

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom- Biologin (t.o.) Henrike Tscheschner
aus Mutlangen
Tag der mündlichen Prüfung

Protektive Effekte des ER Chaperons GRP78 in der Doxorubizinkardiotoxizität

Erstgutachter: Prof. Dr. Martin Müller

Zweitgutachter: Prof. Dr. Oliver Müller

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Philip Raake, für die Möglichkeit eine Arbeit in diesem spannenden Feld der gentherapeutischen Forschung durchzuführen und die Zeit, die er sich trotz eines extrem angespannten Klinikalltags für seine Arbeitsgruppe nimmt. Vielen Dank für die kontinuierliche Unterstützung über den Zeitraum der Anfertigung dieser Arbeit und die Möglichkeit, auf internationalen Kongressen Erfahrungen sammeln zu können.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Martin Müller und Herrn Prof. Oliver Müller für die Anfertigung der Gutachten und den wissenschaftlichen Austausch im Rahmen der TAC-Meetings.

Vielen Dank Herrn Prof. Stefan Wölfl für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen und Herrn Dr. Dirk Grimm für seine Funktion als Beisitzer.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Raake danke ich für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung.

Der AG Müller danke ich für die Unterstützung bei der Virusproduktion.

Suzan Allam, Dr. Sabine Eschricht, Dr. Julia Reinkober, Dr. Julia Ritterhoff und Susann Werkmeister: Vielen Dank für den Spaß und den Zusammenhalt.

Allen Mitarbeitern der AG Most und der AG Chorianopoulos danke ich dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat beiseite standen.

Außerdem möchte ich mich bei Lysann Diekert bedanken, die für einen Ausgleich zum Laboralltag gesorgt hat und bei Dr. Laura Dittmar, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Schwester, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY.....	II
1 Einleitung.....	12
1.1 Doxorubizin.....	12
1.1.1 Klinische Anwendung von Doxorubizin als Chemotherapeutikum.....	12
1.1.2 Doxorubizin induzierte Herzinsuffizienz	13
1.2 Zytotoxische Wirkung von Doxorubizin.....	14
1.2.1 Störungen der Ca²⁺-Homöostase	14
1.2.1.1 CaMKII - Regulation und pathologische Rolle.....	15
1.2.2 Mitochondriale Dysfunktion und ROS -Bildung	16
1.2.3 DNA Schädigung durch Topoisomerasehemmung	17
1.2.4 Die Rolle von p53 in Apoptose, DNA Schädigung und ROS Bildung.....	18
1.3 Besondere Anfälligkeit der Kardiomyozyten	19
1.4 Ansätze zur Reduktion der Kardiotoxizität	19
1.5 Ausweichstrategien verschiedener Tumoren - die Rolle von GRP78	20
1.6 Das Glukose regulierte Protein 78.....	21
1.6.1 Chaperon und Vermittler der ER Stress Antwort im Endoplasmatischen Retikulum	21
1.6.2 GRP78 als Membranrezeptor	22
1.6.3 GRP78 in der Ca²⁺-Homöostase.....	22
1.6.4 GRP78 und DNA Schädigung	23
1.7 Rationale und Zielsetzung	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material	24
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien	24
2.1.1.2 Spezielle Chemikalien	25
2.1.1.3 Komplettsysteme und Kits	25
2.1.1.4 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.1.5 Sonstige Materialien	26

2.1.2	Standardlösungen	27
2.1.2.1	Stamm-Lösungen für Molekularbiologische Arbeiten	27
2.1.2.2	Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen	28
2.1.2.3	Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur	29
2.1.3	Antikörper	31
2.1.4	Nukleinsäuren	32
2.1.4.1	Plasmide	32
2.1.4.2	Oligonukleotide	33
2.1.5	Geräte und Software	33
2.1.6	Organismen und Tiere	34
2.1.6.1	Bakterienstämme	34
2.1.6.2	eukaryotische Zelllinien	34
2.1.6.3	Tierstämme	35
2.2	Methoden	35
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von E. coli	35
2.2.1.2	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter E.coli	35
2.2.1.3	Plasmidpräparation aus Bakterien	36
2.2.1.4	Plasmidpräparation aus Bakterien-Großkulturen (QIAGEN Plasmid Giga Kit (5))	36
2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.1.6	Isopropanolfällung	37
2.2.1.7	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	37
2.2.1.8	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	37
2.2.1.9	Behandlung mit alkalischer Phosphatase (AP)	38
2.2.1.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
2.2.1.11	Ligation doppelsträngiger DNA-Fragmente	38
2.2.1.12	Wiederherstellung des pUF-CMV-MLC800-HSPA5	39
2.2.1.13	RNA-Isolierung aus Zellen (NRVCM)	39
2.2.1.14	RNA-Isolierung aus Gewebe	39
2.2.1.15	Reverse Transkription	40
2.2.1.16	quantitative Realtime-PCR	41
2.2.2	Biochemische Methoden	42

2.2.2.1	Proteinaufreinigung aus Zellen	42
2.2.2.2	Proteinaufreinigung aus Gewebe	42
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	42
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.2.2.5	Western Blot	43
2.2.3	Zellkultur - Methoden	44
2.2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen (HEK293)	44
2.2.3.2	Isolierung und Kultivierung primärer neonataler Ratten-Kardiomyozyten (NRVCM)	44
2.2.3.3	Behandlung von NRVCM mit Doxorubizin	45
2.2.3.4	Behandlung von NRVCM mit siRNA	46
2.2.3.5	Transfektion von NRVCM mit Adeno-assoziierten Viren	46
2.2.3.6	ToxiLight Assay	47
2.2.3.7	TUNEL Assay (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red)	47
2.2.3.8	Nachweis und Quantifizierung der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS)	48
2.2.3.9	Sulforhodamin B Färbung zur Bestimmung der relativen Zellzahl	48
2.2.3.10	Immunfluoreszenz basierter Nachweis von DNA Schädigungen	49
2.2.4	Produktion und Aufreinigung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren	49
2.2.4.1	Transfektion von HEK 293 Zellen zur Produktion Adeno-assoziiierter Viren	49
2.2.4.2	Isolierung und Aufreinigung rekombinanter AAV	50
2.2.4.3	Aufreinigung und Virustiterbestimmung rekombinanter Adenoassoziiierter Viren	50
2.2.5	Mausmodell der Doxorubizin induzierten Kardiotoxizität	51
2.2.5.1	Echokardiographie	51
2.2.5.2	Probennahme für Western Blots und Realtime-PCR	52
2.2.5.3	Bestimmung der Plasma hsTnT Level	52
2.2.5.4	Aufzeichnung intraventrikulärer Druck/Volumen Kurven	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Charakterisierung der Doxorubizinkardiotoxizität <i>in vivo</i>	54
3.2	Charakterisierung der Doxorubizinkardiotoxizität <i>in vitro</i>	56
3.2.1	Doxorubizin beeinflusst dosisabhängig Zelltod und GRP78 Expression <i>in vitro</i>	57

3.2.2	Zeitliche Veränderung der GRP78 Expression nach Doxorubizinbehandlung ...	58
3.2.3	Zeitverlauf der Aktivierung von Apoptose und mit der Doxorubizintoxizität verbundener Signalwege.....	59
3.2.3.1	Zeitlicher Verlauf der Apoptoseaktivierung durch 1µM Doxorubizin	60
3.2.3.2	Untersuchung von DNA-Schädigung, Ca ²⁺ -Regulatoren und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	61
3.3	Der Knockdown von GRP78 induziert ER Stress und Zelltod.....	65
3.4	Untersuchung des Effekts der GRP78 Überexpression <i>in vitro</i>	67
3.4.1	Therapeutisches Fenster der GRP78 Überexpression.....	67
3.4.2	Eine gezielte GRP78 Überexpression schützt vor Doxorubizin induziertem Zelltod	69
3.4.3	Molekulare Ursachen des therapeutischen Effekts	71
3.4.3.1	Der oxidative Stress wird durch GRP78 nicht beeinflusst	71
3.4.3.2	Die GRP78 Überexpression verringert die durch Doxorubizin ausgelöste Induktion von p53	72
3.4.3.3	Die GRP78 Überexpression beeinflusst die Aktivierung von CaMKII.....	73
3.5	Untersuchung der GRP78 Überexpression im <i>in vivo</i> Modell der Doxorubizin Kardiotoxizität	74
3.5.1	GRP78 schützt Kardiomyozyten vor Doxorubizinkardiotoxizität <i>in vivo</i>	76
3.5.2	Die Überexpression von GRP78 verbessert Überleben und kontraktile Parameter nach Doxorubizinbehandlung	76
4	Diskussion.....	80
4.1	Einordnung der Relevanz der gewählten Modelle	80
4.2	Doxorubizin induzierte Effekte <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	81
4.2.1	Doxorubizin induziert Apoptose in Verbindung mit einer kontraktile Dysfunktion	81
4.2.2	Doxorubizin führt zu vermehrter Aktivierung Ca ²⁺ abhängiger Proteine	82
4.2.3	Doxorubizin führt zu einer Akkumulation von p53	83
4.2.4	Doxorubizin verringert die Expression des ER Chaperons GRP78	84
4.2.5	Der Knockdown von GRP78 verstärkt die Apoptose, aktiviert jedoch andere Signalwege als Doxorubizin	84
4.3	GRP78 verringert die Doxorubizinkardiotoxizität <i>in vitro</i> und <i>in vitro</i>	85
4.3.1	GRP78 Überexpression verringert die Doxorubizin induzierte p53 Akkumulation	86
4.3.2	GRP78 Überexpression normalisiert die CaMKII-Aktivität.....	87

4.4	Fazit und Ausblick	88
5	Literaturverzeichnis.....	91
6	Anhang.....	99
6.1	Tabellenverzeichnis	99
6.2	Abbildungsverzeichnis	99
6.3	Abkürzungsverzeichnis	101

ZUSAMMENFASSUNG

Das Anthrazyklin Doxorubizin ist eines der am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika. Es wird allerdings in seiner Anwendung durch seine Kardiotoxizität, mit der Gefahr der Entwicklung einer ernsten Herzinsuffizienz, eingeschränkt. Da bislang nur eine symptomatische Therapie der Doxorubizinkardiomyopathie möglich ist, liegt der Fokus auf der Vermeidung hoher Doxorubizindosen. Die einzige präventive Therapie ist für ein großes Patientenkollektiv, Kinder und Jugendliche, nicht geeignet. Daher müssen neue Strategien für eine Protektion des Herzens gegenüber Doxorubizin gefunden werden.

Einen interessanten Ansatz bietet hier die Übertragung natürlicher Resistenzmechanismen von Tumoren in eine kardiale Therapie. Das Chaperon "Glukose Reguliertes Protein 78" (GRP78) ist in vielen Tumoren hochreguliert und wird dort mit der Resistenz gegen Anthrazykline in Verbindung gebracht. Ziel der vorgelegten Arbeit war daher, das protektive Potenzial einer spezifischen, durch Adeno-assoziierte Viren vermittelten Überexpression von GRP78 gegenüber Doxorubizin im Herzmuskel zu untersuchen. Dafür wurden klinisch relevante *in vivo* und *in vitro* Modelle der Doxorubizinkardiotoxizität etabliert.

Im *in vitro* Modell zeigte sich die Doxorubizinkardiotoxizität durch eine erhöhte Aktivierung von Apoptose. Im Zusammenhang mit der Toxizität war eine Akkumulation von p53 und die Aktivierung der "Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II" (CaMKII) zu beobachten, was auf die durch Doxorubizin induzierte DNA-Schädigung und Störungen der Ca²⁺-Homöostase zurückzuführen ist. Analog konnten im Mausmodell nach der Doxorubizinbehandlung erhöhte Werte des kardialen Zelltodmarkers TroponinT (hsTnT) sowie eine beginnende kontraktile Dysfunktion festgestellt werden. Durch die Überexpression von GRP78 sank *in vitro* sowohl die Apoptose, als auch die p53 Akkumulation und die Aktivierung der CaMKII. Im *in vivo* Modell war die GRP78 Überexpression mit niedrigeren hsTnT-Leveln und einer signifikanten Verbesserung der Relaxation des Ventrikels verbunden. Darüber hinaus war eine deutliche Verlängerung des Gesamtüberlebens zu beobachten.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass eine kardiale Überexpression von GRP78 die Doxorubizinkardiotoxizität *in vitro* und *in vivo* verringert. Der protektive Effekt konnte über p53 und CaMKII mit der Regulation der Antwort auf DNA-Schädigung bzw. der Ca²⁺-Homöostase in Verbindung gebracht werden. Damit stellt diese Arbeit auch erstmals Hinweise auf einen Einfluss von GRP78 auf CaMKII-Aktivität vor und eröffnet zudem Möglichkeiten für neue präventive Maßnahmen und ein besseres Verständnis der Doxorubizinkardiotoxizität.

SUMMARY

The Anthracycline is one of the most widely prescribed chemotherapeutics. However, its use is limited by its cardiotoxicity with the threat of developing cardiomyopathy. As therapeutic options so far are limited to a mere symptomatic treatment, the focus lies on reduction of the cumulative Doxorubicin dose. The only protective therapy is not suited for a large patient collective - children and youths. Therefore novel strategies for the protection of the heart against Doxorubicin have to be developed.

An interesting approach is the translation of natural anthracycline resistance mechanisms from the tumour to cardiac therapy. The ER chaperone "Glucose Regulated Protein 78" (GRP78) is upregulated in many tumours and seems to protect them from anthracycline treatment. The aim of this thesis therefore was to investigate the protective potential of a cardiac specific viral GRP78 overexpression in clinically relevant *in vitro* and *in vivo* models of Doxorubicin cardiotoxicity.

In the *in vitro* model, Doxorubicin cardiotoxicity was shown by high levels of apoptosis. Doxorubicin cardiotoxicity was also characterized by the accumulation of p53 and the activation of "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II" (CaMKII), which is connected to Doxorubicin induced DNA damage and disturbed Ca²⁺ homeostasis. In line with these findings the Doxorubicin treated mice in the *in vivo* mouse model had elevated levels of the cardiac cell death marker TroponinT (hsTnT) and developed early signs of a contractile dysfunction. With GRP78 overexpression the p53 levels and CaMKII activation were diminished *in vitro*, as was apoptosis. *In vivo* GRP78 overexpression led to a reduction of hsTnT plasma levels and a significant improvement of ventricular relaxation. In addition, a pronounced prolongation of overall survival was observed.

In conclusion, this thesis contains the first ever proof, that cardiac overexpression of GRP78 protects from Doxorubicin cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. With changes in p53 levels and CaMKII activation the protective effect could be connected to the regulation of DNA damage response and Ca²⁺-homeostasis. This thesis also was able to present first time evidence for GRP78 influencing CaMKII activity. Thus, these findings open up new possibilities for preventive strategies and the understanding of Doxorubicin cardiotoxicity.

1 Einleitung

1.1 Doxorubizin

Doxorubizin gehört zur Gruppe der Anthrazykline. Einer Klasse von aus *Streptomyces* isolierten Antibiotika und ist ein Derivat des ebenfalls als Chemotherapeutikum verwendeten Daunorubicin. Weitere Anthrazykline sind Epirubicin, und Idarubicin. Zwischen den verschiedenen Anthrazyklinen können Unterschiede in der Wirkung und Nebenwirkung bestehen [1]. Alle Anthrazykline haben jedoch als Gemeinsamkeit einen planaren aromatischen Ring mit einer Chinonstruktur. Chinone können über radikalische Zwischenverbindungen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen. Diese werden unter anderem für die Nebenwirkungen der Anthrazykline verantwortlich gemacht (siehe Kapitel 1.2).

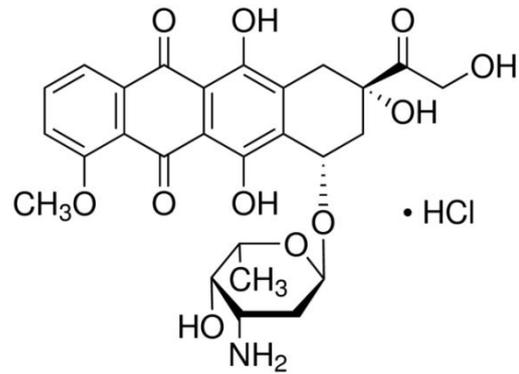


Abbildung 1.1.1: Strukturformel von Doxorubicin-Hydrochlorid. Quelle: www.sigmaaldrich.de

1.1.1 Klinische Anwendung von Doxorubizin als Chemotherapeutikum

Doxorubizin ist bis heute eines der am häufigsten angewendeten Chemotherapeutika. Es findet eine sehr breite Anwendung unter anderem bei metastasierendem Mammakarzinom, Non-Hodgkin-Lymphom und Morbus Hodgkin. Meist wird Doxorubizin als adjuvante Therapie zusammen mit anderen Chemotherapeutika angewandt.

Aufgrund des Auftretens von Kardiomyopathien ist bei der Behandlung mit Doxorubizin eine vorhergehende kardiale Untersuchung hinsichtlich von Vorerkrankungen indiziert. Risikofaktoren sind unter anderem bestehende Kardiomyopathien und eine gleichzeitige oder vorhergehende mediastinaler/perikardialer Bestrahlung [2]. Außerdem muss beachtet werden, dass sich durch Kombination mit anderen Chemotherapeutika das kardiale Risiko erhöhen kann [3]. Bei diesen Patienten wird daher empfohlen die Entwicklung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) während und auch noch einige Jahre nach der Behandlung zu verfolgen und die kumulative Dosis auf 400mg/m^2 Körperoberfläche zu beschränken.

1.1.2 Doxorubizin induzierte Herzinsuffizienz

Bei der chemotherapeutischen Behandlung mit Doxorubizin sind zwei hauptsächliche Formen der kardialen Toxizität bekannt: Die akute Toxizität und die chronische Toxizität. Die akute Toxizität tritt meist noch während der Infusion auf und äußert sich durch transiente Arrhythmien, die bei hohen Dosen lebensbedrohlich sein können. Auch andere elektrokardiographische Veränderungen wie unspezifische Veränderungen der ST-T Wellen oder Schenkelblock können auftreten. In der Regel sind diese Veränderungen jedoch transient und enden mit dem Stopp der Therapie [4].

Im Gegensatz dazu kann bei der chronischen Toxizität eine kardiale Dysfunktion noch Jahrzehnte nach Ende der Therapie auftreten. Als Risikofaktoren für das Auftreten sind Alter, bestehende Herzschäden, vorhergehende Bestrahlung des Herzens sowie genetische Faktoren bekannt [5]. Der deutlichste Zusammenhang besteht allerdings mit der kumulativen therapeutischen Dosis. Die Wahrscheinlichkeit einer Kardiomyopathie steigt proportional mit der angewandten kumulativen Dosis [6] (siehe Abbildung 1.1.2).

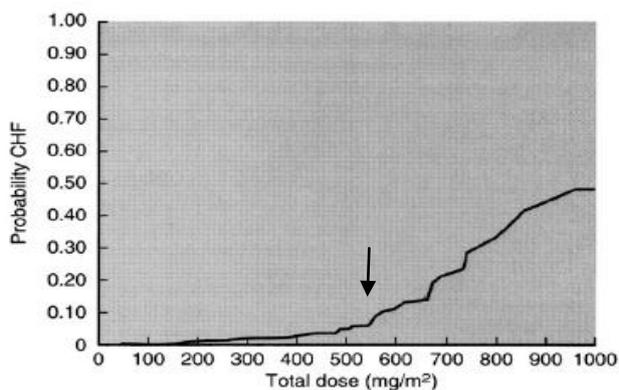


Abbildung 1.1.2: Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz in Abhängigkeit von der kumulativen Gesamtdosis Doxorubizin. Grafik aus [6].

Die maximale empfohlene Dosis von $550\text{mg}/\text{m}^2$ führt bei 4% - 36% der Patienten zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz [7]. Das Einsetzen der Symptome folgt dabei keinem zeitlich einheitlichem Verlauf. Einige Patienten entwickeln bereits während der Therapie eine Herzinsuffizienz, andere erst bis zu 40 Jahre später [5]. Sie zeigen ein für eine dilatative Kardiomyopathie typisches Bild mit einem vergrößertem endsystolischem und enddiastolischem Volumen und damit einer verringerten linksventrikulären Ejektionsfraktion auf $<50\%$ [8].

Durch die verbesserten onkologischen Therapieoptionen und damit steigende Überlebenschancen muss gerade auch in Hinblick auf das junge Alter vieler mit Doxorubizin behandelter Krebspatienten die Gefahr einer späteren Doxorubizin induzierten Kardiomyopathie im Blick behalten werden. Verschärft wird die Situation dadurch, dass Anthrazykline bei Kindern und Jugendlichen eine erhöhte Kardiotoxizität aufweisen [9-11]. Dabei werden 60% der Kinder mit malignen Erkrankungen inzwischen mit Anthrazyklinen behandelt [11].

1.2 Zytotoxische Wirkung von Doxorubizin

Allgemein ist inzwischen anerkannt, dass durch Doxorubizin induzierter Zelltod eine Ursache für die Ausbildung der Doxorubizinkardiomyopathie darstellt. Die Art und Ursache des induzierten Zelltodes sind jedoch strittig. So ist z.B. auch der Caspase3- unabhängige Zelltod mit der Aktivierung des mitochondrialen Proteins "*Apoptosis Inducing Factor*" (AIF) an der Doxorubizintoxizität beteiligt [12]. Dennoch ist die klassische Apoptose mit Caspase3-Spaltung die am besten charakterisierte durch Doxorubizin ausgelöste Form des Zelltodes. Doxorubizin kann sowohl den intrinsischen Apoptosesignalweg aktivieren, für den ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und Cytochrom c Ausstrom charakteristisch sind, als auch den extrinsischen Apoptosesignalweg, der rezeptorvermittelt über Fas/FasLigand initiiert wird [13, 14]. Beide Apoptosesignalwege laufen in der Aktivierung von Caspase3 zusammen.

Interessant ist, dass das apoptotische Potential in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Herzens unterschiedlich ausgeprägt ist. Neonatale Kardiomyozyten exprimieren ein höheres Level an apoptotischen Proteinen verglichen mit adulten Kardiomyozyten. Dadurch reagieren neonatale Kardiomyozyten auch empfindlicher auf Doxorubizin [15]. Dies erklärt unter Umständen die klinische Beobachtung, dass Kinder und Jugendliche bei einer Anthrazyklinbehandlung eher eine Kardiomyopathie entwickeln als Erwachsene [10].

Die molekularen Ursachen für die zytotoxische Wirkung von Doxorubizin sind seit langem Gegenstand intensiver Forschungen. Es werden Störungen in der Ca^{2+} -Homöostase, die Bildung von ROS sowie die Inhibition der Topoisomerasell und dadurch initiierte DNA-Schädigungen diskutiert. Diese Punkte sollen daher in den folgenden Kapiteln genauer betrachtet werden.

1.2.1 Störungen der Ca^{2+} -Homöostase

Die intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und deren Veränderungen dienen allgemein als wichtige Signalgeber z.B. für die Exozytose von Neurotransmittern oder die Kontraktion von Muskelzellen [16, 17]. Wichtigster Ca^{2+} speicher ist das endoplasmatische /sarkoplasmatische Retikulum (ER/SR). Es stellt den Ca^{2+} Speicher für die Erregungs-Kontraktionskopplung im Rahmen der konzertierten Kontraktion der Kardiomyozyten dar. Hier sind dysregulierte Ca^{2+} Ströme ein großer Störfaktor. Das Auftreten von Arrhythmien bei der akuten Doxorubizintoxizität weist bereits auf einen dysregulierten Ca^{2+} -Haushalt hin [18]. Es konnte allerdings auch direkt gezeigt werden, dass Doxorubizin ein diastolisches SR Ca^{2+} Leck induziert und zu einer Depletion des SR Ca^{2+} Gehalts führt [19]. Dadurch können vorzeitige Kontraktionen und eine diastolische bzw. eine systolische Dysfunktion ausgelöst werden [20].

Wie es zu diesen Doxorubizin induzierten Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase kommt, ist noch nicht im Detail geklärt. Frühe Arbeiten konnten allerdings zeigen, dass Doxorubizin an den Ryanodinrezeptor (RyR) bindet und dessen Öffnungswahrscheinlichkeit verändert [19]. Der Ryanodinrezeptor leitet in der Systole den Ca^{2+} Ausstrom aus dem SR in das Cytosol, wodurch die Kontraktion ausgelöst wird. Tatsächlich sind Veränderungen in der Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR eine Hauptursache des diastolischen Ca^{2+} Lecks [21].

Die Auswirkungen einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase sind allerdings nicht nur auf das SR und die Kontraktilität beschränkt. Mitochondrien und SR sind eng aneinander gekoppelt. Veränderung in den SR Ca^{2+} spiegeln wirken sich so auch in den Mitochondrien aus [22]. In den Mitochondrien tragen die Ca^{2+} spiegel zur Regulation der oxidativen Vorgänge und ATP Produktion bei, initiieren aber auch die Öffnung der "Membrane Permeability Transition Pore" und damit den apoptotischen Zelltod [23, 24]. Ein Anstieg des mitochondrialen Ca^{2+} Gehalts mit einer darauf folgenden mitochondrialen Dysfunktion und Apoptose wurde auch in der Doxorubizintoxizität nachgewiesen [25, 26]. Die Regulation der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase wird daher als ein Auslöser der Doxorubizinkardiotoxizität diskutiert.

