Inokuchi K, Pei W, Casadio A, Ghirardi M, Chain DG, Martin KC, Kandel ER, Schwartz JH: Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell*. 89. 115–126 (1997).
58. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH: The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *Journal of Biological Chemistry*. 272. 25200–25209 (1997).
59. Hemeryck A, Geerts R, Monbaliu J, Hassler S, Verhaeghe T, Diels L, Verluyten W, van Beijsterveldt L, Mamidi RNVS, Janssen C, Coster R de: Tissue distribution and depletion kinetics of bortezomib and bortezomib-related radioactivity in male rats after single and repeated intravenous injection of ¹⁴C-bortezomib. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 60. 777–787 (2007).
60. Herold G: Herold's internal medicine. [a lecture oriented systematic and accurate representation of the complete topic catalogue for the medical examination for physicians]. Herold. Köln (2011).
61. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N, Anderson KC: Molecular

- mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*. 101. 1530–1534 (2003).
62. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer research*. 61. 3071–3076 (2001).
63. Hodgson E: *A Textbook of Modern Toxicology (Third Edition)*. pp. 584. Wiley-Interscience. S.l. (2004).
64. Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk CJ, Groettrup M, Groll M: Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell*. 148. 727–738 (2012).
65. Huber EM, Bruin G de, Heinemeyer W, Paniagua Soriano G, Overkleeft HS, Groll M: Systematic Analyses of Substrate Preferences of 20S Proteasomes Using Peptidic Epoxyketone Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*. 137. 7835–7842 (2015).
66. Huber EM, Heinemeyer W, Bruin G de, Overkleeft HS, Groll M: A humanized yeast proteasome identifies unique binding modes of inhibitors for the immunosubunit beta5i. *The EMBO journal*. 35. 2602–2613 (2016).
67. Ichikawa HT, Conley T, Muchamuel T, Jiang J, Lee S, Owen T, Barnard J, Nevarez S, Goldman BI, Kirk CJ, Looney RJ, Anolik JH: Beneficial effect of novel proteasome inhibitors in murine lupus via dual inhibition of type I interferon and autoantibody-secreting cells. *Arthritis and rheumatism*. 64. 493–503 (2012).
68. Ippolito DM, Eroglu C: Quantifying synapses: an immunocytochemistry-based assay to quantify synapse number. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2010).
69. Ivanov DP, Al-Rubai A-J, Grabowska AM, Pratten MK: Separating chemotherapy-related developmental neurotoxicity from cytotoxicity in monolayer and neurosphere cultures of human fetal brain cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 37. 88–96 (2016).
70. Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, Siegel D, Irwin D, Richardson PG, Niesvizky R, Alexanian R, Limentani SA, Alsina M, Adams J, Kauffman M, Esseltine D-L, Schenkein DP, Anderson KC: A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *British journal of haematology*. 127. 165–172 (2004).
71. Jagannath S, Barlogie B, Berenson JR, Siegel DS, Irwin D, Richardson PG, Niesvizky R, Alexanian R, Limentani SA, Alsina M, Esseltine D-L, Anderson KC: Updated survival

- analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *British journal of haematology*. 143. 537–540 (2008).
72. Janicke RU: Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 273. 9357–9360 (1998).
73. Joh T, Sigematu K, Yasui J-I, Takasaki Y, Tawara M, Takahara O, Tomonaga M: Dorsal Column Degeneration after Bortezomib Therapy in a Patient with Multiple Myeloma. *Case reports in oncology*. 2. 184–188 (2009).
74. Jordan K, Proskorovsky I, Lewis P, Ishak J, Payne K, Lordan N, Kyriakou C, Williams CD, Peters S, Davies FE: Effect of general symptom level, specific adverse events, treatment patterns, and patient characteristics on health-related quality of life in patients with multiple myeloma: results of a European, multicenter cohort study. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. 22. 417–426 (2014).
75. Kalim KW, Basler M, Kirk CJ, Groettrup M: Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 189. 4182–4193 (2012).
76. Kalogeris TJ, Laroux FS, Cockrell A, Ichikawa H, Okayama N, Phifer TJ, Alexander JS, Grisham MB: Effect of selective proteasome inhibitors on TNF-induced activation of primary and transformed endothelial cells. *The American journal of physiology*. 276. C856-64 (1999).
77. Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C: Mechanism of synapse redox stress in Okadaic acid (ICV) induced memory impairment: Role of NMDA receptor. *Neurochemistry international*. 76. 32–41 (2014).
78. Karin M, Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annual review of immunology*. 18. 621–663 (2000).
79. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H: Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*. 332. 83–85 (1988).
80. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 26. 239–257 (1972).

