

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Inhibition of chymotryptic-like standard proteasome activity exacerbates
doxorubicin-induced cytotoxicity in primary cardiomyocytes.*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Eva-Margarete Spur
aus Tuttlingen

Datum der Promotion: 25.06.2017

Inhaltsverzeichnis

1.	Abstrakt.....	3
1.1.	In englischer Sprache.....	3
1.2.	In deutscher Sprache.....	5
2.	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	7
	Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	8
3.	Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM).....	9
4.	Druckexemplar der Publikation	10
5.	Lebenslauf.....	25
6.	Publikationsliste.....	26
6.1.	Publikationen	26
6.2.	Poster und Kongressbeiträge.....	26
7.	Danksagung.....	27

1. Abstrakt

1.1. In englischer Sprache

Introduction

The major limitation of doxorubicin, a potent anthracycline widely used for chemotherapy of different cancers including multiple myeloma, is its cardiotoxicity. This study shows the crucial role of the ubiquitin-proteasome system, the major cellular protein degradation pathway composed of the ubiquitin-conjugating system and the multicatalytic protease complex, and its involvement in antagonizing doxorubicin-induced cytotoxicity. Since the combination of doxorubicin with proteasome inhibitors is a common therapeutic strategy for multiple myeloma, the influence of proteasome subunit-specific inhibitors on doxorubicin cytotoxicity was further examined.

Methods

A representative cell culture model with primary murine embryonic cardiomyocytes was established to study doxorubicin-induced cytotoxicity and proteasome function. More specifically, subunit-selective inhibitors of $\beta 5$, one of the three catalytic subunits of the constitutive standard proteasome, and LMP7, its equivalent of the inducible immunoproteasome preferentially expressed in cells of hematopoietic origin, were used to investigate the influence of proteasome inhibitors on doxorubicin cytotoxicity. To examine the immunoproteasome's influence on doxorubicin cytotoxicity *in vivo*, mice constitutively lacking LMP7 expression and their wild-type littermates were subjected to a single intraperitoneal doxorubicin injection followed by cardiac evaluation using echocardiography, creatine kinase and troponin T levels, as well as histologic assessment.

Results

Doxorubicin had time- and dose-dependent cytotoxic effects on primary murine cardiomyocytes. The proteolytic capacity of the proteasome, evaluated by hydrolysis of both short fluorogenic peptide substrates and surrogate full-length protein substrates as well as by accessibility of catalytically active sites visualized with fluorescent activity-based probes, remained unaltered during initiation of doxorubicin-induced cytotoxicity. Furthermore, expression levels of proteasome subunits and proteins marked for proteasomal degradation by poly-ubiquitination stayed steady. Site-specific inhibition of the $\beta 5$ standard proteasome subunit resulted in

significantly increased doxorubicin cytotoxicity. In contrast, inhibition of LMP7 in primary cardiomyocytes did not enhance doxorubicin cytotoxicity, nor did LMP7 expression affect acute doxorubicin cardiotoxicity in adult murine hearts.

Discussion

The preserved proteolytic capacity of the proteasome complex attenuates early doxorubicin-induced cytotoxicity. Particularly the activity of the $\beta 5$ standard proteasome subunit is crucial for reducing off-target cytotoxicity in doxorubicin-exposed primary cardiomyocytes, whereas the $\beta 5$ equivalent LMP7 of the immunoproteasome can be regarded as a pharmacologically safe target for therapeutic subunit-specific inhibitors. Therefore, immunoproteasome-specific inhibitors with known antineoplastic effects for multiple myeloma cells might be favorable for reducing off-target cardiomyocyte death in a combinatory therapy with doxorubicin, when compared to compounds that target the $\beta 5$ subunit in addition to LMP7.