Aufgrund dieser elementaren Funktion von Ca^{2+} in Kontraktionskopplung und Apoptose sind die Ca^{2+} Spiegel und Ca^{2+} transportierende Kanäle streng reguliert. In diesem Zusammenhang nimmt die durch Ca^{2+} regulierte Kinase " Ca^{2+} /Calmodulin Modulated Kinase II" (CaMKII) eine prominente Rolle ein, weshalb ihre Funktion und Regulation im Folgenden gesondert dargestellt werden soll.

1.2.1.1 CaMKII - Regulation und pathologische Rolle

Von den 4 Isoformen der CaMKII ist die CaMKII δ die im Herzen hauptsächlich exprimierte Isoform [27]. CaMKII liegt normalerweise als Multimer aus 2 hexamerisch angeordneten Ringen vor. Jedes Monomer besitzt eine katalytische, eine Assoziations- und eine regulatorische Domäne. Im nicht aktivierten Zustand sind die katalytischen Domänen durch die regulatorischen blockiert und inhibiert. Bei erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Spiegeln bindet Ca^{2+} /Calmodulin an die regulatorische Domäne, die daraufhin die katalytische Domäne für Substrate oder die Phosphorylierung freigibt [28].

Eine weitere Regulation kann durch Oxidierung an MetMet 281/282 und bei langanhaltenden hohen Ca^{2+} Spiegeln durch Phosphorylierung an Thr 286 erfolgen. Durch diese Modifikationen wird CaMKII Ca^{2+} /Calmodulin unabhängig aktiv [29]. Im Falle der Oxidierung kann die Ca^{2+} Sensitivität sogar so weit herabgesetzt werden, dass CaMKII ohne nennenswerte Erhöhung der Ca^{2+} Spiegel aktiviert wird [30].

Hauptziele der aktivierten CaMKII sind Ionenkanäle und Transporter der Erregungs-Kontraktionskopplung, wie z.B. der L-Typ Ca^{2+} Kanal, der RyR und das regulatorische Protein Phospholamban (PLN). Es ist daher nicht überraschend, dass eine erhöhte CaMKII-Aktivität eng mit der Ausbildung pathologischer Zustände verknüpft ist, so z.B. mit dem Ischämie/Reperfusionsschaden, Herzinfarkt, dilatativer Kardiomyopathie und Hypertrophie [31].

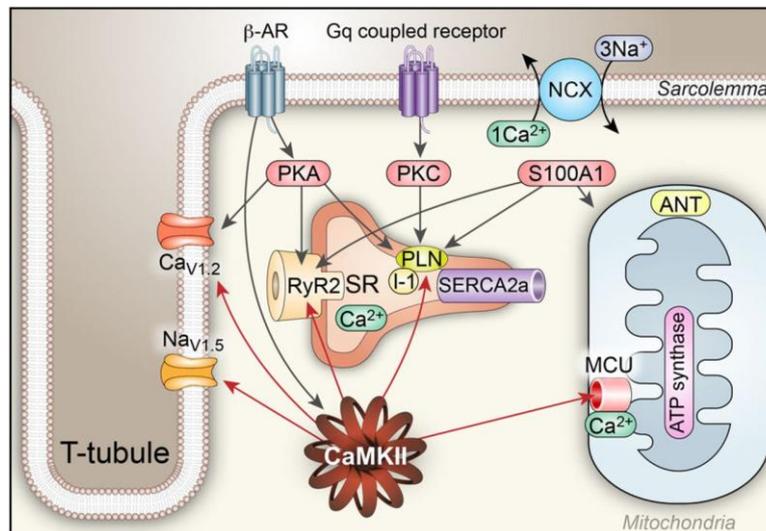


Abbildung 1.2.1: Schematische Darstellung der an der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase beteiligten Proteine und deren Interaktion. Für den Zusammenhang in dieser Arbeit ist relevant, dass CaMKII den Ryanodinrezeptor (RyR) und Phospholamban (PLN) am Sarcoplasmatischen Retikulum phosphoryliert und so den Austritt von Ca^{2+} und die Wiederaufnahme von Ca^{2+} steuert. Außerdem reguliert CaMKII den mitochondrialen Ca^{2+} -Strom durch den mitochondrialen Ca^{2+} Uniporter (MCU). Weitere Abkürzungen: $\text{Na}_{\text{V}1.5}$ -Spannungsabhängiger Natrium-Kanal, $\text{Ca}_{\text{V}1.2}$ -Spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX), Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase A (PKA), Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a), Adenosin Nukleotid Translocator (ANT). Bild aus: [32].

Durch die CaMKII abhängige Phosphorylierung von PLN an Thr17 erhöht sich der diastolische SR- Ca^{2+} gehalt über die Aufhebung der Inhibierung von "Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum ATPase" (SERCA) - einem Ca^{2+} Transporter der nach der Systole Ca^{2+} aus dem Cytosol zurück ins SR transportiert. Die Phosphorylierung des RyR an Ser2814 oder Ser 2809 führt zu einem diastolischen Ca^{2+} Leck und erhöhtem Ausstrom von Ca^{2+} in der Systole. Das Zusammenspiel von durch die PLN Phosphorylierung erhöhten diastolischen SR Ca^{2+} Gehalt und dem durch den RyR induzierten Ca^{2+} Leck scheint ursächlich für die Ausbildung von ventrikulären Arrhythmien im Zusammenhang mit Ischämie/Reperfusion, Herzversagen, aber auch von Arrhythmien genetischen Ursprungs zu sein [28].

Analog zur Rolle von Ca^{2+} wird auch eine Funktion der CaMKII im apoptotischen Zelltod immer deutlicher. So ist eine hohe CaMKII δ Aktivierung ein gemeinsames Kennzeichen vielfältiger apoptotischer Stimuli von H_2O_2 bis hin zu UV Strahlung [33, 34]. Mechanistisch konnte der pro-apoptotische Effekt von CaMKII erst kürzlich mit der Phosphorylierung des RyR und mit der Phosphorylierung des mitochondrialen Ca^{2+} Uniporters in Verbindung gebracht werden [35]. CaMKII induziert also auch Apoptose über die Veränderung der zytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} Ströme.

1.2.2 Mitochondriale Dysfunktion und ROS -Bildung

Aufgrund der chemischen Eigenschaften von Doxorubizin als Quinon wurde lange Zeit eine direkte Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Doxorubizin als Auslöser der Apoptose diskutiert. Doxorubizin bindet demnach zweiwertiges Eisen und überführt dieses

in dreiwertiges Eisen. Durch das frei werdende Elektron wird Sauerstoff reduziert, ROS werden gebildet [36]

Aber auch in den Mitochondrien können ROS als Nebenprodukt der respiratorischen ATP Produktion entstehen, werden allerdings insbesondere bei Störungen der mitochondrialen Funktion gebildet. Doxorubizin löst eine Vielzahl von Signalkaskaden aus, von denen die meisten auch zu spezifischen Effekten an den Mitochondrien führen. So verändert die Interaktion von Doxorubizin mit der Topoisomerasell deren Sequenzspezifität, so dass es bevorzugt in Genen für die Biogenese der Mitochondrien zu Doppelstrangbrüchen kommt [37]. Außerdem wurde gezeigt, dass Doxorubizin mitochondriale DNA schädigt [38]. Auch die Aktivierung von p53 z.B. durch DNA Schädigung führt im Falle irreparabler Schäden zu einer Instabilisierung der Mitochondrien (siehe Kapitel 1.2.4). Dementsprechend induziert Doxorubizin eine mitochondriale Dysfunktion, die mit einer frühen von den Mitochondrien ausgehenden ROS Bildung verbunden ist [25].

In den Mitochondrien induzieren ROS einen Verlust des Membranpotentials und die Oxidation von Cardiolipin [39]. Dies führt zum Ausstrom von Cytochrom c ins Cytosol und damit zur Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs [40].

1.2.3 DNA Schädigung durch Topoisomerasehemmung

Nachdem die direkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies lange Zeit als primäre Ursache der Doxorubizinzytotoxizität galt, liegt mittlerweile das Augenmerk mehr auf dessen Funktion als Topoisomerasehemmer. Es sind zwei Isoformen der Topoisomerasell bekannt: Topoisomerasell α und Topoisomerasell β . Während die Topoisomerasell α hauptsächlich in proliferierenden Zellen und damit auch in Tumoren vorkommt, wird der Typ II β ubiquitär in allen Geweben, auch den kardialen Zellen, exprimiert [41]. Wichtigste Funktion der Topoisomerasell II ist die Relaxation der DNA bei der Replikation, Rekombination und Transkription durch eine transiente Einführung von Doppelstrangbrüchen. Doxorubizin bindet an beide Topoisomerasell Isotypen und inhibiert deren Ligasefunktion, sodass die Doppelstrangbrüche persistieren [37, 42]. Gleichzeitig scheint durch Doxorubizin auch die Sequenzspezifität der Topoisomerasell beeinflusst zu werden. So konnte gezeigt werden, dass die TopoisomerasellII nach Doxorubizingabe spezifisch in der Promotorregion von Genen für die mitochondriale Biogenese und Funktion bindet, wodurch deren Transkription gestört wird [37].

Die durch die inhibierte Topoisomerasell induzierten Doppelstrangbrüche setzen auf molekularer Ebene die Aktivierung der Antwort auf DNA Schädigung in Gang. Neben der Induktion von Reparaturenzymen sind im Falle großer Schäden die Aktivierung und Induktion von p53 sowie Apoptose ein Teil dieser Antwort [43]

1.2.4 Die Rolle von p53 in Apoptose, DNA Schädigung und ROS Bildung

Der Tumorsuppressor p53 verknüpft zwei elementare Mechanismen der Doxorubizintoxizität miteinander. So wird p53 als Antwort auf DNA Schädigung phosphoryliert und akkumuliert [44]. Es häufen sich allerdings auch Hinweise auf einen direkten Einfluss des Redox Status auf die p53 Aktivierung [45]. Nach der Aktivierung von p53 kann der Zelltod auf unterschiedliche Art und Weise initiiert werden. Der bekannteste Mechanismus ist die Transkription proapoptotischer Gene und die Repression antiapoptotischer Gene. Dazu gehört insbesondere die Expression der "BH3 only" Mitglieder der bcl-2 Protein Familie - Bax, Noxa und PUMA - die wichtige Induktoren des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalwegs darstellen. Durch die erhöhte Bax Expression, dessen Homo-Oligomerisierung und dadurch induzierte Translokation zur mitochondrialen Membran kommt es zur Bildung proapoptotischer Porenkomplexe [46]. Die Folge ist der Ausstrom von Cytochrom c in das Cytosol und die Aktivierung der Caspasekaskade.

Neben diesem klassischen Weg der Aktivierung der Apoptosekaskade können über p53 alternative, zum Teil auch Caspase3 unabhängige, Zelltod-Routen aktiviert werden. Dies geschieht durch die Hochregulation des Fas Rezeptors (Rezeptoren?) in der Membran oder die Translokation des apoptosis inducing factor (AIF) [47].

Die zentrale Rolle von p53 in der Apoptose ist schon lange bekannt. Neuere Forschungsergebnisse machen allerdings die zusätzliche Bedeutung von p53 bei der Regulation oxidativer Vorgänge und auch der Bildung von ROS immer deutlicher. Im basalen Zustand reguliert p53 die Respiration und damit auch Level an ROS [48]. Bei hohen p53 Level wirkt die Induktion von Bax und PUMA jedoch pro-oxidativ. Sie entkoppeln den Energietransfer in den Mitochondrien, was die Bildung von ROS und letztendlich den Zelltod unterstützt [49]

Zusätzlich zu dieser Regulation von ROS Produktion und Zelltod auf transkriptioneller Ebene, kann p53 diese Prozesse auch durch direkte Interaktion regulieren. Bei hoher cytosolischer Expression translozieren - noch vor der Initiierung transkriptioneller Vorgänge im Nukleus - ca. 2% von p53 in die Mitochondrien [50]. Dort führt p53 zur Schwächung der mitochondrialen Integrität und löst direkt ROS Bildung, Cytochrom c Ausstrom und Zelltod aus [51, 52]

Apoptose und ROS Bildung sind also über p53 auf vielfältige Art miteinander verknüpft. Daher ist es nicht überraschend, dass die Doxorubizinbehandlung zu einer starken Akkumulation von p53 führt [53].

1.3 Besondere Anfälligkeit der Kardiomyozyten

Die zytotoxische Wirkung von Doxorubizin ist Grundlage der Anwendung als Chemotherapeutikum. Dabei sind Nebenwirkungen nicht zu vermeiden. Warum allerdings Kardiomyozyten offenbar besonders von den Nebenwirkungen betroffen sind, ist noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit ist die bevorzugte Anreicherung von Doxorubizin in Kardiomyozyten. Doxorubizin bindet an das in der inneren Membran der Mitochondrien vorkommende Phospholipid Cardiolipin. Dadurch kommt es zur Anreicherung in Mitochondrien. Da Mitochondrien ca. 30% der Myokardmasse ausmachen, könnte dies die besondere Anfälligkeit von Kardiomyozyten erklären [54]. Eine andere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass Kardiomyozyten ein ausgedehntes Sarkoplasmatisches Retikulum besitzen, das als Ca^{2+} -Speicher für die Kontraktion dient. Das macht sie eventuell besonders empfindlich gegenüber Störungen der Ca^{2+} -Homöostase, wie sie Doxorubizin induziert. Da eine Ursache für die spezielle Anfälligkeit der Kardiomyozyten noch nicht bekannt ist, wird auf anderem Weg versucht der Doxorubizinkardiotoxizität entgegenzuwirken.

1.4 Ansätze zur Reduktion der Kardiotoxizität

Auch wenn in den letzten Jahren einige Fortschritte in der Erforschung der Doxorubizinkardiotoxizität gemacht wurden, ist es dennoch nicht gelungen, eine erfolgreiche Therapie zu entwickeln, die bei den Ursachen der Kardiotoxizität ansetzt. Tritt eine linksventrikuläre Dysfunktion auf, so erfolgt lediglich eine symptomatische Therapie, die der Standardtherapie der systolischen Herzinsuffizienz (z.B. ACE Hemmer, Angiotensinhemmer, Betablocker) folgt [5].

Daher wird versucht prophylaktisch die Menge an Doxorubizin, die das Herz erreicht zu beschränken, z.B. durch Reduktion der verabreichten Gesamtdosis. Diese Vorgehensweise steht allerdings unter Umständen im Konflikt mit der Behandlung des Tumors. Weiterentwicklungen, wie z.B. Veränderungen der pharmakokinetischen Eigenschaften von Doxorubizin durch die Verpackung in Liposomen, sollen daher die Toxizität mildern, indem sie die Freisetzung besser steuern und die Akkumulation im Herzen verringern [55]. Dennoch bildet das Medikament Dexrazoxan die einzige erfolgversprechende Option, die kardiotoxischen Effekte von Doxorubizin direkt ohne eine Reduktion der Doxorubizindosis zu verringern.

Dexrazoxan ist ein EDTA-Analog. Es bindet Eisenionen und soll infolgedessen die Bindung und Umsetzung von Eisen durch Doxorubizin, also einen der Prozesse, der an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Doxorubizin beteiligt ist, verhindern. Ursprünglich wurde Dexrazoxan jedoch als Topoisomerasehemmer entdeckt [56]. Es wird daher auch diskutiert, ob die protektive Wirkung von Dexrazoxan auf einer Inhibition der Bindung von Doxorubizin an die Topoisomerase IIB zurückzuführen ist [57]. Die Gabe von Dexrazoxan erfolgt ab

Erreichen einer kumulativen Doxorubizin Dosis von 300 mg/m² zusätzlich zur Doxorubizinbehandlung.

Bisher wurde Dexrazoxan vor allem bei Brustkrebspatienten eingesetzt, aber auch bei Patienten mit Weichteilsarkomen und Lungenkrebs. Tatsächlich konnte so die Zahl kardialer Ereignisse und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz gesenkt werden [58].

Während Dexrazoxan bei Erwachsenen erfolgreich getestet wurde, ist das Medikament bei Kindern und Jugendlichen allerdings wegen einem in dieser Gruppe erhöhtem Risiko von Zweitmalignomen und Neoplasien (insbesondere akute myeloische Leukämie) kontraindiziert [59]. Somit fehlt gerade für diese Patientenpopulation immer noch eine wirksame Prophylaxe gegen die durch Doxorubizin induzierte Toxizität. Es müssen also weiterhin neue protektive Strategien gegen die Doxorubizinkardiotoxizität entwickelt werden. Dabei kann z.B. die Untersuchung der Resistenzmechanismen von Tumoren neue Anstöße geben.

1.5 Ausweichstrategien verschiedener Tumoren - die Rolle von GRP78

Wie bei jeder Chemotherapie ist bei der Doxorubizinbehandlung neben der Ausbildung einer Kardiomyopathie die Resistenzentwicklung der Tumoren ein Problem. Die Ursachen der Resistenzausbildung sind dabei vielfältig. Beispiele sind ein vermehrter Transport des Medikaments aus der Zelle z.B. über erhöhte Expression von ABC (ATP-binding cassette)-Transportern oder veränderte Topoisomerase-Level [60, 61]. Dabei häufen sich auch Forschungsergebnisse, die Zellwachstum, Überleben und Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika mit dem ER Chaperon "Glukose reguliertes Protein 78" (GRP78) in Verbindung bringen. In verschiedenen Tumorspezies konnte eine Hochregulation von GRP78 nachgewiesen werden, so z.B.: Brustkrebs, Gliomazellen, Darmkrebs. Bei Brustkrebspatienten besteht eine inverse Korrelation zwischen Überleben und der GRP78 Expression [62]. Auch in verschiedenen Tumorzelllinien schützt eine GRP78 Überexpression vor der Behandlung mit verschiedenen Topoisomeraseinhibitoren [63, 64].

Einen weiteren Hinweis auf eine protektive Rolle von GRP78 gegenüber Zytostatika geben Experimente mit verminderter GRP78 Aktivität. Durch den Knockdown von GRP78 oder die Inhibierung der ATP Bindestelle von GRP78 konnten verschiedene Krebszelllinien gegenüber unterschiedlichen Chemotherapeutika sensitiviert werden [65].

Diese Beobachtungen machen GRP78 zu einer interessanten Option für den Schutz der Kardiomyozyten vor der Doxorubizinkardiotoxizität.

1.6 Das Glukose regulierte Protein 78

GRP78 gehört zur Familie der HSP70 Hitzeschock Proteine. Als erstes entdeckt, und daher am Besten untersucht, wurde die Funktion von GRP78 als Chaperon im ER, wo es ein essentieller Vermittler der "Unfolded Protein Response" ist, mit der das ER auf Stresssituationen reagiert. Bei Stress wird GRP78 im ER transkriptionell hochreguliert, weshalb es auch als ER stress Marker fungiert. Im Zuge neuerer Forschungen konnte gezeigt werden, dass unter Stress GRP78 auch an die Membran transloziert und es zur Expression einer verkürzten cytosolischen Form kommt, der das ER Retentionssignal (KDEL) fehlt [66]. Noch wenig erforscht ist hingegen die Funktion von GRP78 im Nukleus, wo es z.B. nach Überexpression zu finden ist [64].

Tatsächlich bestehen Überschneidungen zwischen den unterschiedlichen Funktionen von GRP78 und den diskutierten Mechanismen der Doxorubizintoxizität in den verschiedenen Kompartimenten. Diese sollen daher in den nächste Kapiteln genauer betrachtet werden.

1.6.1 Chaperon und Vermittler der ER Stress Antwort im Endoplasmatischen Retikulum

GRP78 ist ein wichtiger Signalgeber und Regulator der "Unfolded Protein Response". Damit reagiert das Endoplasmatische Retikulum auf Störungen in der Proteinsynthese, durch die es zur Ansammlung falsch gefalteter oder fehlerhafter Proteine kommt. Auslöser für den ER Stress können Änderungen in den oxidativen Bedingungen, Glukosemangel und Störungen in der Ca^{2+} -Homöostase sein [67].

Als ER Stress Sensor dienen Komplexe aus GRP78 und einem der ER ansässigen Transmembranproteine "aktivierender Transkriptionsfaktor 6" (ATF6), "*inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease 1*" (IRE1) und "*pancreatic ER kinase*" (PERK). Im Komplex mit GRP78 sind sie nicht aktiv. Kommt es nun zur Anhäufung falsch gefalteter Proteine dissoziiert GRP78 aufgrund seiner Funktion als Chaperon von den Rezeptoren, die dadurch in ihren aktiven Zustand versetzt werden.

Die dadurch aktivierte ER Stress Antwort, lässt sich in zwei Phasen einteilen. Zunächst versucht die Zelle im Rahmen der adaptiven ER Stress Antwort durch die Expression protektiver Proteine wie z.B. GRP78 die Proteinfaltung zu unterstützen oder falsch gefaltete Proteine auszuschleusen und abzubauen. Schlägt dieser Versuch fehl, kommt es zur Aktivierung der negativen ER Stress Antwort, durch die apoptotische Programme initiiert werden. In dieser Phase des ER stress wird die Expression des "C/EBP homologen Proteins" (CHOP) erhöht, das als Induktor des ER stress vermittelten Zelltodes gilt [66]. Wie das Umschalten von adaptivem zu negativem ER Stress reguliert wird, ist noch nicht geklärt. Auch scheint die Ausbildung der adaptiven Antwort innerhalb unterschiedlicher Zelltypen und mit dem Entwicklungsstadium zu variieren[68].

1.6.2 GRP78 als Membranrezeptor

Das Vorhandensein von membran-lokalisierendem GRP78 konnte seit der ersten Entdeckung 1997 inzwischen in verschiedenen Zelltypen und Zelllinien nachgewiesen werden. Die Funktion von GRP78 als Membranrezeptor scheint vor allem im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen zu stehen. So wird das Molekül bei Veränderungen der Zellproliferation (z.B. in Tumoren), des Glukosestoffwechsels (Glukosedepression) oder auch bei Hypoxie in der Zellmembran gefunden [67].

Verschiedene maligne Zelllinien (unter anderem Lymphome, Leukämie B-Zellen, Neuroblastome, Lungenadenocarcinom, Melanom, Osteosarcom, Brustkrebs) exprimieren GRP78 auf der Zellmembran. Membranständiges GRP78 bindet als Rezeptor extrazelluläre Proteine, durch die entweder Zellproliferation, Überleben und Metastasierung ausgelöst werden können [67]. Die Bindung von alpha 2 Makroglobulin an membranständiges GRP78 aktiviert zum Beispiel die Proliferation über den ERK1/2 p38 MAPKinase Pathway und induziert ein Überlebenssignal über PI3K/AKT/NFkappaB Aktivierung [69]. Andererseits scheint die Bindung z.B. von Par-4, aber auch die Bindung eines gegen den C-Terminus gerichteten GRP78 Antikörpers, eine dem Todesdomänen Rezeptor Fas ähnliche Reaktion mit der Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges auszulösen [70, 71]. Es wird daher überlegt diesen Mechanismus zu nutzen, um gezielt Apoptose in GRP78 exprimierende Tumoren auszulösen.

1.6.3 GRP78 in der Ca²⁺-Homöostase

Die enge Verknüpfung des SR mit der Ca²⁺-Homöostase und seine Aufgabe als Ca²⁺-Speicher sowie die essentielle Rolle, die GRP78 in der Aufrechterhaltung der SR Funktion zu spielen scheint, machen eine Funktion von GRP78 in der Regulation des Ca²⁺ Haushaltes wahrscheinlich.

Tatsächlich verhindert ER stress - insbesondere GRP78 und GRP94 - den durch Iodoacetamide induzierten Anstieg von intrazellulärem freiem Ca²⁺ und Zelltod in Endothelzellen [72]. Einen eindeutigen Hinweis bieten auch Versuche in Astrozyten, die ischämischen Stress unterzogen wurden. Dort erniedrigt die Überexpression von GRP78 den Ca²⁺ Fluss vom ER in die Mitochondrien, verringert die Bildung von ROS und erhält das mitochondriale Membranpotential aufrecht [73].

Das ER und die Mitochondrien sind in der Ca²⁺-Homöostase eng aneinander gekoppelt. Dies wird durch enge Kontaktstellen zwischen den Organellen, den sogenannten MAMs (Mitochondrien-assoziierte Membranen) erreicht. Dort wird Ca²⁺ über spezifische Kanäle, die Inositol 1,4,5-Triphosphatrezeptoren (IP3R) vom SR in die Mitochondrien geleitet. Zusammen mit dem Sigma-1 Rezeptor reguliert GRP78 als Ca²⁺ sensor die IP3R Kanäle [74]. Diese Beispiele verdeutlichen, dass GRP78 an der Regulation cytosolischer und mitochondrialer Ca²⁺-Spiegel beteiligt ist.