81. Kiba T, Ito T, Nakashima T, Okikawa Y, Kido M, Kimura A, Kameda K, Miyamae F, Tanaka S, Atsumi M, Sumitani Y, Shitakubo Y, Niimi H: Bortezomib and dexamethasone for multiple myeloma: higher AST and LDH levels associated with a worse prognosis on overall survival. *BMC cancer*. 14. 462 (2014).
82. Kim M-S, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kelkar DS, Isserlin R, Jain S, Thomas JK, Muthusamy B, Leal-Rojas P, Kumar P, Sahasrabudhe NA, Balakrishnan L, Advani J, George B, Renuse S, Selvan LDN, Patil AH, Nanjappa V, Radhakrishnan A, Prasad S, Subbannayya T, Raju R, Kumar M, Sreenivasamurthy SK, Marimuthu A, Sathe GJ, Chavan S, Datta KK, Subbannayya Y, Sahu A, Yelamanchi SD, Jayaram S, Rajagopalan P, Sharma J, Murthy KR, Syed N, Goel R, Khan AA, Ahmad S, Dey G, Mudgal K, Chatterjee A, Huang T-C, Zhong J, Wu X, Shaw PG, Freed D, Zahari MS, Mukherjee KK, Shankar S, Mahadevan A, Lam H, Mitchell CJ, Shankar SK, Satishchandra P, Schroeder JT, Sirdeshmukh R, Maitra A, Leach SD, Drake CG, Halushka MK, Prasad TSK, Hruban RH, Kerr CL, Bader GD, Iacobuzio-Donahue CA, Gowda H, Pandey A: A draft map of the human proteome. *Nature*. 509. 575–581 (2014).
83. Klenikova VA, Pevzner LZ: Cytospectrophotometric evaluation of Amido Black staining of proteins in nervous tissue cells. *Microscopica acta*. 82. 207–214 (1979).
84. Kloetzel PM: Antigen processing by the proteasome. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2. 179–187 (2001).
85. Koerner J, Brunner T, Groettrup M: Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice. *Oncotarget* (2017).
86. Kornitzer D, Ciechanover A: Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *Journal of cellular physiology*. 182. 1–11 (2000).
87. Kremer M, Henn A, Kolb C, Basler M, Moebius J, Guillaume B, Leist M, van den Eynde BJ, Groettrup M: Reduced immunoproteasome formation and accumulation of immunoproteasomal precursors in the brains of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 185. 5549–5560 (2010).
88. Kruger E, Kloetzel P-M: Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Current opinion in immunology*. 24. 77–83 (2012).

89. Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P: Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends in neurosciences*. 23. 291–297 (2000).
90. Kuehl WM, Bergsagel PL: Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature reviews. Cancer*. 2. 175–187 (2002).
91. Kuhn DJ, Hunsucker SA, Chen Q, Voorhees PM, Orlowski M, Orlowski RZ: Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood*. 113. 4667–4676 (2009).
92. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 113. 5412–5417 (2009).
93. Landowski TH, Megli CJ, Nullmeyer KD, Lynch RM, Dorr RT: Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer research*. 65. 3828–3836 (2005).
94. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neuberg D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC: Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer research*. 62. 4996–5000 (2002).
95. Lee A-H, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH: Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100. 9946–9951 (2003).
96. Lee B, Cao R, Choi Y-S, Cho H-Y, Rhee AD, Hah CK, Hoyt KR, Obrietan K: The CREB/CRE transcriptional pathway: protection against oxidative stress-mediated neuronal cell death. *Journal of neurochemistry*. 108. 1251–1265 (2009).
97. Liu H, Wan C, Ding Y, Han R, He Y, Xiao J, Hao J: PR-957, a selective inhibitor of immunoproteasome subunit low-MW polypeptide 7, attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing Th17 cell differentiation and regulating cytokine production. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* (2017).
98. Liu R-T, Zhang P, Yang C-L, Pang Y, Zhang M, Zhang N, Yue L-T, Li X-L, Li H, Duan R-S: ONX-0914, a selective inhibitor of immunoproteasome, ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by modulating humoral response. *Journal of Neuroimmunology*. 311. 71–78 (2017).

