

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Kardiologie und Angiologie am
Campus Mitte der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems induziert eine Hitze-Schock-Antwort und schützt Kardiomyozyten vor Stress

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Lars Stelter

aus Essen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Stangl
2. Prof. Dr. P. Ruiz-Noppinger
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Staudt

Datum der Promotion: 22.02.2008

WIDMUNG

Meinen Eltern,

Wiebke und Dr. Lothar Stelter

sowie meinen Geschwistern Nils und Kristina

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ara-C	Cytosin-β-D-Arabinofuranosid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	Butandionmonoxim
Bp	Basenpaar
BrAAP	Branched-Chain-Amino-Acid-Preferring
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calzium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Complementary DNA
c-myc	Apoptoseinhibitor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DRIPS	Defective Ribosomal Products
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-transportierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
E2F-1	Zellzykluskontrollgen der E2F-Familie
ECL	Enhanced Chemiluminescent Reaction
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK ₁	Extrazelluläre Signalregulierte Kinase 1
Fas/APO-1	Apoptoseinduzierender Zelloberflächenrezeptor
FR	Freie Radikale
FS	Fettsäuren
Fw	forward
g	Erdbeschleunigung (9,81 m ⁻²)
GroEL	Bakterielles Chaperon

GroES	Bakterielles Co-Chaperon
Grp	Glukose-Reguliertes-Protein
GrpE	Co-Chaperon
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO-1	Hämoxygenase 1
HRP	Horseradish Peroxidase
HS	Hitze-Schock
HSBP 1	Heat Shock Binding Protein 1
HSC 70	Konstitutives Hsp 70
HSE	Hitze-Schockelement
HSF	Hitze-Schockfaktor
HSP	Hitze-Schockprotein
IgG	Immunglobulin G
IFN-γ	Interferon-Gamma
IκBα	Tumorsuppressorprotein
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
JNK	Jun N-Terminale Kinase
kDa	Kilodalton
L-15	Leibowitz-15 Medium
Lys	Lysin
M199	Medium 199
mABC1	Mitochondriales ATP-Binding Cassette Protein 1
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase
MDCK	Manin-Darby Canine Kidney Zellen
MG132	Proteasom-Inhibitor
Min.	Minuten
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
Mmol	Millimol
mRNA	Messenger RNA
NBCS	New Born Calf Serum
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NF-κB-I-κB	Inhibitor des NF-κB

NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer
NRC	Neonatale Rattenkardiomyozyten
PA28	Proteasomaktivator 28
p27	Protein 27
p38	Protein 38
p53	Protein 53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGPH	Peptidylglutamylpeptidhydrolase
PKC	Protein Kinase C
PI	Proteasom-Inhibitor
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PS-341	Bortezomib
PTCA	Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
r.P.	Reines Protein
RP20	Ribosomales Protein 20
RT-PCR	Real Time-PCR
S	Svedberg
SAPK2	Stress Activated Protein Kinase 2
SB20219	Kinase-Inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SNAAP	Small-neutral-Amino-Acid-Preferring
Tab.	Tabelle
TCP ₁	T-Komplex-Polypeptid Subfamilie
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	9
1.1 Proteinfaltung und Missfaltung.....	9
1.2 Der Ubiquitin-Proteasom-Komplex	10
1.3 Die Hitze-Schock-Antwort.....	16
1.3.1 Hitze-Schock-Proteine; das System der Molekularen Chaperone.....	16
1.3.2 Hitze-Schock-Fakoren; Syntheseinduktion der HSP	21
1.3.3 Proteasom-Inhibition; multidisziplinäre Therapieansätze	22
1.4 Arbeitshypothese	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten	26
2.1.1 Versuchstiere	26
2.1.2 Verwendete Materialien	26
2.1.3 Durchführung	26
2.2 Zellkultur und Stimulation mit Proteasom-Inhibitor MG132.....	30
2.2.1 Verwendete Materialien	30
2.2.2 Durchführung der Zellstimulation	31
2.3.1 Verwendete Materialien	33
2.3.2 Durchführung	33
2.4 Reverse Transkriptase.....	35
2.4.1 Verwendete Materialien	35
2.4.2 Durchführung	35
2.4.3 DNase Verdau	36
2.5 Real-Time PCR (RT-PCR).....	37
2.5.1 Verwendete Materialien	37
2.5.2 Durchführung	37
2.5.3 Relative Quantifizierung	39
2.5.4 Primerdesign.....	39
2.5.5 Primermatrix.....	41
2.5.6 Primereffizienz	41
2.5.7 Ansetzen der PCR	42