1.6.4 GRP78 und DNA Schädigung

Bei hoher Expression oder Aktivierung von ER Stress kann GRP78 in den Nukleus translozieren [67]. Interessanterweise zeigte sich, dass nukleäres GRP78 (ohne ER Leadersequenz) die Fähigkeit zur Bindung an DNA besitzt [75].

Darüber hinaus fand eine UV-crosslinking Studie GRP78 als eines der Proteine, die nach Bestrahlung mit der DNA verlinkt sind. Dies setzt voraus, dass GRP78 zum Zeitpunkt der Bestrahlung in einem Abstand weniger nm von der DNA zu finden ist. Außerdem könnte dies auch auf eine Rolle von GRP78 bei durch Crosslinking verursachten Störungen der Replikation und der DNA-Reparatur hinweisen [76]. Auf eine Beteiligung von GRP78 im DNA Reparaturprogramm lassen auch andere Versuche schließen. So macht der Knockdown von GRP78 humane RSa Zellen empfindlicher gegenüber UV induzierter DNA Schädigung [77]. Dies alles sind Hinweise auf eine Rolle von GRP78 in der DNA-Reparatur. Ein möglicher Mechanismus, der die Funktion von GRP78 in diesem Zusammenhang genauer erklärt, konnte allerdings noch nicht gefunden werden.

1.7 Rationale und Zielsetzung

Fehlende präventive Maßnahmen zur Verhinderung einer Doxorubizinkardiomyopathie insbesondere für junge Krebspatienten schränken den Einsatz von Doxorubizin immer noch erheblich ein. Auf der Suche nach neuen therapeutischen Strategien stellt GRP78 eine interessante Option dar, da protektive Effekte durch GRP78 als eine Ursache der Tumorresistenzbildung angesehen werden. Obwohl eine antiapoptotische Wirkung von GRP78 bereits beschrieben wurde, erfolgte noch keine Translation dieser Erkenntnisse in den kardialen Bereich

Die vorgelegte Arbeit hatte daher folgende Zielsetzungen:

- 1) Etablierung und Charakterisierung eines relevanten *in vivo* und *in vitro* Modells der Doxorubizinkardiotoxizität**
- 2) Untersuchung möglicher antiapoptotischer Effekte einer GRP78 Expression im Rahmen der Doxorubizintoxizität und Identifizierung möglicher Mechanismen des protektiven Effekts.**
- 3) Überprüfung des protektiven Effekts im *in vivo* Modell der Doxorubizinkardiomyopathie.**

Für die Untersuchungen sollte GRP78 durch einen spezifischen, virusvermittelten kardialen Gentransfer in den Kardiomyozyten überexprimiert werden. Die Überexpression mittels Adeno-assoziiierter Viren bietet den Vorteil, dass relativ selektiv das Myokard transfiziert werden kann, sodass im Sinne einer zielgerichteten Therapie nur das Herz und nicht der Tumor geschützt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1.1 *Allgemeine Chemikalien*

Tabelle 2.1.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten allgemeinen Chemikalien.

0,9% NaCl-Lösung, steril	B.Braun, Melsungen
Agarose	Sigma Aldrich, München
Aqua ad injectabilia	B.Braun, Melsungen
Bacto Trypton -pancreatic digest of Casein	BD, Franklin Lakes, USA
BSA	Sigma Aldrich, München
Chloroform	Sigma Aldrich, München
D-(+) Glukose, wasserfrei	Merck, Darmstadt
D-(+)Saccharose RNase/DNAse frei	Carl-Roth, Karlsruhe
DC™ Protein Assay Reagent Kit	Bio-Rad, München
DEPC H ₂ O	Carl-Roth, Karlsruhe
DNS Längenstandard 100 bp	Thermo Scientific, Schwert
Doxorubizin Hydrochlorid	Sigma Aldrich, München
DTT	Sigma Aldrich, München
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 99 % vergällt mit 1 % Petrolether	Sigma Aldrich, München
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Sigma Aldrich, München
Glutaraldehyd (25 %)	SERVA GmbH, Heidelberg
Glycerin	Carl-Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
HCl	VWR, Darmstadt
Hefeextrakt für die Bakteriologie	Carl-Roth, Karlsruhe
HEPES -PUFFERAN	Carl-Roth, Karlsruhe
HiPerfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
iBlock Reagenz (Tropix I-Block)	AppliedBiosystems, Carlsbad, USA
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
KCl	AppliChem, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Laminin	Sigma Aldrich, München
LiCl	Sigma Aldrich, München
MeOH	Sigma Aldrich, München
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Na ₂ Pyrophosphat	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	Grüssing GmbH Analytika, Filsum
NaCl	Carl-Roth, Karlsruhe
Na-Deoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaF	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaOH	Sigma Aldrich, München
NP40 (Nonidet P40)	Sigma Aldrich, München

Phosphatase Inhibitor Cocktail 2,3	Sigma Aldrich, München
PMSF	SERVA GmbH, Heidelberg
Polyacryl-Carrier	Molecular Research Center, USA
Proteaseinhibitor Complete Mini EDTA-free	Roche, Mannheim
SDS in Pellets	SERVA GmbH, Heidelberg
Taurin ≥ 99% für die Biochemie	Carl-Roth, Karlsruhe
Tris	Carl-Roth, Karlsruhe
Triton X100	Sigma Aldrich, München
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Carl-Roth, Karlsruhe
Vectashield® Hard Mounting Medium/Dapi	Linaris Biologische Produkte

2.1.1.2 *Spezielle Chemikalien*

Doxorubizin

Die Doxorubizinlösung zur Injektion *in vivo* wurde als 2mg/ml Stammlösung von der Klinikapotheke bezogen und noch am selben Tag verwendet. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

2.1.1.3 *Komplettsysteme und Kits*

Tabelle 2.1.2: Übersicht über die verwendeten Komplettsysteme und Kits.

H2O2 ROS Glo AssayKit	Promega
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche
QIAGEN Plasmid Giga Kit (5).	Quiagen
QIAprep Spin Kits	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
SignalFire ECL Detection Kit	CellSignaling
ToxiLight™ Non-destructive Cytotoxicity BioAssay Kit	Lonza

2.1.1.4 *Verbrauchsmaterialien*

Tabelle 2.1.3: Allgemeine Verbrauchsmaterialien.

12 Well Platten	Corning, Kaiserslautern
184 well Platte, Lumitrac weiß	greiner bio-one, Frickenhausen
24-well Platten	Corning, Kaiserslautern
6 Well Platten	greiner bio-one, Frickenhausen
96 Well Platten	greiner bio-one, Frickenhausen
96 Well Platten, weiß	greiner bio-one, Frickenhausen
Deckgläser rund, ø 15 mm	neo lab, Heidelberg
Filter 0,45 µm, 0,33 mm Millex GS	Merck Millipore, Darmstadt
Filterpapier gefaltet	LLG Lab Logistics Group, Meckenheim
Filterpapier gefaltet	LLG Lab Logistics Group, Meckenheim
Kanülen	BD, Heidelberg
Konische Zentrifugengefäße, 500 ml	Corning;, Kaiserslautern
Kryoröhrchen, 1,5 ml	neo lab, Heidelberg

Kulturschalen, ø 145 cm, ø 6 cm	greiner bio-one, Frickenhausen
Novex Tris Glycin Gele 4-20 %	Lifetechnologies
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel, Braunschweig
PCR Gefäße, 0,2 ml	kisker Biotech, Steinfurt
PCR-Platte PP natur 96 Well	nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml RNase-, DNase-, Pyrogenfrei	nerbe plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße 12 ml, 50 ml;	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen, 5 ml 75 x 12 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Schwarzer Seidenfaden SP102 6-0	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	BD, Heidelberg
Sterilfilter 0,22 µm, 0,33 mm Millex GS	Merck Millipore, Darmstadt
Transfermembranen Porengröße 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Whatmanpapier	GE Healthcare, Freiburg
Zählkammer nach Neubauer	Hecht-Assistent;Sondheim/Rhön
Zellschaber	greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe 100 Mikron Nylon (Falcon)	VWR, Pennsylvania

2.1.1.5 *Sonstige Materialien*

Präparationsbesteck:

Schere

2 feine Pinzetten

Micro-Serrefine

(Fine Science Tools GmbH, Heidelberg)

Haken

Katheter:

PV-catheter-mouse 112-479

1.2F; 4,5mm electrode spacing

(Scisense)

DNA-Längenstandards:

GeneRuler 100 bp DNA Ladder

(Thermo Scientific)

GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder

(Thermo Scientific)

Protein Größenstandard:

SeeBlue Prestained Protein Marker

(Thermo Fisher Scientific)

Enzyme

Restriktionsenzyme und die T4-Ligase

(New England Biolabs)

Alkalische Phosphatase

(Roche)

2.1.2 Standardlösungen

2.1.2.1 Stamm-Lösungen für Molekularbiologische Arbeiten

6x Agarose Gel-Ladepuffer	30 % Glycerol (v/v) 0,25 % Bromphenol Blau (w/v) 0,05 % SDS (w/v)
RIPA Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris 50 mM EDTA 1 % NP40 (v/v) 0,5 % Desoxycholat 10 mM NaF 10 mM Na ₂ -Pyrophosphat
i-Block Blocking Puffer	10% 10x TBS 0,2% i Block (w/v) 0,1% Tween 20 (v/v)
Semi-Dry Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20 % Methanol (v/v)
10x TBS	0,25 M Tris 1,5 M NaCl 10 mM CaCl ₂ ☐ pH 7,5 ad 2,5 L mit demin. H ₂ O
10x Anodenpuffer	1 M Tris ad 1 L mit demin. H ₂ O
1x Kathodenpuffer	0,1 M Taurin 0,1 M Tris 0,1 % SDS ad 2,5 L mit demin. H ₂ O
10x TAE	400 mM Tris (pH 7.6) 200 mM acetic acid 10 mM EDTA
1x TBS-T	20 % 10x TBS (v/v) ad 0,5 L mit demin. H ₂ O 0,1 % Tween 20 (v/v)
5x SDS-PAGE Probenpuffer (Laemmli-Puffer)	30 % Glycerol (v/v) 50 mM TRIS 10 % SDS (v/v) 250 mM DTT 10 mM EDTA 0,1 % Bromphenol Blau (w/v) ☐ pH 6,8; ad 1 L mit dest. H ₂ O

2.1.2.3 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

Tabelle 2.1.4: käufliche Medien und Lösungen für die Zellkultur.

0,25% Trypsin-EDTA (1x)	Gibco (Lifetechnologies)
DMEM mit L-Glutamin	SIGMA
FCS Superior	Biochrom
HBSS	Gibco (Lifetechnologies)
HEPES Buffer Solution 1(M)	Gibco (Lifetechnologies)
L-Glutamin 200mM 100x	Gibco (Lifetechnologies)
Medium 199, HEPES Modification	SIGMA
PBS	SIGMA
Penicillin/Streptomycin (5000U/ml)	Gibco (Lifetechnologies)
Percoll	GE Healthcare

Folgende Medien für Zellkultur wurden selbst angesetzt:

Verdaulösung Trypsin-HBSS (Isolierung NRVCN)	3 % Trypsin (v/v) 3 % DNase I (v/v) 0,04 M HEPES Puffer 4 mM NaOH 2 % P/S (v/v) ad 50 ml HBSS
Stopplösung Antitrypsin-HBSS (Isolierung NRVCN)	4 % FCS-Gold (v/v) 3 % DNase I (Endkonzentration 300 U/ml) 2 % P/S (v/v) 0,06 M HEPES ad 50 ml HBSS
Kulturmedium NRVCN (10 % FCS)	Medium 199 10 % FCS Superior (v/v) 1 % P/S (v/v) 1 % L-Glutamin 1 mM CaCl ₂ Bei 4°C lagern
Kulturmedium NRVCN (0,5 % FCS)	Medium 199 0,5 % FCS Superior (v/v) 1 % P/S (v/v) 1 % L-Glutamin (v/v) 1 mM CaCl ₂ (sterilfiltriert) Bei 4°C lagern
Kulturmedium HEK 293	DMEM (mit L-Glutamin) 1% P/S 10% FCS Superior Bei 4°C lagern

10 x ADS (Isolierung NRVCM)	1163,3 mM NaCl 197,2 mM HEPES 94,2 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 55,5mM Glukose 53,6 mM KCl 8,3 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O pH mit 5M NaOH auf 7,4
1 x ADS mit Phenolrot (Isolierung NRVCM)	450 ml H ₂ O (wasser ad injectabilia) 50 ml 10x ADS 1 Spatelspitze Phenolrot Sterilfiltrieren Bei 4°C lagern
1 x ADS farblos (Isolierung NRVCM)	450 ml H ₂ O (wasser ad injectabilia) 50 ml 10x ADS Sterilfiltrieren Bei 4°C lagern
Percoll-Gradient Stocklösung (für 6 Gradienten)	36 ml Percoll 4ml 10xADS Bei 4°C aufbewahren
Percoll-Gradient Top-Lösung	13,5 ml Stocklösung 16,5ml 1x ADS mit Phenolrot Bei 4°C aufbewahren
Percoll-Gradient Bottom-Lösung	19,5 ml Stocklösung 10 ,5ml 1x ADS farblos Bei 4°C aufbewahren
Fixierungspuffer (Sulforhodamine B Färbung)	95% EtOH (v/v) 5% Eisessig (v) Lagerung bei -20°C
SRB Lösung (Sulforhodamine B Färbung)	0,4% Sulforhodamin B Natriumsalz 1% Eisessig Lagerung lichtgeschützt bei RT
Waschlösung (Sulforhodamine B Färbung)	1% Eisessig
Elutionspuffer	10mM Tris ungepuffert (pH10-10,5)

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2.1.5: Primärantikörper für Western Blotting.

Name	Eingesetzte Verdünnung	Spezies	System	Hersteller
AKT	1:1000	Rabbit	LiCor	Cell Signaling
pAKT (Ser473)	1:1000	Mouse	LiCor	Cell Signaling
GRP78	1:1000	Rabbit	LiCor	Cell Signaling
CHOP	1:1000	Rabbit	ECL	SantaCruz
Cleaved Caspase3	1:1000	Rabbit	ECL	CellSignaling
CaMKII	1:1000	Mouse	ECL	
pCaMKII (Thr286)	1:1000	Rabbit	ECL	Cell Signaling
KDEL	1:500	Mouse	LiCor	Santa Cruz
PLN	1:7500	Mouse	LiCor	
pPLN	1:5000	Rabbit	LiCor	
GAPDH	1:20 000	Mouse	LiCor/ECL	
P53	1:1000	Rabbit	ECL	CellSignaling
pHiston 2A.X (Ser139)	1:400	Rabbit	Immunfluoreszenz	CellSignaling

Sekundärantikörper

Tabelle 2.1.6: Für die Western Blot Detektion verwendete Sekundärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	System	Hersteller
goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor® 680	1: 10000	LiCor	Invitrogen
Anti-rabbit IgG (H+L) DyLight(TM)800	1: 15000	LiCor	CellSignaling
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:10000	ECL	Santa Cruz
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:10000	ECL	SantaCruz

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

Tabelle 2.1.7: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz.

	Verdünnung	Hersteller
goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor®568	1:200	Invitrogen

2.1.4 Nukleinsäuren

2.1.4.1 Plasmide

Die Plasmide wurden von Ag Müller zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.1.8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Verwendung	Antibiotikaresistenz
pUF-CMV-MLC800-spA5	GRP78 Rekombinates Plasmid Virusproduktion	Amp
pUF-CMV-MLC800-Luc	Luciferase Rekombinates Plasmid Virusproduktion	Amp
pDP9rs	Helferplasmid Virusproduktion	Amp
pDP6rs	Helferplasmid Virusproduktion	Amp
pUC18	Kontrollplasmid Klonierung	Amp

Für die ursprüngliche Klonierung von pUF-CMV-MLC800-HSPA5 verwendete Sequenz von GRP78:

```
atgatgaagttcacctggtggcgcgtgctctgctgctgctggggcgccgtgagagccgaggaagaggacaagaaagagga
cgtcggcacagtgcctggcatcgacctgggcaccacctacagctgctggtggcggttcaagaacggcagagtgaggatca
ttgccaacgaccagggcaacagaatcacccccagctacgtggccttcccccgagggcgagagactgatcggcgacgcc
gccaagaaccagctgaccagcaacccccgagaacacctggttcgacgccaagaggctgatcggcagaacctggaacgacc
cagcgtgcagcaggatatacaagttcctgccccttcaagtggtgggagaagaaaaccaagccctacatccaggtggacatcg
gcgaggccagaccaagaccttcgccccgaagagatcagcgcctatggtgctgaccaagatgaaagagacagccgaggcc
tacctgggcaagaaagtgaccacgcccgtggtgacctgcccgcctacttcaacgacgcccagagacagggccaccaagga
tgccggcacaatcgccggcctgaacgtgatgagaatcatcaacgagcccaagccgctatcgccctacggcctggaca
agagagagggcgagaagaacatcctggtgttcgatctgggagggcgacctttgacgtgtccctgctgaccatcgacaac
ggcgtgttcgaggtggtggtatacaaacggcgatacacacctggggcgagaggacttcgaccagagagtgatggaacactt
catcaagctgtataagaaaaagaccggcaaggacgtgcggaaggacaacagagccgtgcagaaactgagaagagaggtgg
agaaggccaagagagccctgagcagccagcaccaggccagaatcgagatcgagagcttcttcgaggggagaggatttcagc
gagacactgaccagagccaagttcgaggaactgaacatggacctgttcagatccaccatgaagcccgtgcaggaagtgtc
ggaagatagcgacctgaagaagtccgacatcgacgagatcgtgctggtcggcgagcaccagaatccccaaagatccagc
agctggtgaaagagtcttcaacggcaaaagagcccagcagaggcatcaaccctgacgagggccgtggcttacggcgctgct
gtgcaggctggcgctgctgtctggcgaccaggacaccggcgacctggtgctgctggacgtgtgccactgacctgggcat
cgagacagtggtggcgctgatgaccaagctgatccccagaaacacctggtgcccaccaagaagtcccagatcttcagca
ccgccagcgacaaccagcccacctgacctcaaggtgacgagggcgagcggccctgaccaaggacaaccaatctgctg
ggcacattcgacctgaccggcatccctcctgctcctcgcgcgctgcccagatcgaagtgaccttcgagatcgacgtgaa
cggcatcatcagagtgaccgcccaggaacaagggcaccggcaacaagaacaagatcaccatcaaaaacgaccagaacagac
tgacccccgaagaaatcgagagaatggtgaaacgacgcccagagaagttcgccgaagaggataagaagctgaaagagcggatc
gacaccagaaacgagctgaaagctacgcctacagcctgaagaaccagatcggcgacaaaagagaagctggcgggcaagct
gtccagcagggacaaaagaaaccatggaagggccgtggaagagaagatcgagtggtggaagccaccaggacgctgaca
tcgaggaacttcaaggccaagaagaaagaaactggaagagatcgtgcagccatcatcagcaagctgtacggctctggcggc
ccacctcctaccggcgaaagaggacaccagcgagaaggacagagctgtga
```

2.1.4.2 Oligonukleotide

Primer für quantitative Realtime PCR (Lifetechnologies),Reinigungsgrad "desalted".

Tabelle 2.1.9: Sequenzen der verwendeten Realtime PCR Primer.

Zielgen	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemperatur	Spezies
GRP78 vorwärts	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	60°C	Maus
GRP78 rückwärts	TACGCCTCAGCAGTCTCCTT		
GRP78 vorwärts	CCTGTTGCTGGACTCTGTGA	60°C	Ratte
GRP78 rückwärts	GAATACACCGACGCAGGAAT		
CHOP vorwärts	CCTAGCTTGGCTGACAGAGG	58°C	Ratte
CHOP rückwärts	CTGCTCCTTCTCCTTCATGC		
18S vorwärts	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	57-63	Ratte, Maus
18S rückwärts	GGACATCTAAGGGCATCAC		
Hprt1 vorwärts	GTCCCAGCGTCGTGATTAGC	>60°C	Maus
Hprt1 rückwärts	GTGATGGCCTCCCATCTCCT		

2.1.5 Geräte und Software

Tabelle 2.1.10: Verwendete Geräte.

Agarose-Gelkammer	Bio-Rad, München
Brutschrank, 37 °C	HEREUS, Kleinostheim
CO2 Inkubator	Thermo Scientific, Karlsruhe
Elektrophoresegerät	Bio-Rad, München
Echo Vevo 2100	FUJIFILM Sonosite, B.V., Amsterdam, Niederlande
Feinwaage	Mettler, Gießen
Fluoreszenzmikroskop IX81; CellR MT20	Olympus, Hamburg
Heraeusultifuge 4 UR	Thermo Scientific, Karlsruhe
Luminometer	Berthold, Bad Wildbach
Magnetrührer Model L-71	Labor Brand, Gießen
Megafuge Sorvall RC6	Thermo Scientific, Karlsruhe
MyIQ ICycler (PCR-Gerät)	Bio-Rad, München
Nanodrop	Thermo Scientific, Karlsruhe
Odyssey CLX	Licor, Bad Homburg
Pipetboy	neo lab, Heidelberg
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
SDS-Gelkammern XCell Surelock	Invitrogen, Karlsruhe
SemiDry Blotter	Bio-Rad, München
Spektrophotometer U-2000	Hitachi, Mannheim
Sterilwerkbank	Thermo Scientific, Karlsruhe
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
TischkühlzentrifugeSigma 1-15K	Sigma , Osterode am Harz
Transilluminator Alpha DigiDoc	Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA
Vortexgerät	neo lab, Heidelberg
Waage EW 6000-1M	Kern, Balingen
Wasserbad E100	Lauda, Lauda-Königshofen

Widefield-Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Wippe	neo lab, Heidelberg
ChemiDoc ECL Scanner	Bio-Rad, München
Gel Doc XR System	Bio-Rad, München
ELISA Reader Multiskan Spectrum	Thermo Scientific, Karlsruhe
Spannungsregler Power Pac HC	Bio-Rad, München
ADVANTAGE PV Loop system	Scisense, Ontario (Kanada)

Tabelle 2.1.11: Verwendete Software zur Auswertung und Analyse.

Programm	Firma	Anwendung
ImageLab	Bio-Rad	ECL Western Blots
Image J (Freeware)	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland	TUNEL Assay, Immunfluoreszenz
ImageStudio	Licor	Odyssey Western Blots
Labscribe 2.0	Iworx/scisense	Auswertung Druck-Volumen Kurven
Echo Vevo 2.0	Visualsonics	Auswertung Echokardiographie

2.1.6 Organismen und Tiere

2.1.6.1 Bakterienstämme

E. coli DH 5alpha

F- $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1*

E. coli Top10

F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ *nupG recA1 araD139* $\Delta(ara-leu)$ 7697 *galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1* λ^-

E. coli SURE2

endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171 F'[*proAB⁺ lacI^q lacZ* $\Delta M15$ Tn10 Amy Cm^R]

2.1.6.2 eukaryotische Zelllinien

HEK 293 STR Profil: Amelogenin: X
 CSF1PO: 11,12
 D13S317: 12,14
 D16S539: 9,13
 D5S818: 8,9
 D7S820: 11,12
 TH01: 7,9.3
 TPOX: 11
 vWA: 16,19

2.1.6.3 *Tierstämme*

***In vivo* Modell der Doxorubizin induzierten
Kardiotoxizität**

C57/Bl6Nj (Janvier Labs)

**Neonatale Ratten zur Isolierung
ventrikulärer Kardiomyozyten**

Wistar (Janvier Labs)

Es wurde der C57/Bl6Nj-Stamm gewählt, da dieser Stamm im Gegensatz zum J-Stamm keine Mutation im Nnt Gen trägt, von der vermutet wird, dass sie die Mäuse empfindlicher für oxidativen Stress macht [78].

Albino rat - a/a , B/B , Tyr^c/Tyr^c , h/h MHC: $RT1^{lv?}$ - Erythrocyte antigene: $RT2^a$, $RT8^b$ - Lymphocyte antigene: $RT6^b$, $RT7^a$

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 *Kultivierung und Stammhaltung von E. coli*

Für jegliche bakteriellen Arbeiten, wie Kulturen zur Plasmidpräparation, Transformation oder zur Herstellung von Glycerindauerkulturen, wurden zunächst 5 ml LB₀ mit entsprechendem Antibiotikum steril mit einer Einzelkolonie als ÜK angeimpft. Von häufig verwendeten Stämmen wurde eine ÜK auf einer LB₀-Platte zu Einzelkolonien ausgestrichen und von diesen angeimpft. Die Platte wurde 2-4 Wochen bei 4°C aufbewahrt und dann wieder neu ausgestrichen.