99. Lonze BE, Ginty DD: Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron*. 35. 605–623 (2002).
100. Lü L, Wang H: Transient focal cerebral ischemia upregulates immunoproteasomal subunits. *Cellular and molecular neurobiology*. 32. 965–970 (2012).
101. Lü S, Yang J, Song X, Gong S, Zhou H, Guo L, Song N, Bao X, Chen P, Wang J: Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 326. 423–431 (2008).
102. Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, Takasawa K, Ohtsuki T, Xia Z, Storm D, Yanagihara T, Hori M, Matsumoto M: Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 21. 9204–9213 (2001).
103. Maren S, Tocco G, Standley S, Baudry M, Thompson RF: Postsynaptic factors in the expression of long-term potentiation (LTP). Increased glutamate receptor binding following LTP induction in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90. 9654–9658 (1993).
104. McCarthy MK, Weinberg JB: The immunoproteasome and viral infection. A complex regulator of inflammation. *Frontiers in microbiology*. 6. 21 (2015).
105. McLean IW, Nakane PK: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 22. 1077–1083 (1974).
106. Metzler I von, Krebbel H, Hecht M, Manz RA, Fleissner C, Mieth M, Kaiser M, Jakob C, Sterz J, Kleeberg L, Heider U, Sezer O: Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. *Leukemia*. 21. 2025–2034 (2007).
107. Miller Z, Ao L, Kim KB, Lee W: Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions. *Current pharmaceutical design*. 19. 4140–4151 (2013).
108. Miltenburg NC, Boogerd W: Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer treatment reviews*. 40. 872–882 (2014).
109. Mincheva-Tasheva S, Soler RM: NF-kappaB signaling pathways: role in nervous system physiology and pathology. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 19. 175–194 (2013).

110. Mitsiades CS, Mitsiades N, Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC: Proteasome inhibition as a therapeutic strategy for hematologic malignancies. *Expert review of anticancer therapy*. 5. 465–476 (2005).
111. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Treon SP, Munshi NC, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC: Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99. 14374–14379 (2002).
112. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai Y-T, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Schlossman R, Munshi NC, Hideshima T, Anderson KC: The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents. *Therapeutic applications*. *Blood*. 101. 2377–2380 (2003).
113. Moreau P, Pylypenko H, Grosicki S, Karamanesht I, Leleu X, Grishunina M, Rekhtman G, Masliak Z, Robak T, Shubina A, Arnulf B, Kropff M, Cavet J, Esseltine D-L, Feng H, Girgis S, van de Velde H, Deraedt W, Harousseau J-L: Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. A randomised, phase 3, non-inferiority study. *The Lancet Oncology*. 12. 431–440 (2011).
114. Moritz KE, McCormack NM, Abera MB, Viollet C, Yauger YJ, Sukumar G, Dalgard CL, Burnett BG: The role of the immunoproteasome in interferon- γ -mediated microglial activation. *Scientific reports*. 7. 9365 (2017).
115. Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, Lauer C, Sylvain C, Ring ER, Shields J, Jiang J, Shwonek P, Parlanti F, Demo SD, Bennett MK, Kirk CJ, Groettrup M: A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature medicine*. 15. 781–787 (2009).
116. Nagayama Y, Nakahara M, Shimamura M, Horie I, Arima K, Abiru N: Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. *Clinical and experimental immunology*. 168. 268–273 (2012).
117. Naujokat C, Hoffmann S: Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 82. 965–980 (2002).