1.2. In deutscher Sprache

Einführung

Das Anthrazyklin Doxorubicin ist als Zytostatikum wichtiger Bestandteil der Therapie zahlreicher Krebserkrankungen, auch der des multiplen Myeloms. Eine folgenschwere Nebenwirkung ist die dosis-abhängige Kardiotoxizität, welche unter anderem durch Verlust von Kardiomyozyten zu Herzinsuffizienz führen kann. Diese Studie zeigt, dass das Ubiquitin-Proteasom System – der wichtigste zelluläre Proteinabbaumechanismus bestehend aus Ubiquitin-konjugierendem System und einer multikatalytischen Protease – entscheidend dazu beiträgt, der Doxorubicin-induzierten Zytotoxizität entgegenzuwirken. Da eine der Behandlungsstrategien bei Patienten mit multiplen Myelom eine Kombination aus Proteasominhibitoren und Doxorubicin ist, wurde untersucht wie sich neuartige Untereinheiten-spezifische Proteasom-Inhibitoren auf die Doxorubicin-Zytotoxizität auswirken.

Methoden

Ein repräsentatives Zellkulturmodell aus primären murinen embryonalen Kardiomyozyten wurde etabliert und mithilfe dessen die Doxorubicin-induzierte Zytotoxizität untersucht sowie die Proteasomaktivität beurteilt. Um zu untersuchen, wie Proteasomhemmung die Entwicklung der Doxorubicin-Zytotoxizität beeinflusst, kamen spezifische Proteasominhibitoren zum Einsatz, die durch kovalente Bindung einerseits an die $\beta 5$ -Untereinheit des ubiquitär exprimierten Standardproteasoms und andererseits an die LMP7-Untereinheit des Immunoproteasoms eine kompetitive irreversible Hemmung bewirken. Ferner wurde die Rolle des Immunoproteasoms bei der Doxorubicin-Zytotoxizität im Mausmodell mit LMP7-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern weiter charakterisiert. Dabei wurde nach einer einmaligen intraperitonealen Doxorubicin-Injektion die kardiale Funktion durch Surrogat-Parameter echokardiographisch, über Kreatinkinaseaktivitäts- und Troponin T-Konzentrationsmessungen pathobiochemisch sowie histologisch beurteilt.

Ergebnisse

In primären murinen embryonalen Kardiomyozyten wirkte Doxorubicin zeit- und dosisabhängig zytotoxisch. In der frühen Phase des Doxorubicin-induzierten Zelluntergangs blieb die proteolytische Aktivität des Proteasoms, welche durch Messung der Substrathydrolyse und Nachweis der katalytischen Zentren mittels fluoreszierenden *Activity-based probes* beurteilt

wurde, erhalten. Des Weiteren zeigte sich eine gleichbleibende Proteinexpression der Proteasomuntereinheiten und der für proteasomalen Abbau markierten poly-ubiquitinierten Proteine. Die spezifische Inhibition der β 5-Untereinheit des Standardproteasoms bewirkte eine verstärkte Doxorubicin-Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu führte weder die LMP7-Hemmung in primären Kardiomyozyten noch die genetische Ablation von LMP7 im adulten murinen Herzgewebe zu einer Zunahme der Doxorubicin-Zytotoxizität.

Diskussion

Die in der frühen Phase des Doxorubicin-induzierten Zelluntergangs erhaltene proteolytische Aktivität des Proteasomkomplexes wirkt der Zytotoxizität von Doxorubicin entgegen. Speziell die Aktivität der β 5-Untereinheit ist bei der Gegenregulation der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität in primären Kardiomyozyten von entscheidender Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz dazu das β 5-Äquivalent des Immunoproteasoms LMP7 als pharmakologisch geeignetes Zielmolekül einer therapeutischen Proteasominhibition angesehen werden kann, da unerwünschte Nebenwirkungen reduziert würden. Daher wären zur Reduktion der Kardiotoxizität bei Kombinationstherapie des multiplen Myeloms mit Proteasominhibitoren und Doxorubicin solche Wirkstoffe zu bevorzugen, die ausschließlich LMP7 des Immunoproteasoms inhibieren und nicht zusätzlich die β 5-Untereinheit des Standardproteasoms hemmen.

2. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Eva-Margarete Spur, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Inhibition of chymotryptic-like standard proteasome activity exacerbates doxorubicin-induced cytotoxicity in primary cardiomyocytes.“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben ist.