2.2.1.2 *Herstellung und Transformation chemisch kompetenter E.coli*

Aus der ÜK einer Einzelkolonie von E. coli SURE2 wurden 40 ml LB₀ 1:100 angeimpft und ca. 2 h bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von mind. 0,3 inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (4500 rpm, 10 min, 4°C; Megafuge, Rotor: F21-x50y) wurde das Pellet in 2 ml gekühltem TSS-Medium (Transformation and Storage Solution) resuspendiert. 200 µl Zellen wurden mit der DNA (1 µl bei reiner DNA, isoliert mit Hilfe des Qiagen QIAprep Spin Kits, bzw. der komplette Ligationsansatz bei Ligationen) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschliessend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s, nach dem die Zellen

sofort wieder auf Eis gekühlt wurden. Zur Erholung und Ausbildung der Resistenz wurden die Transformationsansätze in Schottröhrchen mit 2 ml LB₀ überführt und 50 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Für eine Transformation mit reiner Plasmid-DNA wurden 100 µl der Kultur auf LB₀ mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert, für die Transformation mit einem Ligationsansatz wurde das komplette Pellet ausplattiert. Die Platten wurden UN bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen wurde ein Ansatz mit 0,1 ng pUC18 transformiert und ein Ansatz ohne Zugabe der DNA der gleichen Prozedur unterzogen.

2.2.1.3 *Plasmidpräparation aus Bakterien*

Die Plasmidisolierung möglichst reiner DNA für Klonierungen und Transformationen erfolgte über das QIAprep Spin Miniprep Kit. nach den Anweisungen des dem Kit beiliegenden Handbuchs. Für längere Lagerung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C eingefroren, häufiger verwendete Plasmide wurden bei 4°C gelagert.

2.2.1.4 *Plasmidpräparation aus Bakterien-Großkulturen (QIAGEN Plasmid Giga Kit)*

Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Vorschriften Handbuchs für das QIAGEN Plasmid Giga Kit (5). Eine 15ml Vorkultur wurde aus einer 1:150 aus einer mit einer Einzelkolonie angeimpften ÜK inokuliert und für 6h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden aus dieser Vorkultur 6 L LB Medium (mit Antibiotikum) 1:500 angeimpft und ÜN bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterienkultur wurde das Pellet wie im Handbuch beschrieben behandelt, allerdings mit folgenden Abweichungen:

- Nach der Zugabe von Puffer 3 wurde das Lysat über ein Filterpapier filtriert und nicht wie im Handbuch beschrieben abzentrifugiert.

- Die Fällung des die DNA enthaltenden Eluats und die nachfolgenden Waschschriffe erfolgten in vier 50ml Reaktionsgefäßen.

- Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 45 Min (Megafuge) bei 4°C präzipitiert.

- Der EtOH-Waschschritt wurde mit 3000 rpm für 30 Min bei 4°C durchgeführt.

Die präzipitierte DNA wurde in 2ml sterilem H₂O resuspendiert und bei 4°C gelagert.

2.2.1.5 *Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren*

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Nanodrop 2000. Es wurden dafür 1µl DNA bzw. RNA unverdünnt auf die Messplattform aufgetragen und nach Herstellerangaben gemessen.

Bei Plasmid -GIGA-Präparationen für die Virusproduktion erfolgte eine Dreifachbestimmung. Dazu wurde die DNA erst auf RT erwärmt und dann 1µl zur Messung auf die Nanodrop Plattform aufgetragen.

2.2.1.6 *Isopropanolfällung*

Neben der Verwendung von Säulen zur Aufkonzentrierung oder Säuberung der DNA von Proteinen, kann die DNA auch mit Isopropanol gefällt werden. Der Ansatz wurde mit 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH6,2)versetzt und 30 min (RT) bis 1h (4°C) gefällt. Die DNA wurde pelletiert (10 min, 13 000 rpm, Tischkühlzentrifuge), jeweils 1x mit 1 Volumen 70% EtOH bzw. 100% EtOH gewaschen und dann in dem gewünschten Volumen H₂Omp resuspendiert.

2.2.1.7 *Restriktionsverdau von Plasmid-DNA*

Für Ligationen und um Plasmide mit dem korrekten insertierten Fragment zu identifizieren, wurde die DNA durch Restriktionsendonukleasen verdaut. In der Regel erfolgte der Verdau in einem Volumen von 10 µl. Die DNA (100-200 ng) wurde mit 1/10 Volumen 10x Puffer für das entsprechende Enzym, 0,5 µl (5-25 Units) Enzym und gegebenenfalls 1/10 Volumen BSA (10 fach-konzentriert) gemischt und mit H₂Omp auf das Endvolumen gebracht. Für Testverdaus zur Identifizierung richtiger Klone wurden die Ansätze 1 h bei der vom Enzymhersteller angegebenen Temperatur im Wasserbad inkubiert, Die Analyse der Testverdaus erfolgte über Agarosegelelektrophorese.

Um kompatible Enden für Ligationen zu generieren wurden Vektor und Insert für 3 h mit den Restriktionsnukleasen inkubiert. Sollte mit zwei verschiedenen, nicht kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten werden, wurde zunächst der Verdau mit einem Enzym wie beschrieben durchgeführt, anschliessend die DNA über eine Isopropanolfällung von Enzym und Puffer gereinigt und dann mit dem zweiten Enzym verdaut. Die verdaute DNA für Ligationen wurde über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten Fragmente mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert.

2.2.1.8 *Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren*

Für Standardanwendungen wie Restriktionsverdau und die Auftrennung von Fragmenten größer als 500 bp wurde ein 0,8%iges Agarosegel in TAE verwendet. Die Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben in 80ml TAE durch Erwärmen vollständig gelöst. Nach kurzem

Abkühlen wurden 1,5µl einer 1% Ethidiumbromidlösung unter dem Abzug hinzu pipettiert und durch schwenken des Kolbens verteilt. Die Agaroselösung wurde unter Vermeidung von Luftblasen in einen mit Klebeband abgeklebten Elektrophoreseschlitten ca 1cm hoch gegossen und mit eingestecktem Kamm fest werden gelassen. Nach Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese bei 80V für ca, 1h (20cm Elektrodenabstand).

Als Längenstandard wurde die "100bp extended ladder" verwendet. Für die Auftrennung kleiner Fragmente unter 500 bp wurde ein 2%iges Agarosegel und die GeneRuler Ultra Low "Range DNA Ladder" verwendet.

2.2.1.9 *Behandlung mit alkalischer Phosphatase (AP)*

Die Entfernung der 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase erfolgte, um bei Plasmiden, bei denen die mit dem Insert kompatiblen Enden nur mit einem Enzym generiert wurden, die Wahrscheinlichkeit einer Rezirkularisierung zu verringern. Nach Durchführung des Restriktionsverdau wurde die Plasmid-DNA über eine Isopropanolfällung gereinigt und mit 18 µl H₂O (nukleasefrei) eluiert. Zu diesem Volumen wurden 2 µl 10x AP-Puffer und 1 µl (20 U) alkalische Phosphatase gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, über ein 0,8%iges Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und für die Ligation eingesetzt.

2.2.1.10 *Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben

2.2.1.11 *Ligation doppelsträngiger DNA-Fragmente*

Das Vektorplasmid wurde mit Restriktionsenzymen so geschnitten, dass zu dem Insert korrespondierende Enden entstanden (glatte bzw. überstehende Enden) und gegebenenfalls mit AP behandelt. Nach der Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese wurden die Fragmente mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert. Die relative DNA Menge wurde durch Vergleich der Bandeintensität im Agarosegel abgeschätzt und von den gereinigten Fragmenten so viel eingesetzt, dass für Klonierungen mit glatten Enden ein Verhältnis Vektor zu Insert von ca. 1:5 erreicht wurde, für Klonierungen mit überstehenden Enden ein Verhältnis Vektor zu Insert von ca. 1:3. Die Ligationsreaktion wurden in einem möglichst kleinen Volumen (5-10µl) mit 1/10 Volumen 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U) durchgeführt. Die Ligation erfolgte für ca. 20 h bei 16°C. Bei jeder Ligation wurde eine Kontrollansatz mitgeführt, der nur den Vektor ohne Insert enthielt.

2.2.1.12 *Wiederherstellung des pUF-CMV-MLC800-HSPA5*

Da im Plasmid pUF-CMV-MLC800-HSPA5 eine der invertierten terminalen Wiederholungen der Virussequenz durch Rekombination verloren gegangen war, musste das Plasmid mit Hilfe des pUF-CMV-MLC800-Luc neu kloniert werden. Dafür wurde mit 1,5µg beider Plasmide ein Restriktionsverdau mit XbaI in einem Gesamtvolumen von 20µl durchgeführt. Nach einer Isopropanolfällung für 40 Min auf Eis (vgl. Kapitel 2.2.1.6) erfolgte eine AP Behandlung des Vektorrückgrades (vgl. Kapitel 2.2.1.9). Die Fragmente wurden über ein 0,8%iges Agarosegel aufgetrennt und das GRP78 Fragment des Hspa5-Plasmids und das Vektor-Rückgrad des Luciferase-Plasmids auf dem Transilluminator ausgeschnitten. Die Ligation erfolgte ÜN bei 16°C. Um korrekte Klone zu identifizieren erfolgten zunächst Restriktionsverdau mit BglII (Fragmente 3,1 kb; 2,9 kb; 899 bp) bzw. NdeI (Fragmente 5,9 kb; 1,0 kb). Die Intaktheit der invertierten terminalen Wiederholungen erfolgte durch Testrestriktion mit SmaI (Fragmente 3,0kb; 2,3 kb; 1,6 kb).

2.2.1.13 *RNA-Isolierung aus Zellen (NRVCM)*

Die Zellen wurden in 1 ml kaltem Trizol geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. Nach dem Auftauen wurden 200µl eiskaltes Chloroform zu der Zellsuspension gegeben und die Proben durch kräftiges Schütteln homogenisiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 14000 rpm, 15 Min, 4°C (Eppendorf Tischkühlzentrifuge). Zweimal 200µl der oberen, wässrigen Phase wurden in ein steriles, RNase freies Gefäß transferiert, ohne dabei die weiße Proteinphase aufzuwirbeln.

Nach der Zugabe von 400µl eiskaltem Isopropanol und 1,5µl Polyacryl-Carrier wurden die Gefäße zum Mischen 2-3 mal invertiert, dann wurde die RNA zur Präzipitation ÜN bei -20°C inkubiert.

Die gefällte RNA wurde bei 14000 rpm, 15 Min 4°C pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Pellet zweimal mit 1ml 75% eiskaltem Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation für die Waschschrirte erfolgte ebenfalls bei 14000 rpm, 15 Min 4°C. Dann wurde das Ethanol möglichst vollständig entfernt und die Gefäße zum Trocknen der RNA 10-15 Min bei RT stehen gelassen. Das trockene Pellet wurde in 20µl DEPC-H₂O resuspendiert und die RNA Konzentration im Nanodrop bestimmt. Die RNA wurde für kurze Zeiträume bei -20°C gelagert, für längere Lagerungszeiträume bei -80°C.

2.2.1.14 *RNA-Isolierung aus Gewebe*

Für die RNA Isolierung aus Gewebe wurden 4 sterile Kermamikkugeln und 1 ml Trizol in ein stabiles Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel vorgelegt und dann das Gewebe auf Eis hinzugegeben. Der Aufschluß erfolgte mit der Kugelmühle bei 5500 rpm für 20 Sekunden. Notfalls wurde nach kurzer Inkubation auf Eis der Aufschluß wiederholt.

Das in Trizol homogenisierte Gewebe wurde 5 Min auf Eis inkubiert, damit die Nukleoproteinkomplexe dissoziieren können und dann in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. 200µl eiskaltes Chloroform wurden zu der Zellsuspension gegeben und die Proben durch kräftiges Schütteln homogenisiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 14000 rpm, 15 Min, 4°C (Eppendorf Tischkühlzentrifuge). Zweimal 200µl der oberen, wässrigen Phase wurden in ein steriles, RNase freies Gefäß transferiert, ohne dabei die weiße Proteinphase aufzuwirbeln. Nach der Zugabe von 500µl eiskaltem Isopropanol wurden die Gefäße zum Mischen 2-3 mal invertiert, dann wurde die RNA zur Präzipitation ÜN bei -20°C inkubiert. Die gefällte RNA wurde bei 14000 rpm, 15 Min 4°C pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Pellet zweimal mit 900µl 75% eiskaltem Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation für die Waschschrirte erfolgte ebenfalls bei 14000 rpm, 15 Min 4°C. Dann wurde das Ethanol möglichst vollständig entfernt und die Gefäße zum Trocknen der RNA 10-15 Min bei RT stehen gelassen. Das trockene Pellet wurde in 20µl DEPC-H₂O resuspendiert und die RNA Konzentration im Nanodrop bestimmt. Die RNA wurde für kurze Zeiträume bei -20°C gelagert, für längere Lagerungszeiträume bei -80°C.

2.2.1.15 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von RNA zu cDNA erfolgte mit dem „iScript cDNA Synthesis Kit“ von Bio-Rad nach Anleitung in einem RNase-freien PCR Gefäß. Pro Transkriptionsansatz wurden folgende Mengen und Volumina verwendet:

5x iScript Reaction Mix	4µl
iScript Reverse Transkriptase	1µl
Nukleasefreies Wasser	Add 20µl
1µg Gesamt RNA	X µl
samtvolumen	20µl

Die Transkription erfolgte im PCR Cyclyer mit folgenden Zyklen:

5 Min	bei 25°C
30 Min	bei 42°C
5 Min	bei 85°C
„Hold“	bei 4°C

Die cDNA wurde daraufhin 1:100 in DEPC-H₂O verdünnt und bei -20°C gelagert. Die unverdünnte cDNA wurde ebenfalls bei -20°C gelagert.

2.2.1.16 *quantitative Realtime-PCR*

Die relative Quantifizierung spezifischer mRNAs erfolgte durch quantitative Realtime PCR mit dem SYBR Green Reaction Mix (Bio-Rad) in 96 well-Platten. Zunächst wurden alle mRNAs durch eine PCR mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (s. 2.2.1.15). Für die quantitative Realtime PCR wurden 6,5µl der 1:100 verdünnten cDNA eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden wie folgt angesetzt (Angabe pro well):

7,5µl Sybr Green

0,5µl Primer vorwärts (3µM)

0,5µl Primer rückwärts (3µM)

6,5µl cDNA (1:100)

Dabei wurde für jedes Primerpaar ein Mastermix aus SybrGreen und Primerlösung für alle zu untersuchenden Proben hergestellt. 8,5µl des Mastermixes wurden unter Anwendung des Verfahrens des reversen Pippettierens in die wells gegeben. Dann wurde die cDNA an den Rand der wells pipettiert. Die Platte wurde kurz zentrifugiert, um den Mastermix mit der cDNA zu mischen. Die Realtime PCR erfolgte dann mit folgenden Bedingungen:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95°C	3 Min	
2	95°C	10s	} 40x
	Annealingtemperatur	45s	
	72°C	30s	
3	95°C	1Min	
4	55°C	1Min	
5	Schmelzkurve ab 55°C	10s	80 Schritte
6	4°C	Hold	

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 *Proteinaufreinigung aus Zellen*

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und 30 min auf Eis inkubiert, damit der RIPA Puffer die Zellmembran aufbrechen kann. Dann wurden die Proben für 15 Min bei 14000 rpm und 4°C (Tischkühlzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und die Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt.

Danach wurden die Proben mit RIPA Puffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration (maximal 5µg/µl) gebracht und in 55µl Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 *Proteinaufreinigung aus Gewebe*

Ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel wurde mit 4 Keramikugeln und 400µl RIPA Puffer versetzt und auf Eis gelagert. Maximal 20mg Gewebe wurden hinzugegeben und zügig in einer Kugelmühle bei 6000 rpm für 30 sek aufgeschlossen. Nach 5 Min Inkubation auf Eis erfolgte ein zweiter Aufschluss ebenfalls mit 6000 rpm für 30 sek.

Das Homogenat wurde 30 Min auf Eis inkubiert, damit der RIPA Puffer die Zellmembran aufschliessen kann. Dann wurden die Proben für 15 Min bei 14000 rpm und 4°C (Tischkühlzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und die Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt.

Danach wurden die Proben mit RIPA Puffer auf 5µg/µl verdünnt und in 55µl Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.2.3 *Konzentrationsbestimmung von Proteinen*

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem DC Protein Assay Kit von Bio-Rad. Die zu bestimmenden Proben wurden in einem 5ml Polypropylenröhrchen 1:10 (Zellkulturproben) bzw. 1:20 (Gewebeproben) mit RIPA Puffer verdünnt, so dass das Endvolumen 50µl betrug. Es wurden pro Probe 250µl Puffer A und 5µl Puffer C vorgemischt und dann je 255µl der Lösung zu den Proben gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation wurden die Messlösung in Photometerküvetten transferiert und es erfolgte die Messung der Absorption mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 750nm. Für die Nullwertbestimmung des Photometers wurde eine Probe mit 50µl RIPA Puffer mitgeführt.

Die Proteinkonzentration ergibt sich aus einer vorher bestimmten Kalibrierungsgeraden mit einer BSA Standardreihe 0 bis 1,2 mg/ml in RIPA Puffer wie folgt:

Proteinkonzentration $n = (A_{270\text{nm}}/m) \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$

m = Steigung der Kalibriergeraden

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden Gele mit einem kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradienten von 0,4% bis 20% verwendet (Lifetechnologies).

20-24µl der verdünnten Proteinlösung wurden mit 5-6 µl 5xSDS-Ladepuffer versetzt, mit dem Vortex gemischt und 5 Min bei 85°C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurden die Proben kurz zentrifugiert um das gesamte Volumen am Gefäßboden zu sammeln. Die Geltaschen wurden kurz mit Hilfe einer lang ausgezogenen Pipettenspitze mit Kathodenpuffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Dann wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Pro Geltasche wurden - wenn möglich - 100ng Gesamtprotein geladen, maximal jedoch 30µl der verdünnten und mit Ladepuffer versetzten Proteinlösung. Als Proteingrößenstandard wurden 5µl des SeeBlue Prestained Protein Markers in eine zusätzliche Geltasche pipettiert.

Die Separation der Proteine erfolgte bei konstant 100V für 2h auf Eis. Für die Detektion sehr kleiner Proteine wie Phospholamban wurde die Elektrophorese schon nach 1 Stunde abgebrochen

2.2.2.5 Western Blot

Die Nitrocellulosemembran wurde 1 Min in reinem Methanol vorinkubiert und dann in Semidry-Blotpuffer übertragen. SDS-Gel und 2 Lagen dickes auf Gelgröße zugeschnittenes Whatmanpapier wurden ebenfalls 5 Min in Semidry-Blotpuffer inkubiert. Dann wurde der Blot in folgender Reihenfolge aufgebaut. Anode-Whatmanpapier- Nitrocellulosemembran- Gel-Whatmanpapier-Kathode

Eventuell entstandene Luftblasen wurden mit Hilfe einer abgesägten serologischen Pipette aus dem Aufbau herausgerollt. Der Proteintransfer erfolgte dann im Semidry-Blotter (Bio-Rad) bei 15V für 53 Minuten. Nach dem Auseinanderbauen des Blots wurde die Membran in i-Block für mind 1h bei RT inkubiert, bevor die Inkubation mit dem Primär-Antikörper ÜN bei 4°C ebenfalls in i Block erfolgte. Am nächsten Tag wurde der Blot 3x 10 Min mit PBS-T auf dem Schüttler gewaschen und dann für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper in i-Block inkubiert. Nach 3 maligen Waschen für 10 Min mit PBS-T auf dem Schüttler wurde das Signal detektiert. Bei fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper erfolgte die Detektion direkt mit dem Licor Odyssey. Bei "Horse Radish Peroxidase" (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern wurde die Chemilumineszenz durch Inkubation der Membran in 2ml einer Detektionslösung gestartet. Hierfür wurde das Signalfire(TM) ECL Detection Kit verwendet.

2.2.3 Zellkultur - Methoden

2.2.3.1 *Kultivierung eukaryotischer Zellen (HEK293)*

Die Stammkultur der HEK 293 Zellen erfolgte in T175 Zellkulturflaschen mit Filter. Ca. ??? Mio Zellen wurden pro Flasche in 21 ml DMEM (10%FCS, 1%P/S) ausgesät. Alle 4 Tage, wenn eine Konfluenz von ca. 60% erreicht war, wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde einmal mit 5ml warmen PBS gewaschen und danach die Zellen mit 3ml vorgewärmten Trypsin-EDTA für 4Min behandelt. Die Trypsinierungsreaktion wurde mit 7ml DMEM (10%FCS, 1%P/S) gestoppt und die Zellen resuspendiert. Die Zellkonzentration einer 1:10 Verdünnung in DMEM (10%FCS, 1%P/S) wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Aus der Zellsuspension wurden die HEK293 Zellen neu in T175 Zellkulturflaschen ausgesät oder sie wurden für die Virusproduktion in einen 10 Etagen Cellstack ausgesät.

2.2.3.2 *Isolierung und Kultivierung primärer neonataler Ratten-Kardiomyozyten (NRVCM)*

Die NRVCM wurden aus den Herzen von 1-3 Tage alten neonatalen WISTAR-Ratten isoliert. Die Angaben beziehen sich auf 3-4 Würfe mit einer Anzahl von ca. 40 neonatalen Ratten. Die neonatalen Ratten wurden durch Dekapitation getötet und das Herz sofort entnommen und möglichst noch schlagend in einer Schale mit 30 ml HBSS +20% P/S auf Eis gesammelt. Die Gefäße an der Herzbasis und die Herzohren wurden entfernt und die Herzen in 3ml HBSS +20% P/S überführt. Dann wurden sie mit einer Schere in 1-2 mm große Stücke zerkleinert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 5ml Verdaulösung wurde der Überstand abgenommen und die Herzen einmal mit 9 ml Verdaulösung gewaschen. Dann wurde der erste Verdau durch Zugabe von 10ml Verdaulösung gestartet. Nach 10 Min auf dem Schüttler bei RT wurde der Verdau durch Zugabe von 10 ml Stopplösung angehalten und die Suspension 30 mal mit einer 25 ml serologischen Pipette hoch und herunter pipettiert. Der die Zellen enthaltende Überstand wurde abgenommen, zu einem 50ml Reaktionsgefäß mit 2,5ml FCS gegeben und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert. Insgesamt wurden 9 Verdauschritte durchgeführt, wobei der 9. Verdau mit dem Restvolmen der Lösungen durchgeführt wurde.

Die Überstände aus den einzelnen Verdaus wurden bei 600 rpm für 15 Min bei 4°C abzentrifugiert (Multifuge) und die Zellpellets nach Resuspension in je 2-3ml warmem Medium 199 +10%FCS vereint. Es wurden 2ml DNaseI (10mg/ml) zur Zellsuspension gegeben und mit HBSS +20% P/S auf 50ml aufgefüllt. Nachdem die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren der Zellsuspension mit einer 25ml serologischen Pipette vereinzelt wurden, wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb gefiltert. Dann wurden die Zellen bei 100 rpm für 5 Min pelletiert und in 12 ml kalten 1x APS Puffer gut resuspendiert. Während der Zentrifugationsschritte wurde der Percollgradient zur Auftrennung von Fibroblasten und Kardiomyozaten vorbereitet. 4ml TOP-Lösung (rot) wurden pro Gradient in 15ml

Reaktionsgefäße vorgelegt. Dann wurde 3ml BOTTOM-Lösung (farblos) unterschichtet. Die Gradienten (6 Gradienten bei ca. 40 Tieren). wurden mit je 2ml Zellsuspension beladen und bei 2400 rpm, 4°C für 30 Min mit ausgeschalteten Bremsen zentrifugiert (Multifuge, Swingbuckets). Nach der Zentrifugation befinden sich die Kardiomyozyten in der Interphase zwischen TOP und BOTTOM-Lösung. Der Überstand über dieser Phase, der auch die Fibroblasten enthält, wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Dann wurde die Kardiomyozytenfraktion bis ca. 1 cm über dem Gefäßboden abgenommen und auf zwei 50ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Gefäße wurden bis 50ml mit kaltem 1x ADS Puffer aufgefüllt und bei 1000 rpm für 5 Min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden vereint und noch einmal mit 50ml 1x ADS gewaschen. Die Kardiomyozyten wurden in 30 ml warmem Medium 199 +10%FCS aufgenommen ein Aliquot 1:1 mit Trypanblau zur Anfärbung toter Zellen gemischt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

Folgende Zellzahlen wurden je nach Auswertungsmethode und Versuchsformat ausgesät

6-well Platte	Proteine	2 Mio	Doppelbestimmung (Virus Einfachbest)
6-well Platte	RNA	1 Mio	Doppelbestimmung
12-well Platte	TUNEL	0,6 Mio	Doppelbestimmung
12-well Platte	ROS Glo Assay	0,8 Mio	Doppelbestimmung

Zwei Tage nach der Aussaat wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und auf Medium 199 + 0,5% FCS gesetzt. Spätestens alle 2 Tage und vor jeder Behandlung wurde das Medium gewechselt.