118. Noda C, Tanahashi N, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K: Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 277. 348–354 (2000).
119. O'Connor OA, Stewart AK, Vallone M, Molineaux CJ, Kunkel LA, Gerecitano JF, Orłowski RZ: A phase 1 dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of the novel proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in patients with hematologic malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 15. 7085–7091 (2009).
120. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, Scheffer GL, Debipersad K, Vojtekova K, Lemos C, van der Heijden, Joost W, Ylstra B, Peters GJ, Kaspers GL, Dijkmans BAC, Scheper RJ, Jansen G: Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*. 112. 2489–2499 (2008).
121. Oikawa T, Sasaki T, Nakamura M, Shimamura M, Tanahashi N, Omura S, Tanaka K: The proteasome is involved in angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 246. 243–248 (1998).
122. Oldziej A, Bolkun L, Galar M, Kalita J, Ostrowska H, Romaniuk W, Kloczko J: Assessment of proteasome concentration and chymotrypsin-like activity in plasma of patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia research*. 38. 925–930 (2014).
123. Opitz E, Koch A, Klingel K, Schmidt F, Prokop S, Rahnefeld A, Sauter M, Heppner FL, Volker U, Kandolf R, Kuckelkorn U, Stangl K, Kruger E, Kloetzel PM, Voigt A: Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. *PLoS pathogens*. 7. e1002233 (2011).
124. Orłowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine D-L, Elliott PJ, Pien CS, Guerciolini R, Anderson JK, Depcik-Smith ND, Bhagat R, Lehman MJ, Novick SC, O'Connor OA, Soignet SL: Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 20. 4420–4427 (2002).
125. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, Hernández-Navarro VE, Sánchez-López AL, Alatorre-Jiménez MA: Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Archives of medical research*. 45. 687–697 (2014).

126. Ozaki S, Harada T, Saitoh T, Shimazaki C, Itagaki M, Asaoku H, Kuroda Y, Chou T, Yoshiki Y, Suzuki K, Murakami H, Hayashi K, Mina R, Palumbo A, Shimizu K: Survival of multiple myeloma patients aged 65-70 years in the era of novel agents and autologous stem cell transplantation. A multicenter retrospective collaborative study of the Japanese Society of Myeloma and the European Myeloma Network. *Acta haematologica*. 132. 211–219 (2014).
127. Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, Pien CS, Millikan RE, Tu S-M, Pagliaro L, Kim J, Adams J, Elliott P, Esseltine D, Petrusich A, Dieringer P, Perez C, Logothetis CJ: Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 22. 2108–2121 (2004).
128. Pekol T, Daniels JS, Labutti J, Parsons I, Nix D, Baronas E, Hsieh F, Gan L-S, Miwa G: Human metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib: identification of circulating metabolites. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 33. 771–777 (2005).
129. Piccinini M, Mostert M, Croce S, Baldovino S, Papotti M, Rinaudo MT: Interferon- γ -inducible subunits are incorporated in human brain 20S proteasome. *Journal of Neuroimmunology*. 135. 135–140 (2003).
130. Pike CT, Birnbaum HG, Muehlenbein CE, Pohl GM, Natale RB: Healthcare costs and workloss burden of patients with chemotherapy-associated peripheral neuropathy in breast, ovarian, head and neck, and nonsmall cell lung cancer. *Chemotherapy research and practice*. 2012. 913848 (2012).
131. Podar K, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC: Targeting signalling pathways for the treatment of multiple myeloma. *Expert opinion on therapeutic targets*. 9. 359–381 (2005).
132. Pregi N, Belluscio LM, Berardino BG, Castillo DS, Canepa ET: Oxidative stress-induced CREB upregulation promotes DNA damage repair prior to neuronal cell death protection. *Molecular and cellular biochemistry*. 425. 9–24 (2017).
133. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC: Multiple myeloma. *The Lancet*. 374. 324–339 (2009).
134. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orlovski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine D-L, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC: A

- phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine*. 348. 2609–2617 (2003).
135. Richardson PG, Briemberg H, Jagannath S, Wen PY, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Siegel DS, Irwin D, Schuster M, Srkalovic G, Alexanian R, Rajkumar SV, Limentani S, Alsina M, Orłowski RZ, Najarian K, Esseltine D, Anderson KC, Amato AA: Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 24. 3113–3120 (2006).
136. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau J-L, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC: Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 352. 2487–2498 (2005).
137. Richardson PG, Xie W, Mitsiades C, Chanan-Khan AA, Lonial S, Hassoun H, Avigan DE, Oaklander AL, Kuter DJ, Wen PY, Kesari S, Briemberg HR, Schlossman RL, Munshi NC, Heffner LT, Doss D, Esseltine D-L, Weller E, Anderson KC, Amato AA: Single-agent bortezomib in previously untreated multiple myeloma: efficacy, characterization of peripheral neuropathy, and molecular correlations with response and neuropathy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 27. 3518–3525 (2009).
138. Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM: Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience*. 274. 308–317 (2014).
139. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos M-V, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG: Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 359. 906–917 (2008).
140. Sant M, Allemani C, Tereanu C, Angelis R de, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadie M, Simonetti A, Lutz J-M, Berrino F: Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 116. 3724–3734 (2010).

141. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 9. 676–682 (2012).
142. Schmidt N, Gonzalez E, Visekruna A, Kuhl AA, Loddenkemper C, Mollenkopf H, Kaufmann SHE, Steinhoff U, Joeris T: Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. *Gut*. 59. 896–906 (2010).
143. Seidl S, Kaufmann H, Drach J: New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. 4. 557–564 (2003).
144. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schroter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel P-M, Kruger E: Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell*. 142. 613–624 (2010).
145. Selkoe DJ: Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature cell biology*. 6. 1054–1061 (2004).
146. Shah SA, Potter MW, McDade TP, Ricciardi R, Perugini RA, Elliott PJ, Adams J, Callery MP: 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 82. 110–122 (2001).
147. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, Dewald G, Kirsch IR, Bergsagel PL, Kuehl WM: Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97. 228–233 (2000).
148. Siegel GJ (ed.): *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. Vol. 7th ed. Elsevier. Amsterdam, Boston (2006).
149. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: *Cancer Statistics, 2017*. CA: a cancer journal for clinicians. 67. 7–30 (2017).
150. Singh AV, Bandi M, Aujay MA, Kirk CJ, Hark DE, Raje N, Chauhan D, Anderson KC: PR-924, a selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP-7, blocks multiple myeloma cell growth both in vitro and in vivo. *British journal of haematology*. 152. 155–163 (2011).
151. Sonneveld P, Asselbergs E, Zweegman S, van der Holt B, Kersten MJ, Vellenga E, van Marwijk-Kooy M, Broyl A, Weerdt O de, Lonergan S, Palumbo A, Lokhorst H: Phase 2

- study of carfilzomib, thalidomide, and dexamethasone as induction/consolidation therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 125. 449–456 (2015).
152. Sonneveld P, Wit E de, Moreau P: How have evolutions in strategies for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma translated into improved outcomes for patients? *Critical reviews in oncology/hematology*. 112. 153–170 (2017).
153. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Masszi T, Spicka I, Oriol A, Hajek R, Rosinol L, Siegel DS, Mihaylov GG, Goranova-Marinova V, Rajnics P, Suvorov A, Niesvizky R, Jakubowiak AJ, San-Miguel JF, Ludwig H, Wang M, Maisnar V, Minarik J, Bensinger WI, Mateos M-V, Ben-Yehuda D, Kukreti V, Zojwalla N, Tonda ME, Yang X, Xing B, Moreau P, Palumbo A: Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 372. 142–152 (2015).
154. Stohwasser R, Giesebrecht J, Kraft R, Müller EC, Häusler KG, Kettenmann H, Hanisch UK, Kloetzel PM: Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia. Induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Glia*. 29. 355–365 (2000).
155. Strehl B, Joeris T, Rieger M, Visekruna A, Textoris-Taube K, Kaufmann SHE, Kloetzel P-M, Kuckelkorn U, Steinhoff U: Immunoproteasomes Are Essential for Clearance of *Listeria monocytogenes* in Nonlymphoid Tissues but Not for Induction of Bacteria-Specific CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*. 177. 6238–6244 (2006).
156. Takuma K, Baba A, Matsuda T: Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in neurobiology*. 72. 111–127 (2004).
157. Towbin H: Blotting from Immobilized pH Gradient Gels: Application to Total Cell Lysates. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1312. 321–326 (2015).
158. U.S. Department of Health and Human Services: Guidance for Industry on Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers.
<https://www.federalregister.gov/documents/2005/07/22/05-14456/guidance-for-industry-on-estimating-the-maximum-safe-starting-dose-in-initial-clinical-trials-for>,
 zuletzt geprüft am: 16.10.2017.
159. van Rhee F, Szymonifka J, Anaissie E, Nair B, Waheed S, Alsayed Y, Petty N, Shaughnessy JD, JR, Hoering A, Crowley J, Barlogie B: Total Therapy 3 for multiple myeloma: prognostic implications of cumulative dosing and premature