2.6	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	44
2.6.1	Verwendete Materialien	44
2.6.2	Durchführung	44
2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	45
2.7.1	Einführung	45
2.7.2	Verwendete Materialien	45
2.7.3	Durchführung	46
2.8	Western Blot	47
2.8.1	Verwendete Materialien	47
2.8.2	Durchführung	48
2.9	ECL („Enhanced Chemiluminescent Reaction“)	50
2.10	XTT-Test (Zellproliferationstest)	50
2.11	Auswertung und Statistik	51
3.	Ergebnisse	52
3.1	Kurzzusammenfassung	52
3.2	Hitze-Schock-Proteine; Expression auf mRNA-Ebene.....	53
3.3.1	Hsp 27	53
3.3.2	Hsp 60.....	55
3.4	Hitze-Schock-Protein; Expression auf Protein-Ebene.....	61
3.4.1	Hsp 27	62
3.4.2	Hsp 60.....	63
3.4.3	Hsp 90.....	64
3.4.4	Hsp 70.....	65
3.5	XTT-Zellproliferationstest.....	67
3.5.1	Optimierung der Zellzahl	67
3.5.2	Optimierung der Zellschädigung durch unterschiedliche Zellgifte	69
3.5.3	Zellüberleben nach Hitze-Schock.....	70
3.5.4	Hsp 70-Expression nach Zellstimulation mit H ₂ O ₂	72
3.5.5	Zellüberleben nach subletalem/ letalem Stress mit H ₂ O ₂	74
4.	Diskussion	78
4.1	Expression verschiedener HSP-Untereinheiten in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Proteasom-Inhibition.....	78
4.1.1	Hitze-Schock-Faktoren (HSF); Rolle in der HSP-mRNA-Synthese	79

4.1.2	Einfluss der Proteasomhemmung auf die HSP-mRNA und -Protein Expression.....	81
4.1.3	HSP-vermittelte zytoprotektive Effekte von Proteasom-Inhibitoren	83
4.1.4	Protektion durch Proteasom-Inhibition bei subletalem Stress	85
4.1.5	Hitze-Schock-Protein unabhängige Mechanismen der Zytoprotektion nach Proteasom-Inhibition	87
4.2	Proteasom-Inhibitoren als potentielle Therapeutika	90
4.2.1	Behandlung neoplastischer Erkrankungen.....	90
4.2.2	Behandlung inflammatorischer Erkrankungen.....	91
4.2.3	Möglicher Einsatz von Proteasom-Inhibitoren in der Kardiologie	92
5.	Zusammenfassung.....	94
	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung	105
	Publikationsliste	106
	Curriculum Vitae	108
	Eidesstattliche Erklärung.....	111

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl für die Überlassung des Promotionsthemas, die Bereitstellung der Materialien und Untersuchungsplätze sowie, zusammen mit Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl, für die sehr gute Betreuung. Mein ganzer Dank geht ebenso an Herrn Dr. med. Christoph Günther ebenfalls für die Begleitung und Betreuung sowie in besonderer Weise an Frau PD Dr. rer. nat. Silke Meiners, die insbesondere den letzten ‚Endspurt‘ durch ihre Kompetenz, Produktivität und stets freundschaftliche Art deutlich unterstützt und verkürzt hat. Auch möchte ich mich ganz herzlich bei dem gesamten Team des Kardiologischen Forschungslabors in der Ziegelstrasse für die Einarbeitung, das gute ‚Teaching‘ und die Hilfe bedanken, hier im Besonderen Frau Andrea Weller, Frau Conny Bartsch, Frau Wanda Michaelis und Frau Minoo Moobed.

Alles hätte nur halb so viel Spaß gemacht ohne meine Mitstreiter Dr. med. Philipp Boyé, Dr. med. Alexandra Boyé, Dr. med. Pia Leykam und Dr. med. Torsten Roepke. Vielen Dank für die gute Zeit und damit auch den sehr schönen Start in Berlin, für Eure Hilfe, für Eure offenen Ohren und Eure beständige Freundschaft.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern Wiebke und Dr. rer. nat. Lothar Stelter sowie meinem Bruder Nils und meiner Schwester Kristina. Ohne Eure Unterstützung, Eurem festen Glauben, daß alles ‚Laufen‘ wird und Eure liebevolle Art wären die schwierigen Zeiten schwieriger und die schönen Tage viel weniger schön gewesen.