2.2.3.3 *Behandlung von NRVCM mit Doxorubizin*

Die Behandlung der NRVCM erfolgte frühestens 24h Stunden nach dem Wechsel auf Medium 199 (0,5% FCS). Um die Bedingungen zwischen den Versuchen möglichst gleich zu belassen wurden die Zellen erst an Tag 5 nach dem Ausplattieren mit Doxorubizin behandelt.

Zunächst wurde frisches, vorgewärmtes Medium 199 (0,5% FCS) zu den Zellen gegeben (siehe Tabelle). Das aliquotierte und bei -20°C eingefrorene Doxorubizin wurde auf Eis und lichtgeschützt aufgetaut. Dann wurde es in Medium 199 (0,5% FCS) vorverdünnt. Von der Vorverdünnung wurden 50 bzw. 100µl zu den Zellen gegeben um eine Endkonzentration von 1µM zu erreichen.

Für die Dosiskurven wurde die Vorverdünnung so weiterverdünnt, dass zu allen Versuchsansätzen das gleiche Volumen der jeweiligen Vorverdünnung gegeben werden musste. Die verschiedenen Volumina sind in Tabelle 2.2.1 angegeben.

Tabelle 2.2.1: Behandlung von NRVCM mit Doxorubizin. Volumina der verwendeten Medien sowie Herstellung und eingesetztes Volumen der Vorverdünnung.

Platte ngröß e	Volumen Medium	Medium Vorverdün nung/well	Doxorubizin/ weiß	Molarität in Vorverdün nung	Molarität t im Versuch	Volumen der Vorverdün nung in Versuch
6-well	1100µl	100µl	1,2µl	12µM	1µM	100µl
6-well	1100µl	50µl	50µ von 1µM	6µM	0,5µM	100µl
12-well	450µl	50	0,5µl	10µM	1µM	50µl
24-well	270µl	30	0,3µl	10µM	1µM	30µl

Die Zellen wurden für die angegebene Zeit mit Doxorubizin bei 37°C im Inkubator bei 5.0% CO₂ inkubiert

Zur Ernte wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 50µl kaltem RIPA Puffer/2 Mio Zellen mit einem Zellschaber auf Eis geerntet. Sofort nach der Ernte wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufreinigung bei -80°C gelagert.

2.2.3.4 *Behandlung von NRVCM mit siRNA*

Die Zellen wurden zweimal mit siRNA transfiziert. Einmal mit dem Wechsel auf Medium 199 0,5%FCS und noch einmal 48h nach dem Wechsel. Pro Transfektionsansatz wurden als Mastermix zusammengemischt:

Reagenz	Volumen
siRNA (mM)	0,64 µl
HiPerfect	6µl
Medium 199 0,5% FCS	93,4 µl

Der Mix wurde mit dem Vortex gemischt und 5 Min bei RT inkubiert. Dann wurden 100µl auf die mit 1,1 ml Medium 199 (0,5% FCS) bedeckten Zellen gegeben.

2.2.3.5 *Transfektion von NRVCM mit Adeno-assoziierten Viren*

Die Transfektion der NRVCM erfolgte 3 Tage nach dem Aussäen und 24h Stunden nach dem Wechsel auf Medium 199 0,5%FCS in 1,1 ml Medium 199 0,5%FCS. Das Virus (Serotyp 6) wurde direkt ins Medium gegeben und durch schwenken verteilt. Es wurden MOIs von 2,5 *10³ bis 15 *10⁴ eingesetzt. Erst 48h nach Transfektion erfolgte der nächste Medienwechsel bzw. die Behandlung mit Doxorubizin oder anderen Substanzen.

Zur Ernte wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und in 50µl kaltem RIPA Puffer/2 Mio Zellen mit einem Zellschaber auf Eis geerntet. Sofort nach der Ernte wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufreinigung bei -80°C gelagert.

2.2.3.6 ToxiLight Assay

Zur Bestimmung des Zelltodes wurde das ToxiLight™ Non-destructive Cytotoxicity BioAssay Kit von Lonza verwendet. Im Assay wird der beim Zelltod auftretende Austritt des Enzyms Adenylatkinase durch die Zellmembran in das Kulturmedium als Maß für den Zelltod herangezogen. Der ToxiLight Assay unterscheidet nicht zwischen Apoptose und Nekrose. Zum Untersuchungszeitpunkt wurden 100µl des Zellüberstands entnommen und sofort in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Herstellung des ToxiLight Reagenz erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde maximal einmal aufgetaut und danach verworfen.

Für den Assay wurden die Proben auf Eis wieder aufgetaut und mit einer Multidispense-Pipette 5µl in Triplets in eine auf Eis gelagerte 384-well Platte transferiert. Die Platte wurde kurz anzentrifugiert, um das Volumen an Boden zu sammeln. Dann wurden auf RT 25µl ToxiLight Reagenz hinzugegeben, wiederum kurz abzentrifugiert und die Platte dann 5 Min bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor die Messung im Luminometer erfolgte. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Triplets herangezogen.

2.2.3.7 TUNEL Assay (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red)

Mit dem TUNEL Assay lassen sich spezifisch die für Apoptose charakteristischen Strangbrüche sichtbar machen lassen. Es wurden 600 000 Neonatale Rattenkardiomyozyten in eine 12-well Platte mit eingelegten Glasplättchen unter Zugabe von 1:200 (V/V) Laminin ausgesät. Um den Hintergrund im Assay zu minimieren, wurde bei jedem Medienwechsel mit PBS gewaschen, so dass tote Zellen sorgfältig entfernt wurden.

Am Versuchsende wurden die Zellen 4 mal mit auf 37°C vorgewärmten PBS gespült und 1h mit 4%PFA-Lösung bei RT fixiert. Nach 3 maligem Waschen mit PBS wurde mit TUNEL Permeabilisierungslösung für 1 Min permeabilisiert. Nach weiteren 3 kurzen Waschrissen mit PBS wurde eine unbehandelte Probe als Positivkontrolle für 10 Min auf Eis mit DNaseI nach Herstellerangaben behandelt. Danach wurden alle Proben in einer mit feuchtem Whatman Papier und Parafilm ausgelegten dunklen Kammer mit frisch angesetztem TUNEL Reaktions-Reagenz (nach Herstellerangaben) für 1h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Das Detektions-Reagenz wurde durch 3 maliges Waschen mit PBS für 10 Min auf dem Schüttler im Dunkeln entfernt und die Glasplättchen mit Vecta Shield Mounting Medium (mit Dapi) auf Objektträgern aufgebracht. Nach dem Trocknen des Mediums erfolgte die Analyse am Fluoreszenzmikroskop. 8 Bilder wurden in gleichbleibendem Muster bei 100facher Vergrößerung mit FITC und DAPI Filter aufgenommen und die TUNEL positiven Zellkerne (rot) und die Gesamtzellkernzahl (blau) mit ImageJ ausgezählt.

Protokoll zum Zählen TUNEL und DAPI positiver Nuklei mit ImageJ :

- Bild mit ImageJ öffnen
- Image -> Color -> split channels
- Kanal auswählen (blau bzw. Rot)
- Process -> subtract background (Voreinstellung beibehalten)
- Image -> adjust -> threshold
- Process -> binary --> make binary
- Process-> binary -> convert to mask
- Process -> binary -> fill holes
- Process -> binary -> watershed
- Analyse -> analyze particles -> $n^2 = 30$ -infinity
- zum Visualisieren der gezählten Objekte: Pull down menu -> outlines

2.2.3.8 *Nachweis und Quantifizierung der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS)*

Der Nachweis von ROS erfolgte mit Hilfe des ROS-Glo-Assays von Promega aus dem Überstand über den Zellen. Für den Assay wurden 400 000 Zellen in einer 24-well Platte ausplattiert und wie in Kapitel 2.2.3.3 und Kapitel 2.2.3.5 beschrieben behandelt. Die Doxorubizinbehandlungen erfolgten in 300µl Medium und so, dass alle Proben zum Gleichen Zeitpunkt mit dem Assay behandelt werden konnten. Dabei wurde das Medium in allen Proben gleich lang mit den Zellen inkubiert. 6h vor Ende des Versuches erfolgte die Zugabe von 30µl H2O2 Substrat (Substrat: Diluent = 1:40). Ab diesem Zeitpunkt wurde n die Angaben des Protokolls für 50µl des Überstandes befolgt. Um die gebildete ROS Menge auf die Zellzahl zu normieren wurde die relative Zellzahl mittels des Sulfrhodamin-Assays bestimmt.

2.2.3.9 *Sulforhodamin B Färbung zur Bestimmung der relativen Zellzahl*

Die Zellen wurden 4 mal mit PBS gewaschen, mit ca. 300µl Fixierungspuffer versetzt und über Nacht oder übers Wochenende bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurde 2 mal mit Wasser gewaschen, das Wasser sorgfältig entfernt und die Zellen mit 100µl SRB Lösung für 30 Min unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Nach entfernen der SRB Lösung wurden die Zellen 4 mal mit Waschpuffer gewaschen (beim ersten mal komplett auffüllen, dann mit 200µl Waschpuffer). Für die Quantifizierung wurde dann das Sulforhodamin durch Zugabe von 300µl Elutionspuffer und Inkubation für 10 Min unter Schütteln im Dunkeln von den Zellen gelöst. Die Messung mit 100µl des Überstandes erfolgte bei einer Absorbtion von 565 nm.

2.2.3.10 Immunfluoreszenz basierter Nachweis von DNA Schädigungen

500000 Zellen wurden in einer 12-well Platte mit Glasplättchen ausgesät. Nach Behandlung mit Doxorubizin (siehe Kapitel 2.2.3.3) wurden die Zellen 5 mal mit PBS gewaschen und dann für 1h mit 500µl 4% PFA Lösung fixiert. Nach weiterem 3 maligen Waschen mit PBS wurden für 10 Min mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden noch 2 mal mit PBS gewaschen, für 1h mit I-Block Lösung geblockt und dann in einer feuchten Kammer mit dem phospho-Histon H2A.X Antikörper (1:400 in I-Block-Lösung) ÜN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Glasplättchen 3x 10 Min mit PBS auf dem Schüttler gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:200 in I-Block) erfolgte für 3h bei 4°C in einer feuchten, dunklen Kammer. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3 x 10 Min mit PBS auf dem Schüttler gewaschen (vor Licht schützen) und dann mit dem Vectashield Hard Set Mounting Medium auf Objektträger aufgebracht. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse erfolgte die Lagerung bei 4°C im Dunkeln.

2.2.4 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Adeno-assoziiertes Viren

2.2.4.1 Transfektion von HEK 293 Zellen zur Produktion Adeno-assoziiertes Viren

Die HEK Zellen wurden in DMEM (10%FCS, 1% P/S) bis zum Erreichen von ca. 60% Konfluenz (ca. 4 Tage) in T175 Zellkulturflaschen wachsen gelassen. Dann wurden sie einmal mit warmen PBS gewaschen und mit 3ml Trypsin-EDTA ca. 4 Min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 7ml DMEM (10%FCS, 1% P/S) abgestoppt und die Zellen durch Resuspension mit einer serologischen Pipetten geerntet. 10µl einer 1:10 Verdünnung wurden in der Neubauer Zählkammer gezählt. 250 Millionen Zellen wurden gleichmäßig auf 2x 500ml warmes DMEM (10%FCS, 1% P/S) aufgeteilt. Mit jeweils 23 ml dieser Zellsuspension wurden 2 T175 Zellkulturflaschen als positiv und negativ Kontrolle eingesät. Der Rest wurden in einen Cellstack mit 10 Ebenen ausgesät. Nach 24h Inkubation bei 37°C 5%CO₂ erfolgte die Transfektion mit dem rekombinanten Virusplasmid und dem Helferplasmid.

Dazu wurde folgender Ansatz unter Beachtung der Reihenfolge hergestellt:

1 H ₂ O	19ml
2 NaCl (300mM)	69ml
3 Helferplasmid	1525 µg
4 Rekombinantes PLasmid	392 µg
5 PEI	15,5ml

Der Transformationsansatz wurde geschüttelt und 10 Min bei RT inkubiert. Die Positivkontrollflasche wurde mit 4ml des Transfektionsansatzes versetzt. Der Rest wurden in das Medium im Zellstack gegeben und durch 7maliges Wenden des Zellstacks verteilt. 3 Tage später erfolgte die Virusernte.

2.2.4.2 *Isolierung und Aufreinigung rekombinanter AAV*

Die zur Produktion der AAV transfizierten HEK293-Zellen wurden inklusive der Positivkontrollflasche 3 Tage nach der Transfektion geerntet. Der Überstand im Zellstack wurde in einem 2L Becherglas gesammelt. Dann wurde der Zellstack einmal mit 150ml warmen PBS gewaschen und mit 100ml 0,25% Trypsin EDTA für 5 Min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen am Zellstack abgelöst, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1L des Zellkulturüberstandes abgestoppt und die Zellen durch schütteln von der Oberfläche des Zellstacks abgelöst. Die Zellsuspension wurde auf drei konische Zentrifugationsgefäße verteilt und der Zellstack noch einmal mit dem Rest des Überstandes gespült, der daraufhin auch auf die Gefäße verteilt wurde. Durch Zentrifugation bei 3400rpm, für 10 Min bei 4°C (Multifuge) wurden die noch vitalen Zellen am Boden der Gefäße gesammelt. Die Pellets wurden in insgesamt 30ml PBS resuspendiert und in ein 50ml Gefäß transferiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt bei 3400rpm, für 10 Min bei 4°C (Multifuge) wurde das Pellet in 5ml Lysepuffer resuspendiert. Um hohe Virustiter zu erhalten wurden die Pellets von zwei Zellstacks gepoolt, bei -20°C gelagert und dann zusammen aufgereingt.

Der Zellstack wurde mit 250 ml PBS gut gespült und noch zweimal zur Produktion verwendet.

2.2.4.3 *Aufreinigung und Virustiterbestimmung rekombinanter Adenoassoziierter Viren*

Die Aufreinigung und Titerbestimmung erfolgte durch die AG Müller, Abteilung Kardiologie, des Uniklinikums Heidelberg. Kurz beschrieben wurden die den Virus enthaltenden HEK-Zellen durch mehrere Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen. Dann wurden die verpackten Virusgenome durch Ultrazentrifugation in einem Iodixanoldichtegradienten von Zelltrümmern und leeren Viruspartikeln abgetrennt.

Für die Virustiterbestimmung wurde freie DNA durch Benzonase verdaut, die verpackte DNA extrahiert und über quantitative Realtime-PCR die Anzahl der Virusgenome pro ml Virusstock bestimmt.

2.2.5 Mausmodell der Doxorubizin induzierten Kardiotoxizität

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (Tierversuchsantrag G178/09, Regierungspräsidium Karlsruhe). Die Haltung der Tiere erfolgte in der Interfakultären Biomedizinischen Fakultät Heidelberg in Barrierehaltung und einem Tag/Nacht Rhythmus von 12h. Futter und Wasser wurde ad libitum gegeben.

Als Tiermodell der chronischen Doxorubizintoxizität wurden 7 Wochen alte männliche C57/Bl6JN Mäuse verwendet. Für den Etablierungsversuch wurden die Tiere über 2 Wochen je einmal mit 10 mg/kg Doxorubizin (2mg/ml Stammlösung, Klinikapotheke Universitätsklinikum Heidelberg) i.p. injiziert. Für die GRP78 Überexpression erfolgte die Virusbehandlung 3 Wochen vor der ersten Doxorubizininjektion mit $3 \cdot 10^{12}$ Virusgenomen durch Injektion in die Schwanzvene. 1 Tag vor der ersten Doxorubizinbehandlung wurde die Ejektionsfraktion in allen Gruppen über Echokardiographie bestimmt. Dann wurden die Tieren 3 Wochen mit 10 bzw. 5mg/kg Doxoribizin pro Woche i.p. injiziert. Diese Abänderung sollte die akute Toxizität verringern. Alle Kontrollgruppen wurden mit dem entsprechenden Volumen steriler 0.9% NaCl-Lösung injiziert.

2-3 Wochen nach der letzten Doxorubizininjektion wurde der Versuch beendet. Das Versuchsende wurde dynamische gestaltet, da die Tiere in jedem unterschiedlich auf das Doxorubizin reagierten. Deshalb wurde als Abbruchkriterium der Verlust von 40% der Doxorubizin behandelten Tiere festgelegt. Einen Tag vor dem Versuchsende wurden die Ejektionsfraktion über Echokardiographie bestimmt. Am nächsten Tag erfolgte die intraventrikuläre Druck-Volumen-Messung mit dem Advantage PV-Loop-System (Scisense) und die Tötung durch Entnahme des Herzens in Narkose.

2.2.5.1 *Echokardiographie*

Die Echokardiographische Erfassung der Ejektionsfraktion und der Wanddicke erfolgte im Wachzustand der Tiere um kardiodepressive Effekte des Narkosemittels zu umgehen. Die Tiere wurden 2mal an den Schallkopf gewöhnt. Dann wurde einmal in der parasternalen langen Achse (B-Mode) aufgezeichnet, so dass der Aortenbogen und die Aortenklappen, sowie die Papillarmuskeln sichtbar waren. Außerdem wurde für die Bestimmung der Verkürzungsfraktion im M-Mode die parasternale kurze Achse aufgezeichnet. Dafür wurden die Sonde von der Herzbasis in Richtung Apex bewegt, bis der maximale Durchmesser mit Abzeichnung der Papillarmuskeln zu sehen waren.

Die Auswertung erfolgte mit dem Echo Vevo 2.0 nach den Angaben im Handbuch. Zur Bestimmung der Ejektionsfraktion im B-Mode wurde ein Kontraktionszyklus gesucht, in dem die Myokardwände gut zu sehen waren und dieser ausgewertet. Im M-Mode wurden ca. 5 Kontraktionen ausgewertet. Für die Wanddicke und Diameter wurden der Mittelwert von zwei Messungen innerhalb einer Aufnahme herangezogen.

2.2.5.2 *Probennahme für Western Blots und Realtime-PCR*

Die Probennahme erfolgte in der Regel direkt am Ende der intraventrikulären Druck/Volumen-Messung im narkotisierten Zustand. Der Brustkorb wurde durch eine Inzision unterhalb des Zwerchfells und die Rippen durch Schnitte eidseits des Sternums durchtrennt. Das Herz wurde so schnell wie möglich durch einen Schnitt an der Aorta abgetrennt und zum Ausschlagen in kaltes PBS transferiert. Blutreste und PBS wurden durch Blotten auf Kimtech Tüchern entfernt und nach Wegpräparieren von Gefäßresten das Gesamtgewicht bestimmt. Daraufhin wurde der rechte Ventrikel entfernt um, das Gewicht des linken Ventrikels zu erhalten. Der linke Ventrikel wurde mit dem Skalpell in 2-3 Teile zerschnitten, die direkt in flüssigem N₂ eingefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C .

2.2.5.3 *Bestimmung der Plasma hsTnT Level*

Für die Bestimmung der hsTnT Level im Plasma der Mäuse wurden die Tiere in Isofluran-Narkose versetzt (Narkosekammer 5% Isofluran + 5L/min O₂) und ca. 200µl Blut über heparinisierte Kapillaren aus dem retrobulbären Venenplexus in 1,5ml Reaktionsgefäße entnommen. Durch Zentrifugation bei 2500 rpm, 4°C für 15 Min wurde das Plasma abgetrennt. 10µl Plasma wurden in 390 µl 0,9% NaCl verdünnt und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Die Messung der hsTnT Level wurde durch das Analysenzentrum der Uniklinik Heidelberg durchgeführt, das auch Patientenproben bearbeitet.

2.2.5.4 *Aufzeichnung intraventrikulärer Druck/Volumen Kurven*

Am Versuchsende (Tag 57) wurde die Myokardfunktion mittels linksventrikulärer Hämodynamikmessung (in Intraperitonealnarkose: 500µg/kg Körpergewicht (KG) Medetomidin, 5mg/kg KG Midazolom und 50µg/kg KG Fentanyl) untersucht. Nach Abschluss der hämodynamischen Untersuchungen erfolgen die Blutentnahme (siehe 2.2.5.3) und die Entnahme des Herzens.

Zu Beginn wurde der Katheter 30Min in 0,9% Kochsalzlösung equilibriert und dann das Kathetersystem den Angaben des Herstellers folgend mit Lösungen unterschiedlicher Leitfähigkeiten von 1000µS bis 10000µS kalibriert. Zwischen den einzelnen Messungen wurde der Katheter in 0,9% Kochsalzlösung aufbewahrt. Vor jeder Messung wurde der Druckmesswert (gemessen in 0,9% Kochsalzlösung] manuell auf 0 gestellt, da der Katheter eine leichte Drift aufweist.

Nach Einleitung der Narkose wurde das Tier auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert, so dass der Kopf leicht überstreckt war. Die Temperatur wurde über eine Analsonde überwacht. Nach Inzision vom Kinn zum Sternum wurden die Speicheldrüsen und die Schilddrüse zur Seite geschoben um die Trachea mit den umliegenden Gefäßen freizulegen.

Mit Hilfe von zwei spitzen Pinzetten wurde die *A. carotis interna* stumpf frei präpariert und zwei chirurgische Seidenfäden unter dem Gefäß hindurchgezogen. Mit einem Faden wurde die Carotis kranial durch einen Knoten verschlossen. Nach Abklemmen der Carotis mit einer möglichst nah am Sternum gesetzten Micro-Serrefine wurde das Gefäß durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Durch diesen Schnitt wurde der Katheter mit Hilfe eines Hakens eingeführt und bis zur Serrefine vorgeschoben. Durch einen Knoten auf den Katheter mit dem zweiten Faden wurde das Gefäß verschlossen, so dass die Serrefine wieder gelöst werden konnte. Der Katheter wurde bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Nach jeder Bewegung des Katheters wurde durch Drücken der Enter-Taste im Messmodus eine interne Volumenkalibrierung durchgeführt. Es wurden mehreren Messungen mit möglichst guten Katheterpositionen durchgeführt. Dabei wurde versucht, möglichst kastenförmige Druck-Volumenkurven mit hohen Leitfähigkeiten (Gb-ES und Gb-ED-Werte der Volumenkalibrierung) zu erreichen.

Für die Auswertung mit dem Programm Labscribe2 wurden die Druck-Volumen-Kurven nach Herstellerangaben mit Hilfe der Schlagvolumina aus der Echokardiographie (BMode, parasternal lange Achse) kalibriert. Als Sigma/Epsilon Wert für die Gewebeeigenschaften wurde nach Rücksprache mit dem Hersteller 1100 eingegeben. Die Auswertung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellerhandbuchs. Es wurde der Mittelwert aus 10 qualitativ guten Kurven gebildet.

3 Ergebnisse

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung des potenziell protektiven Effektes einer Überexpression des "Glukose Regulierten Proteins 78" (GRP78) auf die Doxorubizinkardiotoxizität. Um klinisch relevante Aussagen über die Doxorubizinkardiotoxizität treffen zu können wurden als Modelle neonatale Rattenkardiomyocyten (NRVCM) und ein *in vivo* Mausmodell der Doxorubizinkardiotoxizität gewählt. Im Gegensatz zu z.B. immortalisierten Zelllinien erlauben diese eine vergleichsweise unverfälschte Beobachtung der durch Doxorubizin ausgelösten Signalkaskaden und auch der funktionellen Veränderungen. Der Untergang von Kardiomyozyten gilt als Hauptursache der Ausbildung einer Doxorubizinkardiomyopathie. Daher soll im ersten Teil der Arbeit die Charakterisierung der beiden Modelle hinsichtlich der durch Doxorubizin ausgelösten Apoptose und beteiligter Signalkaskaden erfolgen, um danach die Modulation durch die GRP78 Überexpression zu untersuchen.

3.1 Charakterisierung der Doxorubizinkardiotoxizität *in vivo*

Die Etablierung des *in vivo* Mausmodells ist ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit, da es die Überprüfung der Effekte einer GRP78 Überexpression auf die Herzfunktion im Kontext des gesamten Organismus zulässt. Hauptvalidierungsparameter war daher neben dem Überleben die echokardiografische Bestimmung der Ejektionsfraktion als Maß der Herzfunktion.

Für das Modell wurde ein mittelfristiger Ansatz gewählt, der die Doxorubizintoxizität *in vivo* über einen Zeitraum von 5-6 Wochen untersucht. Dafür wurden männlichen C57/Bl6 Wildtyp-Mäusen Boli von 10mg/kg Doxorubizin über 2 Wochen i.p. appliziert, bis eine kumulative Gesamtdosis von 20mg/kg erreicht wurde (siehe Kapitel 2.2.5). Dieses Gabeschema führte 21 Tage nach der ersten Dosis zu einer leichten Kardiomyopathie mit einer Verringerung der Ejektionsfraktion von 60% auf 49% ohne eine zu hohe Sterblichkeit zu erzeugen (Abbildung 3.1.1). Im Zusammenhang mit der Kardiomyopathie konnte ein signifikanter Untergang von Kardiomyocyten festgestellt werden. Als Nachweis wurden die Level des hochsensitiven Troponin T (hsTnT) im Blutplasma bestimmt. Das hsTnT wird bei Schädigung der Kardiomyozyten durch Nekrose und Apoptose freigesetzt und gilt als Marker für eine Herzinsuffizienz. Die hsTnT Level im Blut waren bei den mit Doxorubizin injizierten Tieren an Tag 21 nach Start der Behandlung immer noch annähernd doppelt so hoch wie in den unbehandelten Tieren (Abbildung 3.1.1).