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

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Spur EM, Althof N, Respondek D, Klingel K, Heuser A, Overkleeft HS, Voigt A. Inhibition of chymotryptic-like standard proteasome activity exacerbates doxorubicin-induced cytotoxicity in primary cardiomyocytes. Toxicology. 2016 Apr;353-354:34-47.

Beitrag im Einzelnen:

- Geteilte Erstautorenschaft mit Dr. rer. nat. Nadine Althof
- Planung und Ausarbeitung der Studie gemeinsam mit Dr. rer. nat. Nadine Althof und Prof. Dr. med. Antje Voigt
- Hauptanteil an der Erhebung der Daten mit Etablierung des Zellkulturmodells Doxorubicin-induzierter Zytotoxizität sowie Durchführung der Experimente (jeweiliger Eigenanteil: Abbildung 1: 100 %, Abbildung 2: 100 %, Abbildung 3: 100 %, Abbildung 4: 30 %, Abbildung 5: 60 %, Abbildung 6: 60 %, Abbildung 7: 40 %)
- Wesentlicher Anteil an der Aufarbeitung und Auswertung der erhobenen Daten
- Wesentlicher Beitrag zur kritischen Würdigung der Resultate mit Identifikation der relevanten Aussagen der Studie einschließlich ihrer Limitationen
- Selbstständige graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildungen
- Erarbeitung des zur Publikation führenden Manuskripts gemeinsam mit Prof. Dr. med. Antje Voigt sowie Mitarbeit an der Revision und Umsetzung der Reviewer-Kommentare

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

3. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Citation Reports®

WELCOME HELP

2015 JCR Science Edition

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories TOXICOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 89)

Navigation icons: Home, Previous, Next, Page 1, Page 2, Page 3, Page 4, Page 5, End

Page 1 of 5

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data ^j						Eigenfactor® Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
<input type="checkbox"/>	1	ANNU REV PHARMACOL	0362-1642	7434	14.769	18.088	4.871	31	>10.0	0.01090	6.372
<input type="checkbox"/>	2	PART FIBRE TOXICOL	1743-8977	3245	8.649	9.618	0.312	32	4.3	0.00916	2.410
<input type="checkbox"/>	3	ENVIRON HEALTH PERSP	0091-6765	34909	8.443	9.098	2.258	186	8.9	0.05378	2.913
<input type="checkbox"/>	4	NANOTOXICOLOGY	1743-5390	3466	7.913	8.137	1.814	113	3.3	0.00952	1.872
<input type="checkbox"/>	5	ARCH TOXICOL	0340-5761	6827	6.637	5.574	1.512	168	4.7	0.01226	1.236
<input type="checkbox"/>	6	J TOXICOL ENV HEAL B	1093-7404	1473	5.552	5.948	0.250	12	7.0	0.00254	1.750
<input type="checkbox"/>	7	CRIT REV TOXICOL	1040-8444	3529	5.422	5.948	1.069	29	9.1	0.00506	1.731
<input type="checkbox"/>	8	MUTAT RES-REV MUTAT	1383-5742	2882	5.261	5.956	1.056	36	7.9	0.00382	1.857
<input type="checkbox"/>	9	DRUGS	0012-6667	9141	4.883	4.299	1.047	169	8.9	0.01374	1.229
<input type="checkbox"/>	10	DNA REPAIR	1568-7864	5133	3.929	3.445	0.682	148	6.6	0.01584	1.650
<input type="checkbox"/>	11	TOXICOL SCI	1096-6080	15817	3.880	4.307	0.903	248	7.6	0.02432	1.181
<input type="checkbox"/>	12	TOXICOL APPL PHARM	0041-008X	17689	3.847	4.010	0.735	275	7.9	0.02395	1.009
<input checked="" type="checkbox"/>	13	TOXICOLOGY	0300-483X	12870	3.817	3.967	0.912	147	9.0	0.01465	0.999
<input type="checkbox"/>	14	J ENVIRON SCI HEAL C	1059-0501	646	3.667	3.726	1.000	14	6.6	0.00078	0.832
<input type="checkbox"/>	15	FOOD CHEM TOXICOL	0278-6915	20398	3.584	3.440	0.636	275	6.0	0.03265	0.734
<input type="checkbox"/>	16	TOXINS	2072-6651	2929	3.571	3.942	0.581	322	3.0	0.01004	0.965
<input type="checkbox"/>	17	AQUAT TOXICOL	0166-445X	12343	3.557	4.056	0.716	257	7.0	0.01834	0.942
<input type="checkbox"/>	18	TOXICOL LETT	0378-4274	13230	3.522	3.571	0.625	232	7.0	0.02034	0.881
<input type="checkbox"/>	19	TOXICOL IN VITRO	0887-2333	7660	3.338	3.285	0.715	295	5.8	0.01263	0.730
<input type="checkbox"/>	20	ENVIRON MOL MUTAGEN	0893-6692	3419	3.326	3.249	1.188	64	8.6	0.00518	0.924