Ein grosser Dank auch an meine jetzigen Kollegen und Freunde Herrn Dr. med. Timm Denecke und Herrn PD. Dr. med. Holger Amthauer. Ihr habt mir gerade in der Schlussphase dieser Arbeit oft den Rücken frei gehalten und mit sanftem Druck das Ganze immens beschleunigt und einfach zu einer besseren Zeit gemacht.

Dir, Il-Kang, vielen Dank für Deine Unterstützung, Deine Hilfe und besonders Deine Liebe.

Publikationsliste

Planning transarterial radioembolization of colorectal liver metastases with Yttrium 90 microspheres: evaluation of a sequential diagnostic approach using radiologic and nuclear medicine imaging techniques.

Denecke T, Rühl R, Hildebrandt B, Stelter L, Grieser C, Stiepani H, Werk M, Podrabsky P, Plotkin M, Amthauer H, Ricke J, Lopez Hänninen E. Eur Radiol. 2008 Jan 4; [Epub ahead of print]

An orthotopic model of pancreatic somatostatin-receptor (SSTR) positive tumors allows comparative imaging studies using 3T MRI and animal-PET based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Denecke T, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A. Neuroendocrinology 2007 Nov 16; [Epub ahead of print]

In vivo detectability of multimodal modified nanoparticles via fluorescence microscopy, 3T MRI and animal PET-Imaging.

Stelter L, Pinkernelle J, Michel R, Sauer I, Schwartländer R, Raschzok N, Morgül H, Denecke T, Amthauer H, Jordan A, Koch M, Hamm B, Teichgräber U. Molecular Imaging 2008; submitted

FDG-PET for the assessment of local control after laser induced thermotherapy of liver metastases from colorectal cancer.

Denecke T, Hildebrandt B, Ricke J, Stroszczyński C, Stelter L, Plotkin M, Ruf J, Felix R, Amthauer H. Acta Radiol. 2007; in press

Impact of image fusion and attenuation correction by SPECT-CT imaging on the scintigraphic detection of parathyroid glands.

Ruf J, Seehofer D, Denecke T, Stelter L, Rayes N, Felix R, Amthauer H. Nuklearmedizin. 2007;46(1):15-21.

Delta F508 mutation results in impaired gastric acid secretion.

Sidani SM, Kirchhoff P, Socrates T, Stelter L, Ferreira E, Caputo C, Roberts KE, Bell RL, Egan ME, Geibel JP. J Biol Chem. 2007 Mar 2;282(9):6068-74.

Bimodal imaging of an orthotopic pancreatic neuroendocrine tumor-model by 3T MRI and Ga-68 animal PET in the mouse.

Stelter L, Scholz A, Rexin A, Pinkernelle J, Denecke T, Felix R, Wiedenmann B, Michel R, Amthauer H. Eur J Nucl Med Mol Biol. 2006;33, Suppl.2:127.

Minimum intensity projections of the biliary system using 16-channel multidetector computed tomography in patients with biliary obstruction: comparison with MRCP.

Denecke T, Degutye E, Stelter L, Lehmkuhl L, Valencia R, Lopez-Hanninen E, Felix R, Stoszczynski C. Eur Radiol. 2006 Aug;16(8):1719-26.

Preoperative Evaluation of Living Kidney Donors Using Multirow Detector Computed Tomography: Comparison with Digital Subtraction Angiography and Intraoperative Findings.

Lopez-Hänninen E, Denecke T, Stelter L, Pech M, Podrabsky P, Neuhaus P, Ricke J, Schindler J, Felix R, Tullius S, Felix R; Transpl Int 2005 Oct; 18(10):1134-41

Peritoneal Manifestation of Plasmocytomas.

Stelter L, le Coutre P, Stoszczynski C. Röfo 2005 Apr; 177(4):580-1.German

Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection.

Stangl K, Günther C, Frank T, Lorenz M, Meiners S, Röpke T, Stelter L, Moobed M, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl V. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 1;291(3):542-9.

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Lars Stelter, erkläre an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Die Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems induziert eine Hitze-Schock-Antwort und schützt Kardiomyozyten vor Stress“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten erstellt habe.

Berlin, den 27.06.2007

Lars Stelter