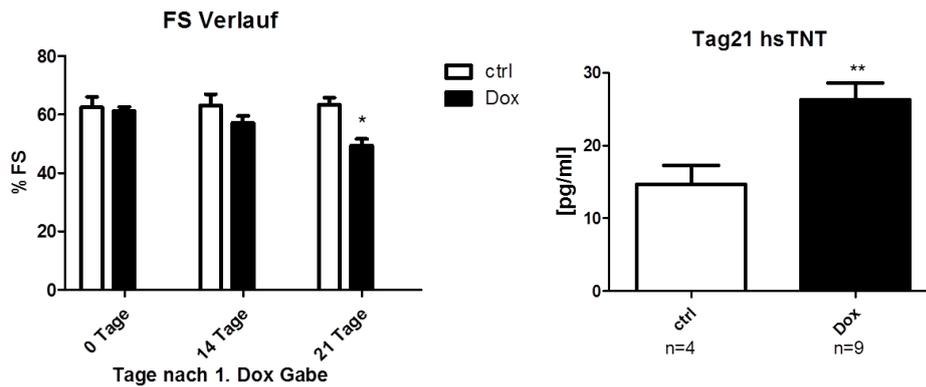


Abbildung 3.1.1: Anzeichen einer Kardiomyopathie 21 Tage nach Doxorubizininjektion. Links: Entwicklung der linksventrikulären Verkürzungsfraktion (FS) bei männlichen C57/Bl6 Mäusen nach Injektion von zweimal 10 mg/kg Doxorubizin über 2 Wochen. Als Kontrolle wurden Tiere mit dem gleichen Volumen NaCl injiziert. Die FS wurde echokardiographisch bestimmt. ctrl n=5; DOX n=10. Statistik: Two way ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (*P=0,0008). Rechts: Spiegel des hochsensitiven Troponin T im Blutplasma als Maß für den Untergang von Kardiomyocyten an Tag 21 nach der ersten Doxorubizininjektion. Statistik ungepaarter, zweiseitiger t-Test (**P<0,05).

Neben den funktionellen Auswirkungen der Doxorubizinbehandlung sollten auch Veränderungen auf molekularer Ebene untersucht werden, um Rückschlüsse auf mögliche Mechanismen der Toxizität ziehen zu können. Da bei einer über mehrere Wochen verteilten Doxorubizingabe die Maximaldosis erst spät erreicht wird und insbesondere schnelle, initiale Veränderungen erfasst werden sollten, wurde für die molekularen Untersuchungen ein anderes Modell verwendet.

Den Mäusen wurde ein Bolus von 15-20mg/kg Doxorubizin i.p. injiziert. Nach 24h bzw. 5 Tagen wurde der Versuch beendet und die Proteinexpression im myokardialen Gewebe untersucht. Von besonderem Interesse waren in Hinblick auf die spätere GRP78 Gentherapie mögliche Veränderungen in der GRP78 Expression. Weder nach 24h noch nach 5 Tagen trat signifikante Änderung der GRP78 Proteinlevel auf. Dennoch war schon nach 24h eine leichte Verringerung auf transkriptioneller Ebene zu erkennen, die sich 5 Tage nach Gabe des Doxorubizinbolus zu einer signifikanten Reduzierung der GRP78 mRNA Level um ca. 50% verstärkte.

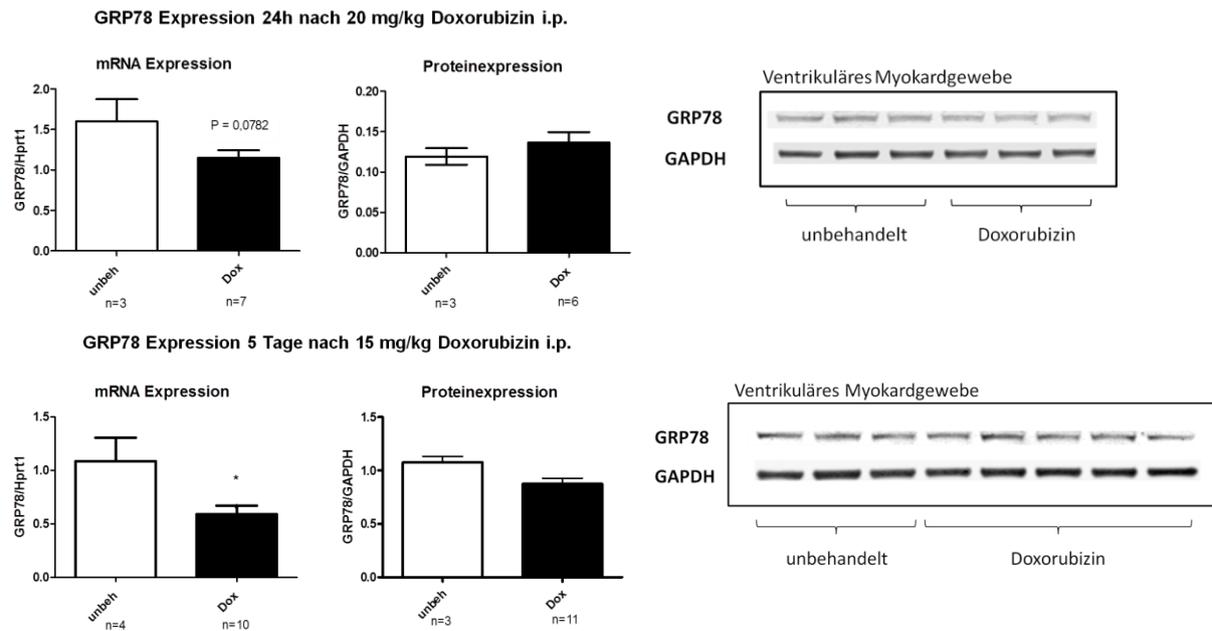


Abbildung 3.1.2: GRP78 Expression zu zwei Zeitpunkten nach der Injektion von Doxorubizin. Oben: GRP78 mRNA und Proteinlevel 24h nach der Injektion von 20 mg/kg Doxorubizin (Dox) i.p. bzw. dem gleichen Volumen NaCl (unbeh). Rechts daneben: Dazugehöriger repräsentativer Western Blot der GRP78 Proteinexpression im linken Ventrikel. Unten: GRP78 mRNA und Proteinlevel 5 Tage nach der Injektion von 15 mg/kg Doxorubizin (Dox) bzw. dem gleichen Volumen NaCl (unbeh). Die GRP78 Level sind signifikant verringert. Rechts daneben: exemplarische Western Blots der Proteine aus dem linken Ventrikel nach Detektion mit einem GRP78 Antikörper. Die Expression wurde auf GAPDH normiert. Statistik: ungepaarter, zweiseitiger t-Test (* $P < 0,05$).

Die Behandlung mit Doxorubizin induziert also mittelfristig eine leichte Kardiomyopathie mit einer verringerten Ejektionsfraktion. Auf zellulärer Ebene führt Doxorubizin *in vivo* zu erhöhtem Zelltod und einer schon frühzeitig verringerten ventrikulären Transkription von GRP78, die sich jedoch nicht auf die Proteinlevel auswirkt. Diese im *in vivo* Modell der Doxorubizinkardiotoxizität gewonnenen Erkenntnisse können für einen Vergleich mit dem *in vitro* Modell herangezogen werden.

3.2 Charakterisierung der Doxorubizinkardiotoxizität *in vitro*

Als *in vitro* Modell für die Doxorubizinkardiotoxizität dienten primäre neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten. Damit wurden zunächst Experimente zur Findung einer geeigneten Doxorubizindosis durchgeführt, die vergleichbare Effekte wie der *in vivo* Versuch induziert. Anhand dieser Dosis wurden dann die über einen Zeitraum von 48h Stunden induzierten zeitliche Effekte der Doxorubizinbehandlung untersucht. Im Fokus des *in vitro* Modells standen vor allem Proteine des Zelltodes (Caspase3, p53) und der Ca^{2+} -Homöostase (PLN und CaMKII), da diese Signalwege die *in vivo* festgestellte Beeinträchtigung der Herzfunktion erklären können. Aber auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde untersucht, da diese generell mit der Doxorubizin Kardiotoxizität in Verbindung gebracht werden (siehe Einleitung).

3.2.1 Doxorubizin beeinflusst dosisabhängig Zelltod und GRP78 Expression *in vitro*

Für die Dosisfindungsexperimente war insbesondere von Bedeutung, ob sich die *in vivo* beobachtete Induktion von Zelltod, *in vitro* reproduzieren lässt. Dafür wurden neonatale ventrikuläre Rattenkardiomyozyten (NRVCM) für 24h mit steigenden Dosen Doxorubizin von 0,1µM-1µM behandelt. Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Probe mitgeführt. Bei allen Proben wurde die Aktivierung des Zelltodes durch Messung der Adenylatkinaseaktivität im Zellkulturüberstand bestimmt (ToxiLight Assay).

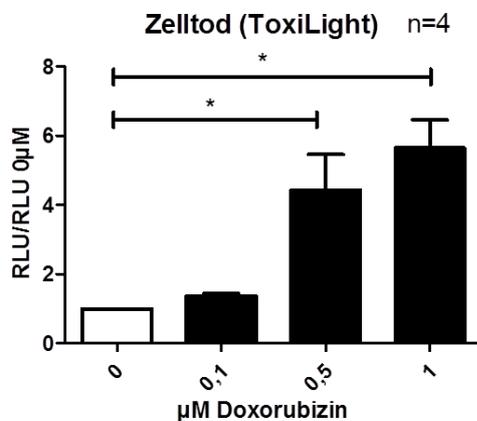


Abbildung 3.2.1: Nachweis des Zellsterbens verursacht durch Apoptose und Nekrose. NRVCM wurden mit steigenden Dosen Doxorubizin für 24h behandelt. Die Bestimmung des unspezifischen Zelltodes erfolgte durch Messung der Adenylatzyklaseaktivität im Überstand über den Zellen mit Hilfe des ToxiLight Assays. Die Messwerte wurden auf die nicht mit Doxorubizin behandelte Probe normiert. Statistik: One-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* P< 0,05).

Wie in Abbildung 3.2.1 zu sehen ist, trat ab einer Doxorubizinkonzentration von 0,5µM eine deutliche, signifikante Erhöhung des Zelltodes auf das 4 bzw. 5 fache der unbehandelten Kontrolle auf.

Parallel zum Anstieg des Zelltodes wurde das ER Stress Chaperon GRP78 sowohl auf Protein, als auch auf mRNA Ebene herunterreguliert (Abbildung 3.2.2). Bei der Behandlung mit 1µM Doxorubizin sank die GRP78 Expression dabei auf ca. 50% der Expression in der unbehandelten Probe.

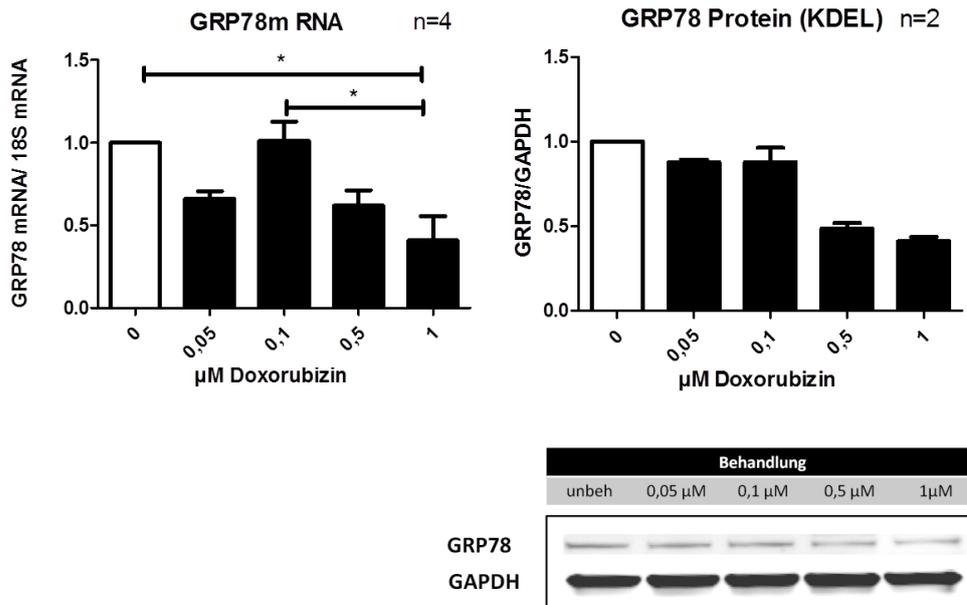


Abbildung 3.2.2: Veränderung der GRP78 Expression bei steigenden Doxorubizin Dosen. NRVCN wurden für 24h mit den angegebenen Dosen Doxorubizin behandelt. Die relative Expression von GRP78 gegenüber einer unbehandelten Probe wurde durch Realtime PCR und Western Blot bestimmt. Die GRP78 Expression nimmt sowohl auf mRNA als auch Proteinebene mit steigenden Dosen Doxorubizin ab. Die Detektion von GRP78 im Western Blot erfolgte mit einem Antikörper gegen das KDEL ER Retentionsmotiv von GRP78 (unten dargestellt). Statistik: One-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* $P < 0,05$).

Die Behandlung von NRVCN mit 0,5µM oder 1µM Doxorubizin spiegelte also die *in vivo* gefundenen Effekte der Doxorubizinbehandlung bezüglich der Zelltodaktivierung wider. Die Untersuchung der GRP78 Level zeigte allerdings im Gegensatz zu den *in vivo* Ergebnissen eine Herunterregulation. Daher wurde dieser Aspekt im Zeitversuch mit einer Dosis von 1µM Doxorubizin genauer analysiert.

3.2.2 Zeitliche Veränderung der GRP78 Expression nach Doxorubizinbehandlung

Ähnlich wie im Dosisversuch war auch in der zeitlichen Untersuchung eine Reduktion der GRP78-Level zu beobachten. Nach 16h war die GRP78 Expression auf 50% gesunken und stieg danach nur langsam wieder an (Abbildung 3.2.3). Allerdings wurde für die *in vitro* Versuche ein andere Antikörper benutzt, als für die *in vivo* Versuche. Der *in vitro* verwendete Antikörper detektiert das ER-Retentionsmotiv (KDEL) von GRP78. Die Proben wurden daher noch einmal mit dem nicht KDEL spezifischen GRP78 Antikörpers aus dem *in vivo* Versuch analysiert. Daraufhin war diese Reduktion der Expression im Western Blot nicht mehr zu detektieren. Tendenziell war hier eher eine Hochregulation zu beobachten. Es scheint also spezifisch die ER-ansässige Form von GRP78 durch Doxorubizin reguliert zu werden.

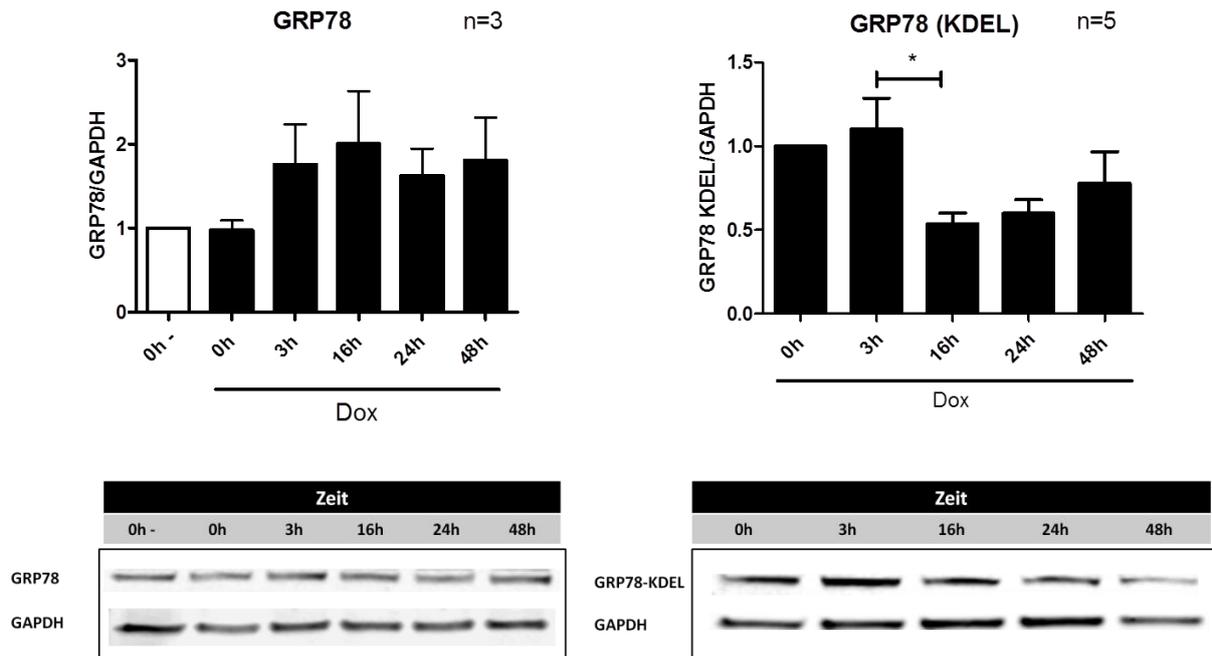


Abbildung 3.2.3: Doxorubizin induzierte Veränderungen der GRP78 Expression. NRVCN wurden mit 1µM Doxorubizin (schwarz) oder Medium (weiß) für die angegebenen Zeiten behandelt. Es wurden zwei verschiedene Antikörper zur Detektion verwendet. Links: Detektion mit einem Antikörper der ein Epitop von GRP78 bindet. Rechts: Detektion mit einem Antikörper der spezifisch das KDEL-Motiv für die Retention im ER detektiert. Dieser Antikörper ist nicht GRP78 spezifisch, die 80 kDa Bande entspricht aber dem Protein GRP78. Eine Veränderung der GRP78 Level ist nur mit dem KDEL-spezifischen Antikörper zu detektieren. Statistik: One way ANOVA mit Tukey *post hoc* Test. *P<0,05. Unten: exemplarische Western Blots der GRP78 Expression im Zeitverlauf von 48h Behandlung mit 1µM Doxorubizin (links Detektion mit den allgemeinen GRP78 Antikörper, rechts Detektion mit dem KDEL spezifischen Antikörper. Die Expression wurde auf die GAPDH Expression normiert.

3.2.3 Zeitverlauf der Aktivierung von Apoptose und mit der Doxorubizintoxizität verbundener Signalwege

Nach der Findung einer mit dem *in vivo* Modell vergleichbaren Doxorubizindosis erfolgte eine genauere Charakterisierung der zeitlichen Aktivierung der Apoptose und verschiedener damit verbundener Signalwege. Wie in Kapitel 1.2 der Einleitung beschrieben werden als Ursache für den Doxorubizin induzierten Zelltod eine starke Schädigung der DNA und die Bildung von ROS diskutiert. Ebenso wird auch die mit einer Störung der Ca²⁺-Homöostase verbundene direkte oder indirekte Erhöhung der mitochondrialen Ca²⁺ Spiegel mit der Induktion der Apoptose in Verbindung gebracht. Daher wurde die Akkumulation von p53 (DNA-Schädigung), die Bildung von ROS, und die Phosphorylierung von PLN und CaMKII (Ca²⁺-Homöostase) untersucht, um einen Hinweis auf die Aktivierung der jeweiligen Signalwege in Verbindung mit der Doxorubizintoxizität zu gewinnen.

3.2.3.1 Zeitlicher Verlauf der Apoptoseaktivierung durch 1 μ M Doxorubizin

Für die zeitliche Charakterisierung erfolgte eine Behandlung der NRVCN mit 1 μ M Doxorubizin für 0-48h. Eine erste Erhöhung des Zelltodes konnte mit dem ToxiLight Assay nach 16h erfasst werden. Nach 24h war der Zelltod gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant um das 4-fache erhöht. Der stärkste Effekt trat allerdings nach 48h mit einer 12-fachen Zelltoderhöhung auf (Abbildung 3.2.4).

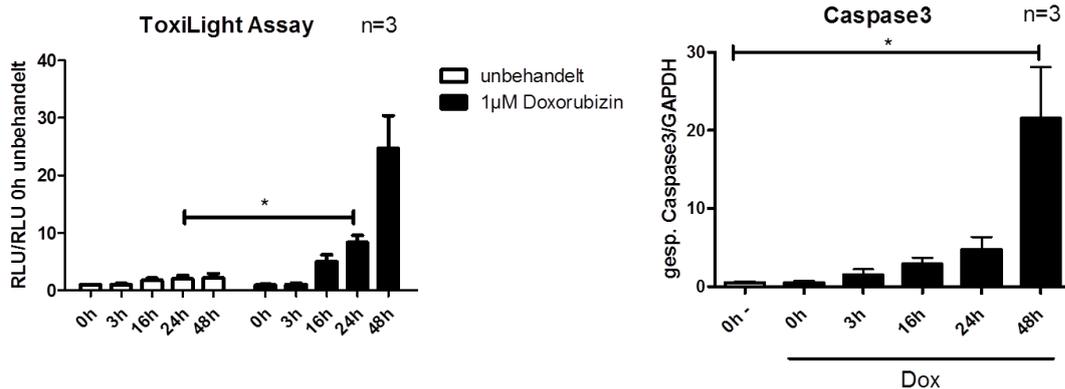


Abbildung 3.2.4: Zeitliche Aktivierung des Zelltodes durch Doxorubizin. NRVCN wurden mit 1 μ M Doxorubizin (schwarz) oder Medium (weiß) für die angegebenen Zeiten behandelt. Links: ToxiLight Assay. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben des Zellkulturüberstandes genommen und der Zelltod über den ToxiLight Assay bestimmt. Durch Behandlung mit 1 μ M Doxorubizin steigt der Zelltod nach 24h signifikant an. Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* P <0,05). Rechts: Apoptosenachweis. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und das Auftreten des Caspase3-Spaltprodukts über Western Blot-Detektion bestimmt. Die Apoptose steigt zwischen 3h und 24h stetig an, bis nach 48h eine signifikante Erhöhung der Apoptose zu verzeichnen ist. Statistik: One-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* p <0,05).

Allerdings ist der ToxiLight Assay relativ unspezifisch und erfasst neben der Apoptose auch nekrotische Zellen. Um die Aktivierung speziell des apoptotischen Zelltodes nachzuweisen, wurden daher das Auftreten TUNEL positiver Zellen und die Spaltung der Caspase3 herangezogen.

Das Auftreten von Apoptose konnte schon 3h nach Behandlung mit 1 μ M Doxorubizin anhand einer leicht erhöhten Caspase3-Spaltung nachgewiesen werden. Danach steigt die Caspase3-Spaltung zu den Zeitpunkten 24h bzw. 48h nach Doxorubizingabe gegenüber der Kontrollprobe weiter auf das 7fache bis mehr als 20 fache an (Abbildung 3.2.8). Ähnlich wie bei den Ergebnissen des ToxiLight Assays ist dabei der stärkste relative Anstieg des Zelltodes zwischen 24h und 48h zu verzeichnen (siehe Abbildung 3.2.4).

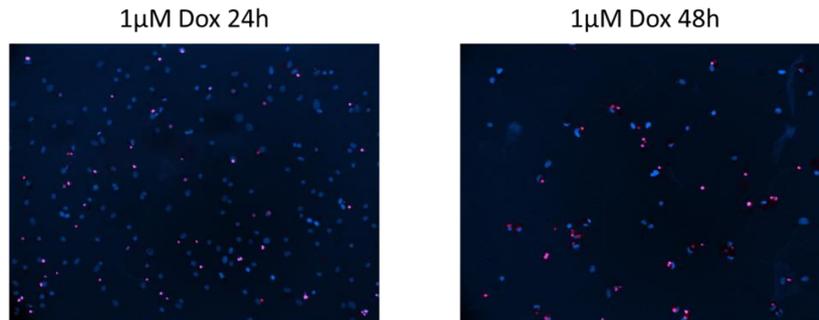


Abbildung 3.2.5: Nachweis von Apoptose durch den TUNEL Assay. Visualisierung apoptotischer Zellkerne durch den TUNEL Assay 24h und 48h Stunden nach Behandlung von NRVCN mit 1µM Doxorubizin. TUNEL positive Nuklei sind rot, DAPI positive Nuklei blau gefärbt. Zu sehen ist das Auftreten apoptotischer Nuklei nach 24h Stunden mit einem Anstieg des Prozentsatzes TUNEL positiver Zellkerne nach 48h. Die Gesamtzellzahl nimmt dabei ab (blaue Nuklei). Die Bilder sind repräsentativ für 2 durchgeführte Experimente.