Quelle: http://admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR?RQ=LIST_SUMMARY_JOURNAL
(Zugriff am 14.09.2016)

4. Druckexemplar der Publikation

Die Publikation mit dem Titel "*Inhibition of chymotryptic-like standard proteasome activity exacerbates doxorubicin-induced cytotoxicity in primary cardiomyocytes.*" von E.-M. Spur, N. Althof, D. Respondek, K. Klingel, A. Heuser, H. S. Overkleeft und A. Voigt, erschienen in der Zeitschrift *Toxicology* (2016 Apr;353-354:34-47), wird aus urheberschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Digital Object Identifier (DOI): <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.04.010>

5. Lebenslauf

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

6. Publikationsliste

6.1. Publikationen

- Spur EM, Althof N, Respondek D, Klingel K, Heuser A, Overkleeft HS, Voigt A. Inhibition of chymotryptic-like standard proteasome activity exacerbates doxorubicin-induced cytotoxicity in primary cardiomyocytes. *Toxicology*. 2016 Apr;353-354:34-47.

Impact Factor: 3,817

- Spur EM, Decelle EA, Cheng LL. Metabolomic imaging of prostate cancer with magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013 Jul;40 Suppl 1:S60-71.

Impact Factor: 5,217

6.2. Poster und Kongressbeiträge

- Spur EM, Althof N, Voigt A (presenting author). Regulation of Proteolysis by the Ubiquitin-Proteasome System in Anthracycline cardiotoxicity. *81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim 2015*.
- Spur EM, Althof N, Voigt A. Impact of Doxorubicin on Ubiquitin-Proteasome System in Primary Murine Embryonal Cardiomyocytes. *International Symposium "Recent Developments in the Prognostic Assessment and Differential Therapy of Cardiomyopathies" Berlin 2014*.
- Spur EM, Althof N, Voigt A. Impact of Doxorubicin on Ubiquitin-Proteasome System in Primary Murine Embryonal Cardiomyocytes. *European Students' Conference Berlin 2014*.
- Spur EM, Althof N, Voigt A. Impact of Doxorubicin on Ubiquitin-Proteasome System in Primary Murine Embryonal Cardiomyocytes. *Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung Lecture Berlin 2014*.

7. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Antje Voigt für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren und die Freiheit in der Gestaltung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Nadine Althof für ihre exzellente Betreuung dieser Arbeit. Ihre experimentelle Anleitung sowie ihre unermüdliche Motivation und Unterstützung sind für die Fertigstellung meiner Promotion von großem Wert. Sie ist mir darüber hinaus eine liebe Freundin geworden.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Kardiale Infektionsbiologie und Immunologie“ für die herzliche Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft bedanken, im Besonderen bei Karolin Voss für ihre praktische Unterstützung.

Ich danke dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung für die finanzielle Förderung der Dissertation durch ein Promotionsstipendium.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht haben sowie mich stets bestärkt und liebevoll unterstützt haben. Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Bruder und meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken – insbesondere bei Rosa für den konstruktiven Austausch und das kritische Lesen dieser Arbeit. Manuel, Dir danke ich von Herzen für Deine Geduld, Deinen Rückhalt und Deine Liebe.