- discontinuation of VTD maintenance components, bortezomib, thalidomide, and dexamethasone, relevant to all phases of therapy. *Blood*. 116. 1220–1227 (2010).
160. Verbrugge SE, Al M, Assaraf YG, Niewerth D, van Meerloo J, Cloos J, van der Veer M, Scheffer GL, Peters GJ, Chan ET, Anderl JL, Kirk CJ, Zweegman S, Dijkmans BA, Lems WF, Scheper RJ, Gruijl TD de, Jansen G: Overcoming bortezomib resistance in human B cells by anti-CD20/rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity and epoxyketone-based irreversible proteasome inhibitors. *Experimental hematology & oncology*. 2. 2 (2013).
161. Voutsadakis IA: Proteasome expression and activity in cancer and cancer stem cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 39. 1010428317692248 (2017).
162. Wang J, Maldonado MA: The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cellular & molecular immunology*. 3. 255–261 (2006).
163. Ward CL, Omura S, Kopito RR: Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*. 83. 121–127 (1995).
164. WHO: Global status report on noncommunicable diseases 2014. Attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility. pp. XVII, 280 S. WHO. Geneva (2014).
165. Wiedenmann B, Franke WW: Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*. 41. 1017–1028 (1985).
166. Williams SA, McConkey DJ: The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells. *Cancer research*. 63. 7338–7344 (2003).
167. Wilson CM: Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*. 96. 263–278 (1979).
168. Yang Y, Waters JB, Früh K, Peterson PA: Proteasomes are regulated by interferon gamma. Implications for antigen processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89. 4928–4932 (1992).
169. Yewdell JW: The seven dirty little secrets of major histocompatibility complex class I antigen processing. *Immunological reviews*. 207. 8–18 (2005).

170. Zilberberg J, Matos J, Dziopa E, Dziopa L, Yang Z, Kirk CJ, Assefnia S, Korngold R: Inhibition of the Immunoproteasome Subunit LMP7 with ONX 0914 Ameliorates Graft-versus-Host Disease in an MHC-Matched Minor Histocompatibility Antigen-Disparate Murine Model. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 21. 1555–1564 (2015).

8. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt zu allererst Frau Prof. Dr. rer. nat. Daniela Dieterich. Sie stellte mir dieses spannende Projekt zur Verfügung, ebnete mir den Weg in das Thema und gab mir stets Denkanstöße, Problemlösungen und Diskussionsanregungen. Ich bin sehr dankbar für ihre kompetente Betreuung, die stetige Motivation und den Glauben in meine Fähigkeiten. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Peter Landgraf, der immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und auch bei Rückschlägen meine Begeisterung aufrechterhalten konnte. Ich habe viel über wissenschaftliches Arbeiten lernen können.

Eine ganz besondere Danksagung möchte ich an Frau M. Sc. Paula Säring aussprechen. Vom Umgang mit den Zellkulturen, über die Anfertigung der Färbungen, bis zum Mikroskopieren hast Du mir alles beigebracht, was ich im Labor brauchte. Stundenlang hast Du mir geduldig alles erklärt, Probleme gewälzt und Dich mit mir über Ergebnisse gefreut. Die Zusammenarbeit mit Dir hat mich sehr bereichert.

Ich danke auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Neuronale Plastizität und Kommunikation“ des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie für die stete Unterstützung und Beantwortung aller meiner Fragen. Besonders Frau Evelyn Dankert hat mir bei den Färbungen unter die Arme gegriffen und immer noch ein Gel oder eine Zellkultur für mich hergestellt. Danke auch an Frau B. Sc. Johanna Rehfeld für das mühsame Auszählen der Zellen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Ulrike Seifert und Dr. Clemens Cammann vom Friedrich-Löffler-Institut für medizinische Mikrobiologie Greifswald, die während ihrer Zeit in Magdeburg die Anregung für mein Projekt gaben.

Natürlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, nicht nur während meiner Promotion, sondern auch während des gesamten Studiums. Herzlichen Dank auch an Philipp Dahlke für Deine immerwährende Geduld und Unterstützung sowie Dein Interesse an meiner Arbeit.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Vergleich des Proteasom-Inhibitors Bortezomib und des Immunoproteasom-Inhibitors ONX-0914 in Ihrer Wirkung auf kortikale Primärkulturen der Ratte“

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Betreuung von

Frau Prof. Dr. rer. nat. Daniela C. Dieterich

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und zur Unterstützung keine sonstigen, als die in der Arbeit aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

In dieser Arbeit sind keine Rechte Dritter verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation an keiner weiteren Hochschule im In- und Ausland zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen oder zu vertreiben.

Magdeburg, den 05.04.2018

Laura von Brzezinski