Der TUNEL Assay visualisiert das für Apoptose charakteristische Auftreten von DNA Strangbrüchen. Tatsächlich ist nach 24h Behandlung mit 1µM Doxorubizin ein hoher Prozentsatz TUNEL positiver Zellen (rot) zu erkennen der bis 48h noch einmal ansteigt. Die Gesamtzellzahl, erkennbar an den mit DAPI blau gefärbten Zellkernen sinkt dabei massiv.

3.2.3.2 Untersuchung von DNA-Schädigung, Ca^{2+} -Regulatoren und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Nach der Klärung des zeitlichen Verlaufs der Apoptoseaktivierung folgte nun die Untersuchung der in der Einleitung diskutierten Auslöser der Doxorubizintoxizität.

Zunächst wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit verbundener Signalkaskaden durch die Behandlung mit 1µM Doxorubizin untersucht.

Als initiale Antwort auf die Bildung von ROS wird im Rahmen einer protektiven Signalkaskade AKT (Protein Kinase B) an Ser 473 phosphoryliert [79]. Dies ist auch bei der Behandlung von NRVCN mit 1µM Doxorubizin nach 24h zu beobachten. Nach 48h ist AKT relativ zur gesamten AKT Menge immer noch verstärkt phosphoryliert, die Gesamtexpression nimmt jedoch ab (Abbildung 3.2.6 A).

Ein möglicher Zusammenhang mit der Bildung von ROS wurde mit Hilfe des ROS-Glo-Assay untersucht. Dabei wird die H_2O_2 -Abgabe der Zellen in den Überstand als Maß der ROS Produktion herangezogen. Diese Methode lässt die Zellen intakt, so dass eine Normierung auf die Zellzahl möglich ist. Da es im Verlauf der Doxorubizinbehandlung zu massivem Zelltod kommt und die ins Medium abgegebene Menge an ROS auch von der Zellzahl abhängt, war diese Normierung unumgänglich um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Als Zeitpunkte für die Messung wurden 16h und 24h gewählt, da zwischen diesen Zeitpunkten die AKT-Phosphorylierung anstieg. Im Vergleich zu nur mit Medium behandelten Zellen zeigten Doxorubizin behandelte NRVCN weder nach 16h noch nach 24h eine signifikant erhöhte Bildung von H_2O_2 (Abbildung 3.2.6 B).

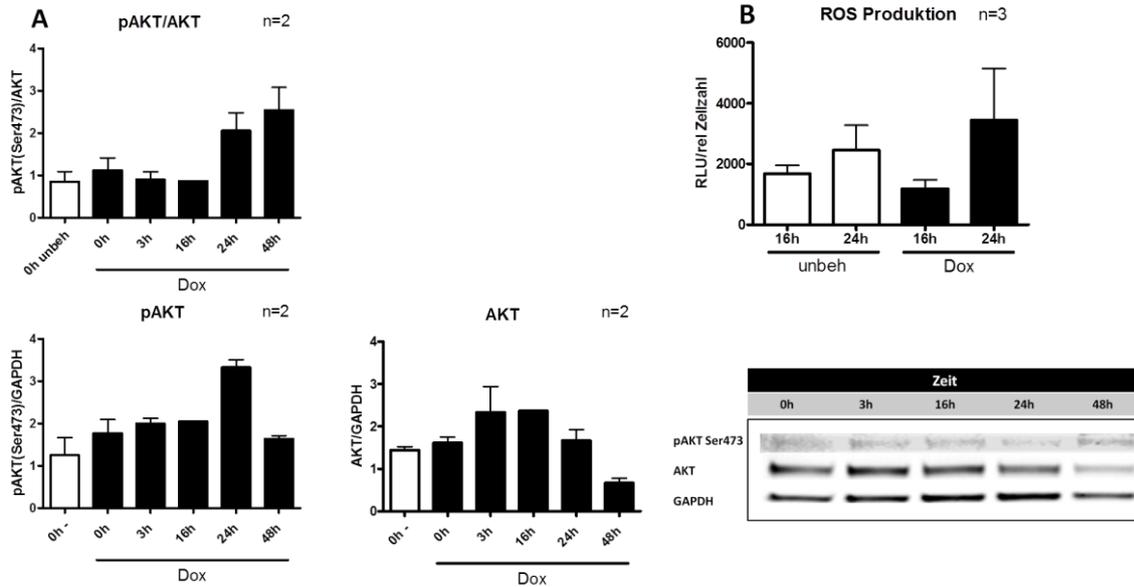


Abbildung 3.2.6: Untersuchung des oxidativen Stress nach Doxorubizinbehandlung. NRVCN wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 1 μ M (schwarze Säulen) oder nur mit Medium behandelt (weiße Säulen). A) Es wurde die Phosphorylierung von AKT an Ser473 und die gesamte AKT Expression durch Western Blot untersucht (repräsentativer Western Blot unten rechts). Die absolute AKT Phosphorylierung war nur nach 24h erhöht, die Phosphorylierung relativ zum Gesamtprotein nach 24h und 48h. Aufgrund der geringen Versuchszahl folgte keine statistische Auswertung. B): Messung der H₂O₂ Level als Maß der ROS-Produktion. Die H₂O₂ Level wurden im Zellkulturüberstand über den NRVCN mit Hilfe des ROS-Glo Assays gemessen und dann auf die Zellzahl normiert. Es zeigte sich keine Erhöhung der ROS Level im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test.

Als nächstes wurden die Level des proapoptischen Zelltodregulators p53 bestimmt, da dieser insbesondere nach DNA-Schädigungen akkumuliert. In der Tat waren zwischen 3h und 24h nach dem Start der Doxorubizinbehandlung die p53 Level erhöht (Abbildung 3.2.7 A und Abbildung 3.2.6). Zu diesem Zeitpunkt war auch schon eine geringe Aktivierung der Caspase3 zu sehen. Der Höhepunkt der p53 Akkumulation konnte nach 16h mit einer ca.2,5 fachen Erhöhung beobachtet werden. Zwischen 24h und 48h fielen die p53 Level dann rasant ab. Damit geht die p53 Akkumulation der maximalen Caspase3-Spaltung um mehr als 24h voraus.

Die DNA-Schädigung sollte außerdem durch das frühe Auftreten von Doppelstrangbrüchen direkt nachzuweisen sein. Dazu wurde die Rekrutierung des DNA Reparaturenzyms Phospho-H2A.X zu den Doppelstrangbrüchen durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Nach 1h, also noch vor der Aktivierung von Caspase3, waren in allen Zellkernen die für P-H2A.X typischen Foci zu beobachten (Abb. Abbildung 3.2.7; rote Punkte). Damit konnte ein frühes Auftreten von DNA-Schädigung im untersuchten Modell der Doxorubizinkardiotoxizität nachgewiesen werden.

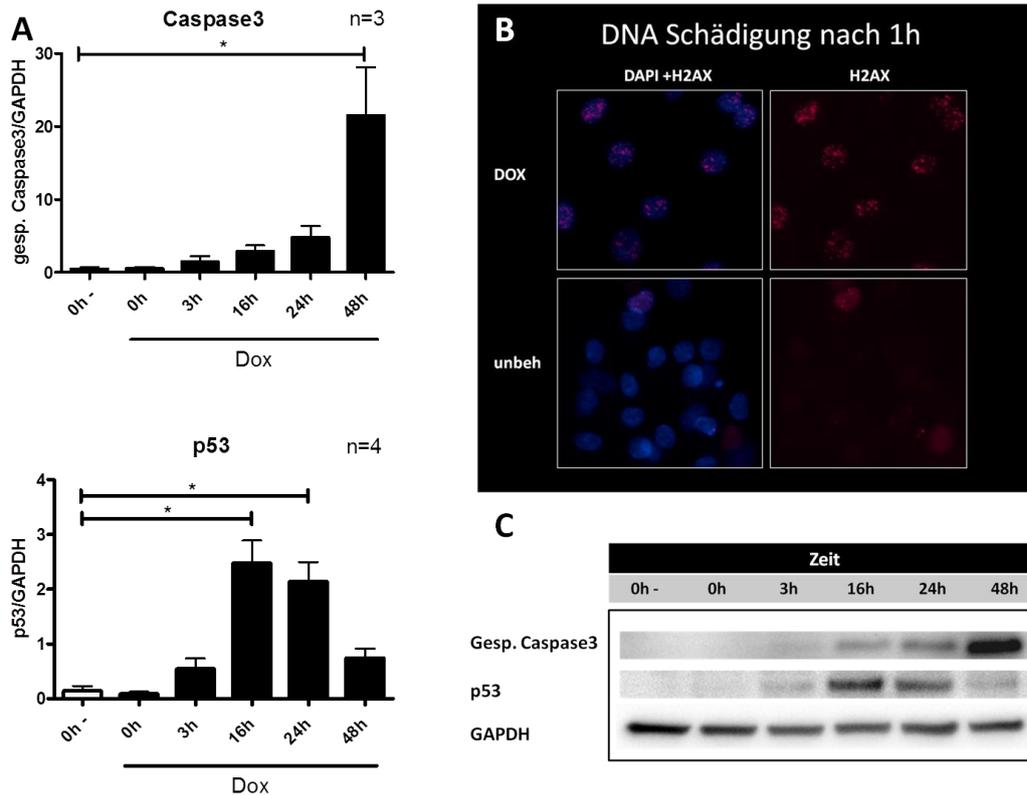


Abbildung 3.2.7: Untersuchung der Antwort auf DNA-Schädigung nach Doxorubizinbehandlung. A) Western Blot Auswertung für die Aktivierung von Caspase3 und die p53 Level. NRVCN wurden für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Doxorubizin (schwarz) oder Medium (weiß) behandelt. Das Maximum der p53 Akkumulation lag dabei zeitlich vor der Caspase3 Aktivierung. Statistik: One-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* $P < 0,05$). B) Immunfluoreszenz basierte Visualisierung der DNA-Schädigung nach 1h Behandlung von NRVCN mit 1 μ M Doxorubizin. Der Nachweis erfolgte durch einen Antikörper gegen das DNA Reparatur-Protein Phospho-H2A.X, welches das Auftreten von Doppelstrangbrüchen im Nukleus markiert (rote Punkte). Die Nuklei sind durch DAPI-Färbung dargestellt (blau). C) repräsentativer Western Blot der Caspase3 Aktivierung und p53 Akkumulation.

Gleichzeitig mit der p53 Akkumulation war auch die Aktivierung des wichtigen Regulators der Ca^{2+} -Homöostase - Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) - erhöht. Die CaMKII-Aktivität kann über die Phosphorylierung von Phospholamban (PLN) an dem für CaMKII spezifischen Thr17 nachgewiesen werden. Insgesamt verhielt sich die PLN-Phosphorylierung wie die p53 Level, mit einem starken Anstieg zwischen 16h und 24h und einer darauf folgenden raschen Reduktion, so dass nach 48h keine erhöhte Phosphorylierung mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.2.7).

Desweiteren wurde die Autophosphorylierung der CaMKII an Thr286 untersucht, die eine Art Ca^{2+} -Gedächtnis der CaMKII darstellt und sie Ca^{2+} -unabhängig aktiv macht. Im Gegensatz zur PLN-Phosphorylierung war die Autophosphorylierung von CaMKII an Thr286 erst nach 48h erhöht. Der initialen CaMKII-Aktivierung mit der daraus resultierenden Phosphorylierung von PLN folgt also eine konstitutive Aktivierung, die mit dem Zeitpunkt der stärksten Apoptoseaktivierung zusammenfällt. (Bemerkung: Trotz der geringen Versuchsanzahl von $n=2$ wird dieses Ergebnis als aussagekräftig angesehen, da bei den späteren Versuchen mit einer GRP78 Überexpression nach 48h ebenfalls eine signifikante Hochregulation der CaMKII-Phosphorylierung in den mit AAV-Luc und 1 μ M Doxorubizin behandelten Proben festgestellt werden konnte, die diese Ansicht statistisch untermauert).

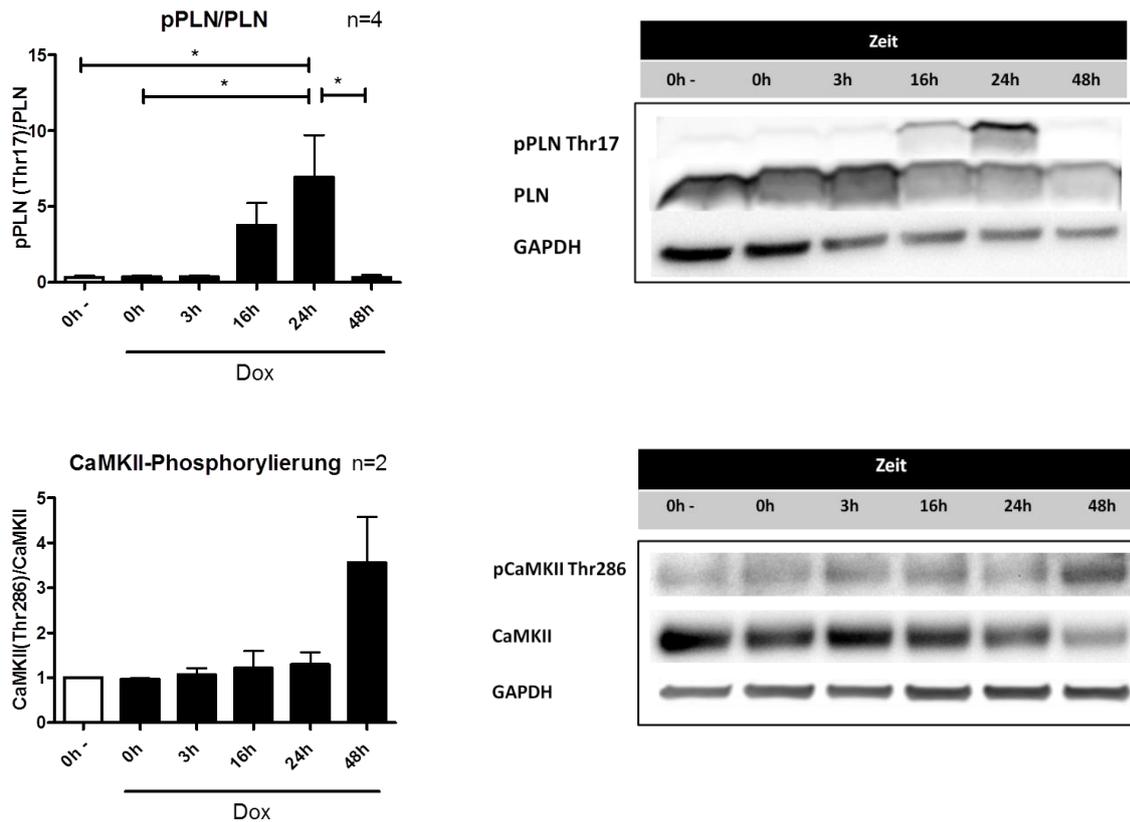


Abbildung 3.2.8: Veränderungen in der Expression von Regulatoren der Ca^{2+} -Homöostase (PLN, CaMKII) im Zeitverlauf. NRVCN wurden mit $1\mu\text{M}$ Doxorubizin (schwarz) oder Medium (weiß) für die angegebenen Zeiten behandelt. Die Quantifizierung der Phosphorylierung erfolgte im Western Blot durch Detektion mit einem phosphosensitiven Antikörper und einem nicht phosphosensitiven Antikörper. Im Zeitverlauf wurde zunächst PLN an Ser 473 phosphoryliert, dann kam es zur Autophosphorylierung von CaMKII. Beides sind Anzeichen einer erhöhten CaMKII Aktivität. Statistik: One-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* $P < 0,05$). Rechts: Repräsentative Western Blots der PLN Phosphorylierung an Thr17 und der PLN Gesamtproteinlevel, sowie der Autophosphorylierung von CaMKII an Thr 286 und den CaMKII Gesamtproteinleveln. Die Expression wurde auf GAPDH Expression normiert.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Behandlung von NRVCN mit $1\mu\text{M}$ Doxorubizin zu Apoptose, der p53 Akkumulation und einer Aktivierung der CaMKII führt. Zeitlich gesehen fallen diese Vorgänge mit der Depletion der GRP78-KDEL Form zusammen. Dies wirft Fragen bezüglich einer ursächlichen Rolle der GRP78 Depletion in der Doxorubizinkardiotoxizität auf.

3.3 Der Knockdown von GRP78 induziert ER Stress und Zelltod

Wie im vorigen Kapitel dargestellt, geht die Doxorubizin induzierte Kardiotoxizität *in vitro* mit einer Herunterregulation des ER Chaperons GRP78 einher. Es stellt sich daher die Frage, ob diese Herunterregulation von GRP78 maladaptiv ist oder sogar ein Auslöser des durch Doxorubizin verursachten Zelltodes sein könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Auswirkungen eines siRNA vermittelten Knockdowns von GRP78 auf unbehandelte und auf Doxorubizin behandelte Zellen untersucht. Ziel war es, herauszufinden, ob der alleinige Knockdown von GRP78 die Effekte von Doxorubizin nachbildet und ob sich die Doxorubizin-Kardiotoxizität durch den zusätzlichen Knockdown verstärken lässt.

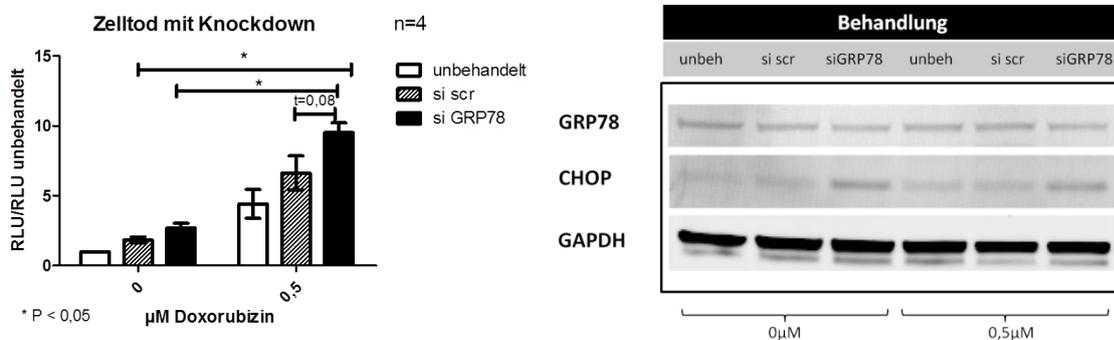


Abbildung 3.3.1: Einfluß des Knockdowns von GRP78 auf Doxorubizintoxizität und Zelltod. Bestimmung des Zelltodes nach Behandlung neonataler Kardiomyocyten mit 0,5µM Doxorubizin für 24h mit bzw. ohne gleichzeitigem Knockdown von GRP78. Die Kardiomyocyten wurden für 5 Tage mit einer gegen GRP78 gerichteten siRNA oder einer Kontroll-siRNA behandelt. Dann erfolgte die Behandlung mit 0,5µM Doxorubizin oder Medium als negativ Kontrolle für 24h. Als Maß für das Zellsterben wurde die Aktivität der Adenylatkinase im Zellkulturüberstand gemessen (ToxiLight Assay). Dargestellt sind die Messwerte aus 4 Versuchen in Doppelbestimmung. Der GRP78 Knockdown allein verdoppelte den Zelltod im Vergleich zu den mit der Kontroll siRNA behandelten Zellen. Durch die Behandlung mit 0,5µM Doxorubizin vervierfachte sich der Zelltod. Der Knockdown zusätzlich zur Doxorubizinbehandlung führte zu einer Verfünffachung im Vergleich zu den nur mit Kontroll siRNA behandelten Zellen und damit zu einer leichten Erhöhung des Zelltodes. Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (*P<0,05). Rechts: exemplarischer Western Blot mit der Detektion von GRP78 und dem apoptotischen ER Stress Marker CHOP. Die Expression wurde auf die GAPDH Expression normiert.

Der Knockdown von GRP78 war mit 24% nicht sonderlich ausgeprägt. Dennoch erhöhte sich der basale Zelltod um 50% im Vergleich zur einer Kontroll-siRNA behandelten Gruppe (Abbildung 3.3.1). Vergleicht man dies mit der Doxorubizinbehandlung, so wurde durch 0,5µM Doxorubizin mit 21% eine ähnliche Reduktion der GRP78 Proteinlevel erreicht wie durch den Knockdown. Dennoch vervierfachte sich bei Doxorubizingabe der Zelltod. Die GRP78 Reduktion durch Doxorubizin ist also nicht der Hauptauslöser des Zelltodes.

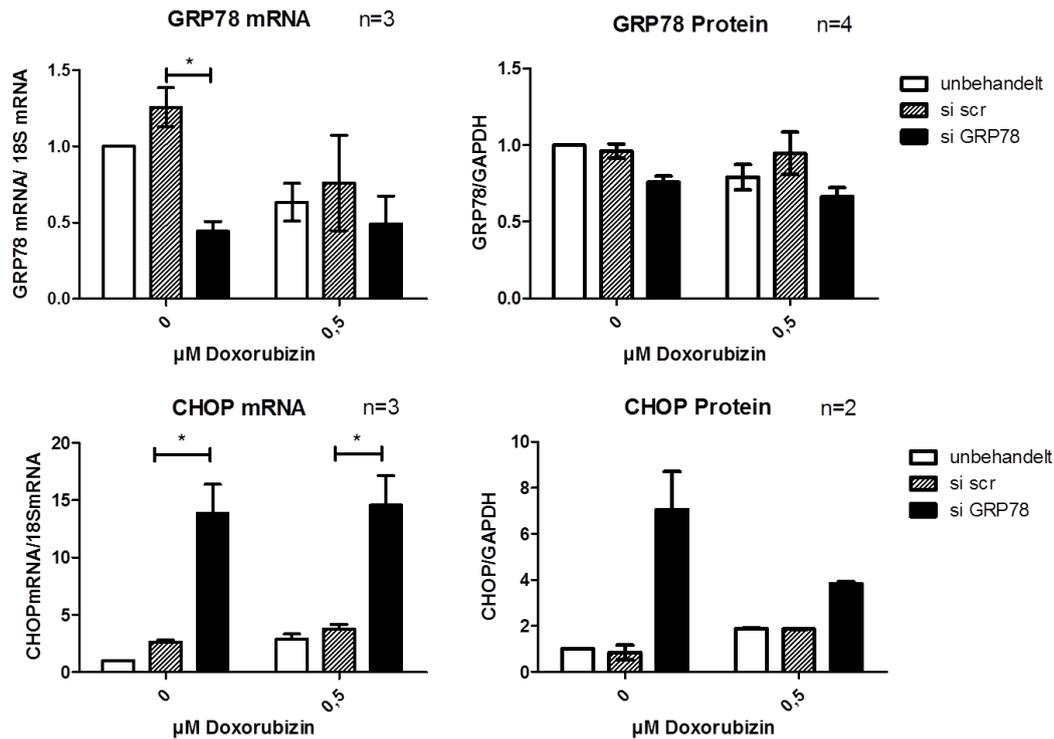


Abbildung 3.3.2: Expression von GRP78 und CHOP nach GRP78 Knockdown mit gleichzeitiger Doxorubizinbehandlung. Neonatale Kardiomyocyten wurden für 5 Tage mit einer gegen GRP78 gerichteten siRNA oder einer Kontroll-siRNA behandelt. Dann erfolgte die Behandlung mit 0,5µM Doxorubizin oder Medium als negativ Kontrolle für 24h. Es konnte auf mRNA Ebene ein Knockdown auf 63% der kontrollbehandelten Zellen erreicht werden. Auf Proteinebene konnte die Expression von GRP78 auf ca. 76%-66% reduziert werden. In Folge der Doxorubizinbehandlung stieg die CHOP Expression in den Proben ohne zusätzlichen siRNA vermittelten GRP78 knockdown auf das zweifache. Im Gegensatz dazu erhöhte der siRNA vermittelte Knockdown die CHOP Proteinexpression auf das 7 bzw. 4 fache (untere Schaubildreihe). Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (*P<0,05).

Ein Unterschied zwischen der Doxorubizinbehandlung und dem GRP78 Knockdown ist auch in den CHOP Leveln zu erkennen. CHOP ist ein ER Stress Marker, der den negativen, apoptotischen Teil der ER Stress Antwort kennzeichnet. Der si RNA vermittelte Knockdown von GRP78 induzierte eine starke, mit einer 7-fachen Hochregulation von CHOP verbundene ER Stress Antwort. Trotz vergleichbarer GRP78 Level ist nach Doxorubizinbehandlung nur eine vergleichsweise geringe CHOP Induktion zu erkennen (Abbildung 3.3.2.). Der Knockdown von GRP78 löst also eine starke ER Stress Antwort aus, die Doxorubizinbehandlung nur eine geringe.

Betrachtet man nun die Kombination beider Behandlungen lässt sich eine Erhöhung des absoluten Zelltodes durch den zusätzlichen GRP78 Knockdown feststellen (Abbildung 3.3.1). Vergleicht man allerdings den relativen, nur durch das Doxorubizin verursachten Anstieg des Zelltodes für die mit si ctrl und si GRP78 behandelten Proben, ist kein Unterschied mehr zu erkennen (Abbildung 3.3.3). In beiden Fällen erhöht sich der Zelltod um das 3,6-fache. Es handelt sich also nicht um einen synergistischen Effekt.

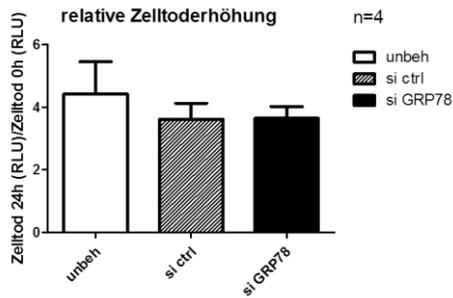


Abbildung 3.3.3: Relative Zelltoderhöhung durch die Behandlung mit 0,5 μ M Doxorubizin. Um den tatsächlichen Einfluss des GRP78 Knockdowns auf den durch Doxorubizin ausgelösten Zelltod zu untersuchen, wurden die Werte nach Doxorubizinbehandlung auf die jeweils gleich behandelte Probe (unbeh, si ctrl, si GRP78) ohne Doxorubizinbehandlung normiert. Unabhängig von der Ko-Behandlung blieb die relative Zelltoderhöhung durch Doxorubizin gleich. Der Zelltod wurde durch den ToxiLight Assay gemessen. Statistik: One-way-ANOVA mit Bonferroni Nachtest.

Es konnte somit gezeigt werden, dass ein GRP78 Knockdown Zelltod auslöst, aber die Zellen nicht noch weiter gegenüber Doxorubizin sensitiviert. Ein protektiver Effekt einer GRP78 Überexpression ist dennoch möglich und wurde als nächstes untersucht.

3.4 Untersuchung des Effekts der GRP78 Überexpression *in vitro*

Um das antiapoptotische Potenzial einer GRP78 Überexpression zu ermitteln wurden die Experimente analog zu der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Doxorubizintoxizität durchgeführt. Neonatale Kardiomyocyten, wurden 0h bis 48h mit 1 μ M Doxorubizin behandelt. Vor der Behandlung mit Doxorubizin wurden die Zellen allerdings mit einem AAV Serotyp6 zur Expression von GRP78 (AAV-GRP78) bzw. zur Expression des Luciferase-Gens (AAV-Luciferase) als Kontrolle transfiziert. Die Transgene stehen unter der Kontrolle des Myosin Light Chain-(MLC)-Promotors, um eine Kardiomyozyten-spezifische Expression zu erreichen. Da der MLC-Promotor eine relativ schwache Expression aufweist, wurde die Expression durch einen stromaufwärts gelegenen CMV-Enhancer verstärkt.

Primäres Ziel dieser Experimente war, zu überprüfen, ob eine GRP78 Überexpression im Zusammenhang mit der Doxorubizintoxizität protektiv wirkt, also die Apoptose verringert. Daneben sollten allerdings auch erste Hinweise auf mögliche Ursachen des antiapoptotischen Effekts gewonnen werden.

3.4.1 Therapeutisches Fenster der GRP78 Überexpression

Die immer bessere Aufarbeitung und die Aufdeckung immer komplexerer Verknüpfungen zwischen verschiedenen Signalwegen führen mittlerweile zu der Erkenntnis, dass eine bloße starke Überexpression eines Gens nicht das Ziel eines therapeutischen Ansatzes sein kann. Vielmehr besteht ein therapeutisches Fenster, außerhalb dessen negative Effekte auftreten. Daher wurde der Effekt der GRP78 Überexpression hinsichtlich einer möglichen zeitlichen Abhängigkeit bzw. einer Dosisabhängigkeit untersucht.

Für die Untersuchung wurde an den Zeitpunkten 24h und 48h die relative Caspase3 Spaltung in den GRP78 behandelten Proben bezüglich der Luciferase behandelten Proben desselben Zeitpunktes berechnet ($\text{Caspase}_{\text{BIP}}/\text{Caspase}_{\text{Luc}}$). Bei dieser Normierungsweise bedeutet ein

Wert größer 1 eine vermehrte Caspaseaktivierung gegenüber der Luciferase behandelten Probe, während ein Wert kleiner 1 eine geringere Caspaseaktivierung und damit eine verringerte Apoptose anzeigt. Dann erfolgte eine grobe Auftrennung in hohe GRP78 Expression (Expression $\geq 2,7$) bzw. niedrige Expression (Expression $>1,5$ und $<2,7$)

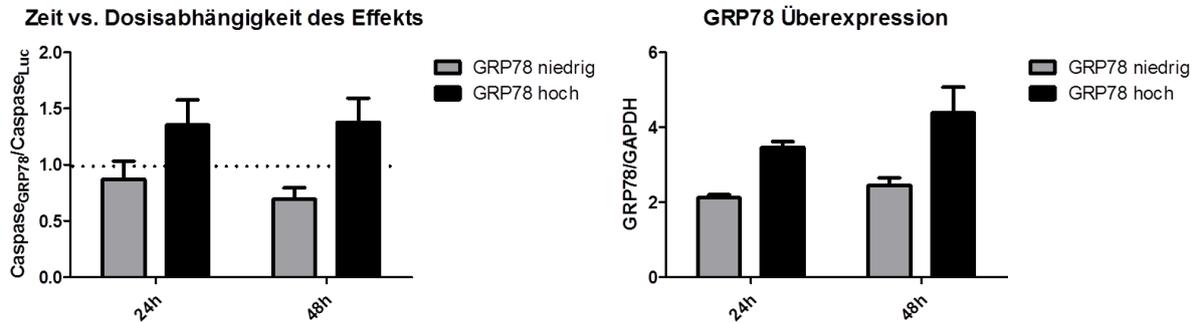


Abbildung 3.4.1: Auswertung der Apoptoseaktivierung nach Doxorubinzugabe in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung und der Stärke der Überexpression. Um den Effekt leichter einordnen zu können wurde die Caspase3 Aktivierung in den mit AAV-GRP78 behandelten Proben als Vielfaches der Caspase3 Aktivierung in den korrespondierenden mit AAV-Luc behandelten Probe dargestellt (Caspase_{GRP78}/Caspase_{Luc}). Dann wurden die Werte nach Dauer der Doxorubizinbehandlung aufgetrennt, um eine mögliche Zeitabhängigkeit herauszuarbeiten. Zusätzlich wurden die Werte für beide Zeitpunkte grob in Versuche mit einer niedrigen Überexpression ($>1,5$ $<2,7$ bezüglich einer unbehandelten Kontrolle) und hoher GRP78 Überexpression ($>2,7$) eingeteilt. Es zeigte sich ein Unterschied in der relativen Caspaseaktivierung zwischen hoher und niedriger GRP78 Expression. Die Expressionsdauer hatte hingegen keinen Einfluß auf die Apoptose. Statistik: Two-way-ANOVA.

In dieser Darstellungsweise war kein Unterschied in der Caspaseaktivierung bezüglich der Dauer des Versuches und damit auch der Dauer der GRP78 Behandlung zu erkennen (Abbildung 3.4.1). Die hohe GRP78 Expression war jedoch zu beiden Zeitpunkten mit einer deutlich Erhöhung des relativen Zelltods verbunden (Werte >1). Bei einer niedrigen GRP78 Überexpression verringerte sich im Gegensatz dazu die Caspaseaktivierung (Werte <1).

Eine verfeinerte Darstellung macht diesen Effekt noch deutlicher. Dafür wurde die relative Caspasespaltung in Cluster steigender GRP78 Expression ohne Beachtung des Versuchsendzeitpunktes geordnet.

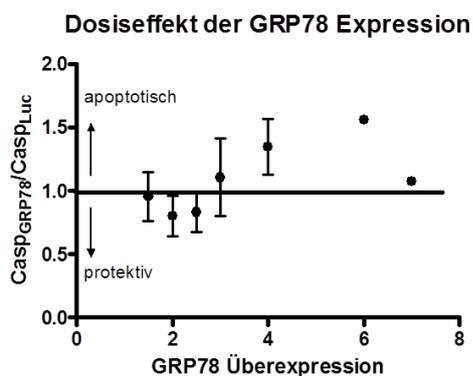


Abbildung 3.4.2: Dosisabhängigkeit des antiapoptotischen Effekts der GRP78 Überexpression. Die Caspase3-Spaltung in den mit Doxorubizin und AAV-GRP78 behandelten Proben wurden ins Verhältnis zu den korrespondierenden mit Doxorubizin und AAV-Luc behandelten Proben gesetzt (Casp_{GRP78}/Casp_{Luc}). Dieser Wert wurde gegen die GRP78 Überexpression im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollprobe aufgetragen. Ein Wert kleiner als 1 zeigt dabei einen protektiven Effekt an, ein Wert größer als 1 eine Verstärkung der Apoptose. Innerhalb der Cluster ist $n=1-12$. Eine 1,5 bis 2,7 fache Überexpression hatte einen antiapoptotischen Effekt. Bei höheren GRP78 Leveln kehrte sich der Effekt in einen apoptotischen

In dieser Darstellung wurde ein positiver Effekt bis zu einer Überexpression von dem 3-fachen des Basislevels deutlich (Abbildung 3.4.2). Der maximale Effekt lag dabei bei einer ca. 2-fachen Überexpression. Danach kehrte sich die Wirkung in eine apoptotische um. Das therapeutische Fenster der GRP78 Überexpression liegt also zwischen einer 1,5-fachen und einer ca. 3-fachen Überexpression.

3.4.2 Eine gezielte GRP78 Überexpression schützt vor Doxorubizin induziertem Zelltod

Nach der Festlegung des therapeutischen Fensters wurde das antiapoptotische Potenzial von GRP78 genauer untersucht, indem der Einfluß auf die Caspase3-Spaltung, die Anzahl TUNEL positiver apoptotischer Zellen und den ToxiLight Assay bestimmt wurde. Versuche mit einer GRP78 Überexpression $<2,7$ wurden basierend auf den im vorigen Kapitel beschriebenen Ergebnissen komplett ausgeschlossen. Damit lag die GRP78 Expression in den AAV-GRP78 behandelten Gruppen zwischen einer 1,6 und 2,5 fachen Überexpression (Abbildung 3.4.3). Bei den Luciferasebehandelten Proben ändert sich die GRP78 Expression durch die Doxorubizinbehandlung nicht.

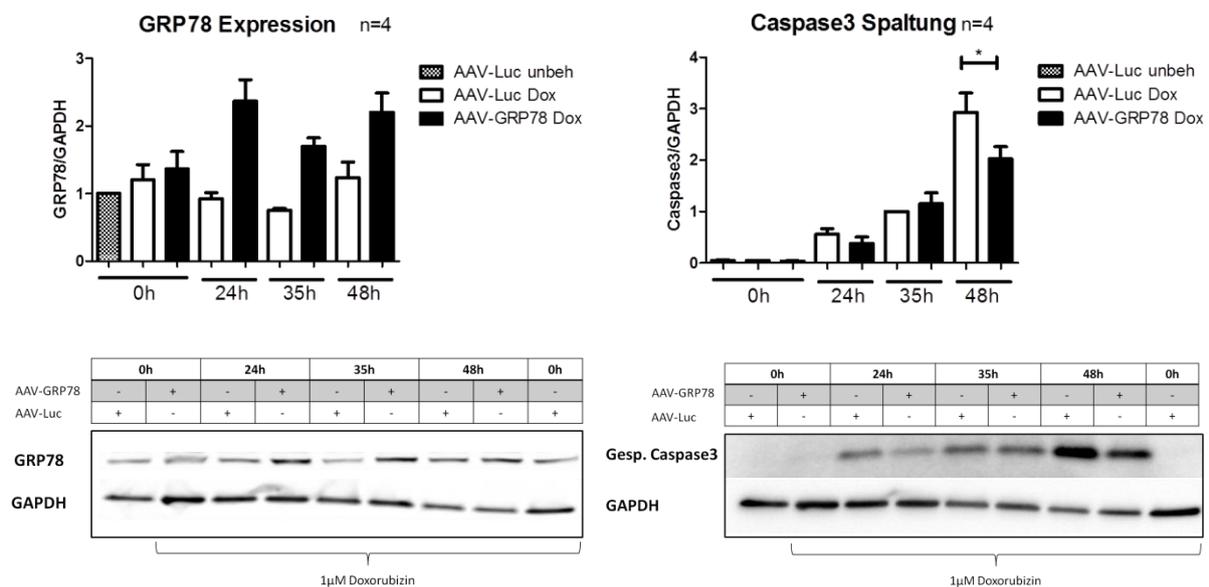


Abbildung 3.4.3: Einfluß der GRP78 Überexpression auf die Doxorubizin-induzierte Caspase-3 Aktivierung. Links: GRP78 Level in AAV-Luc und AAV-GRP78 behandelten Zellen im Zeitverlauf nach der Behandlung mit 1µM Doxorubizin für die angegebenen Zeiträume. Die Inkubation mit dem jeweiligen AAV erfolgte 2 Tage vor der Doxorubizinbehandlung. Während in den mit Luciferase und Doxorubizin behandelten Zellen keine signifikante Veränderung der GRP78 Expression auftrat (weiß), ließ sich durch den AAV-GRP78 die GRP78 Expression auf das 1,8 -2,5 fache erhöhen (schwarz). Rechts: Aktivierung der Caspase3 in AAV-Luc (weiß) und AAV-GRP78 (schwarz) behandelten Zellen im Zeitverlauf nach Behandlung mit 1µM Doxorubizin. Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* $P<0,05$). Unten: Exemplarische Darstellung der Western Blots für GRP78 Expression und die Caspase3-Aktivierung. Verwendet wurde der nicht KDEL-spezifische GRP78 Antikörper. Die Expression wurde auf die GAPDH Expression normiert.

Durch die Virusbehandlung änderte sich der zeitliche Verlauf der Apoptose gegenüber unbehandelten NRVCN nicht, der Zelltod wurde nach einem ähnlichen Muster wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben in einem Zeitfenster von 24-48h aktiviert. Bei der Bestimmung des unspezifischen Zelltodes durch den ToxiLight Assay war dabei kein Unterschied zwischen AAV-Luc und AAV-GRP78 behandelten Proben zu erkennen (Abbildung 3.4.4). Betrachtet man allerdings mit der Spaltung der Caspase3 speziell die Aktivierung der Apoptose zeigte sich ein positiver Effekt durch die GRP78 Überexpression. Während zwischen 24h und 48h die Caspase-Spaltung in den AAV-Luc behandelten Proben um das 6 fache anstieg, erhöhte sie sich in den AAV-GRP78 behandelten Proben nur um das 4 fache.

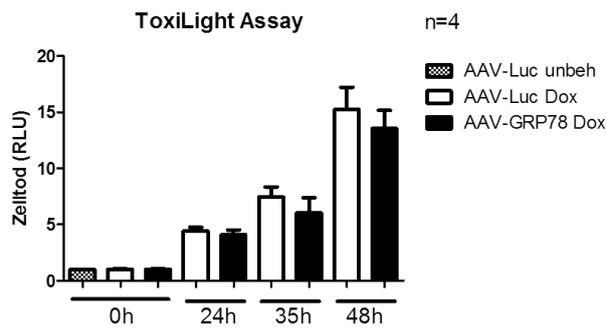


Abbildung 3.4.4: Einfluss der GRP78 Behandlung auf den Doxorubizin induzierten Zelltod im ToxiLight Assay. Die NRVCN wurden 2 Tage mit Virus inkubiert, dann erfolgte die Behandlung mit 1 μ M Doxorubizin. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben des Überstandes über den Zellen genommen und der Zelltod mit dem ToxiLight Assay gemessen. Das Signal wurde auf die unbehandelte Luciferaseprobe zum Zeitpunkt 0h normiert. Es ließ sich keine Veränderung des Zelltodes durch die GRP78 Behandlung im Zeitraum von 48h nachweisen. Dargestellt ist die Zusammenfassung von 4 Experimenten. Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test.

Der antiapoptotische Effekt der dosierten Überexpression von GRP78 zeigte sich auch in einem zweiten, unabhängigen Assay. Im Vergleich zu den AAV-Luc behandelten Proben sank der Prozentsatz apoptotischer TUNEL positiver Zellkerne mit der GRP78 Überexpression nach 48h um 22% (Abbildung 3.4.5. AAV-Luc: 41%, AAV-GRP78: 32%). Mit einem $t=0,057$ erreicht dieser Unterschied zwar nicht Signifikanzniveau, weist aber auf einen deutlichen Trend hin.

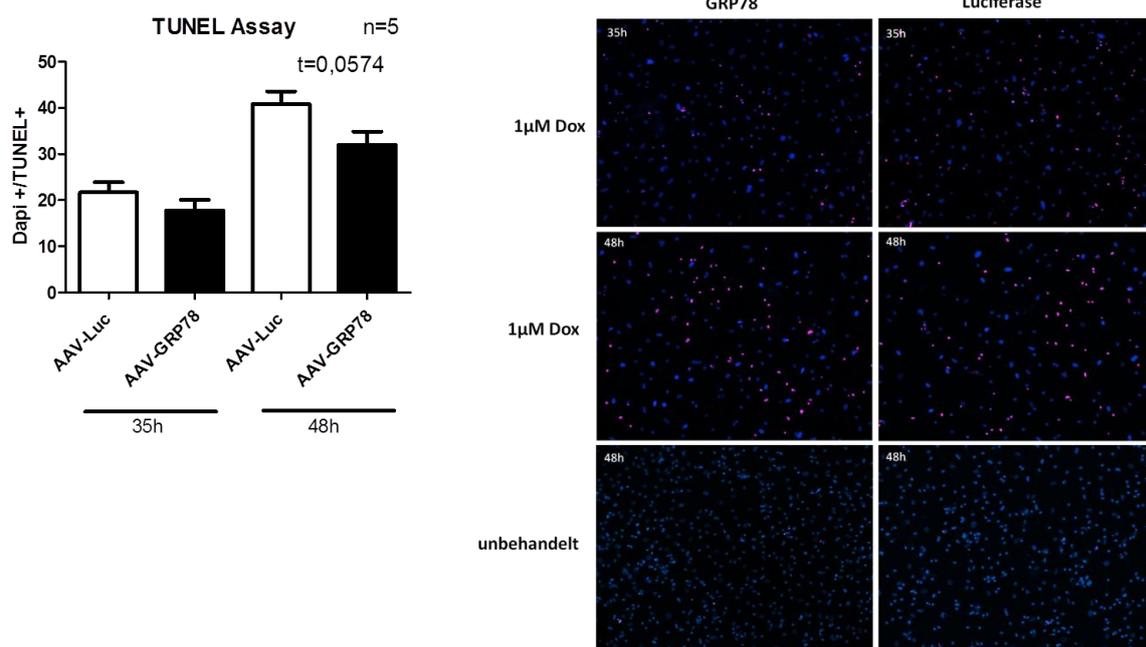


Abbildung 3.4.5: Einfluß der GRP78 Überexpression auf den Prozentsatz TUNEL positiver Zellen nach Doxorubizinbehandlung. Links: Graphische Darstellung des Prozentsatzes an TUNEL positiven Zellen gegenüber DAPI positiven Zellkernen 35h und 48h nach Behandlung mit 1 μ M Doxorubizin. Die Inkubation mit AAV-GRP78 bzw. AAV-Luc erfolgte 2 Tage vor der Doxorubizinbehandlung. Zur Auswertung wurden 8-10 Bilder mit 200x Vergrößerung randomisiert aufgenommen und mit Image J ausgezählt. Durch die Behandlung mit AAV-GRP78 zeigte sich ein positiver Trend zu weniger TUNEL positiven Zellen. Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test. Rechts: Exemplarische Darstellung der ausgewerteten Fluoreszenzbilder von 5 Versuchen. GRP78: Behandlung mit AAV-GRP78 2 Tage vor Doxorubizingabe. Luc: Behandlung mit AAV-Luc 2 Tage vor Doxorubizinbehandlung. Die Behandlung (1 μ M Doxorubizin bzw. nur Medium (unbehandelt)) erfolgte für den angegebenen Zeitraum. TUNEL positive Zellen sind in rot, die DAPI gefärbten Nuklei in blau dargestellt.

Es konnte also erstmals gezeigt werden, dass die Überexpression von GRP78 im Zusammenhang mit der Doxorubizinkardiotoxizität zu einer deutlich verringerten Caspase3-Aktivierung und einer verringerten Anzahl apoptotischer Zellen führt. Eine Untersuchung der durch Doxorubizin induzierten potenziell apoptotischen Signalwege sollte nun Hinweise auf mögliche Mechanismen dieses antiapoptotischen Effekts liefern.

3.4.3 Molekulare Ursachen des therapeutischen Effekts

Die zytotoxische Aktivität von Doxorubizin wird vor allem mit der DNA Schädigung durch Hemmung der Topoisomerasell in Zusammenhang gebracht, aber auch eine Dysregulation des Ca^{2+} -Gehalts und eine primäre oder sekundäre Bildung von ROS können Apoptose in Kardiomyozyten auslösen (siehe Kapitel 1.2 der Einleitung). Analog zu der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Charakterisierung der Doxorubizineffekte wurde daher die Bildung von ROS, sowie mögliche Veränderungen der Expression von p53 und der Phosphorylierung von PLN und CaMKII durch GRP78 untersucht.

3.4.3.1 Der oxidative Stress wird durch GRP78 nicht beeinflusst

Wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben konnte im *in vitro* Versuchsmodell eine erhöhte Bildung von ROS durch Doxorubizin nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine Untersuchung der H_2O_2 -Level im Zusammenhang mit dem antiapoptotischen Effekt von GRP78 bestätigte dies noch einmal. Obwohl nach 24h bereits vermehrter Zelltod im ToxiLight Assay und eine vermehrte Caspase3-Spaltung gezeigt werden konnten, konnte keine Änderung der H_2O_2 -Level durch die Doxorubizinbehandlung festgestellt werden (Abbildung 3.4.6). Auch die basalen H_2O_2 Level wurden durch die GRP78 Überexpression nicht signifikant verändert.

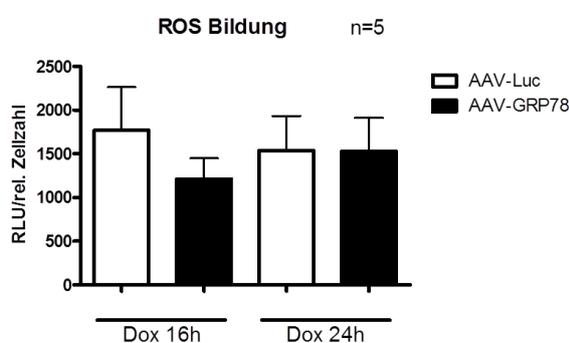


Abbildung 3.4.6: Bildung von H_2O_2 nach Doxorubizinbehandlung mit und ohne GRP78 Überexpression. Die Inkubation mit AAV-Luc (weiß) bzw. AAV-GRP78 (schwarz) erfolgte 2 Tage vor der Behandlung der NRVCN mit $1\mu\text{M}$ Doxorubizin für den angegebenen Zeitraum. Die Bildung von H_2O_2 wurde im Überstand mit Hilfe des ROS-Glo Assays gemessen und dann auf die Zellzahl normiert. Weder Virusbehandlung noch Doxorubizinbehandlung veränderten die Bildung von H_2O_2 . Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test.

Zumindest in dem in dieser Arbeit untersuchten Modell ist demnach kein relevanter Einfluß von Doxorubizin auf die ROS zu beobachten.

3.4.3.2 Die GRP78 Überexpression verringert die durch Doxorubizin ausgelöste Induktion von p53

Die Induktion von p53 scheint eine der ersten Veränderungen nach der Doxorubizinbehandlung zu sein (siehe Kapitel 3.2.3.). Es wurde daher untersucht, inwieweit die Überexpression von GRP78 bereits diesen Effekt der Doxorubizintoxizität beeinflusst. Dafür wurde der Zeitpunkt 24h herangezogen, da er das Maximum der p53 Expression umfasst und bereits eine Erhöhung der Caspase3 Spaltung zu erkennen ist. Der Zeitpunkt 0h wurde betrachtet, um den Status der Zellen beim Start der Doxorubizinbehandlung zu zeigen, da sich die vorhergehende Virusbehandlung allein schon auf die p53Level auswirken könnte. Dies war allerdings nicht der Fall (Abbildung 3.4.7)

Im Versuch stiegen die p53 Level in den mit AAV-Luc behandelten Proben zwischen 0h und 24h signifikant um das 22 fache an (Abbildung 3.4.7 unten). Durch die Überexpression von GRP78 konnte dieser Anstieg signifikant um 39% verringert werden. Dies korreliert gut mit der Caspase3-Aktivierung, bei der mit GRP78 Überexpression ebenfalls eine Reduktion der Level an gespaltener Caspase3 um 45% zu sehen war.

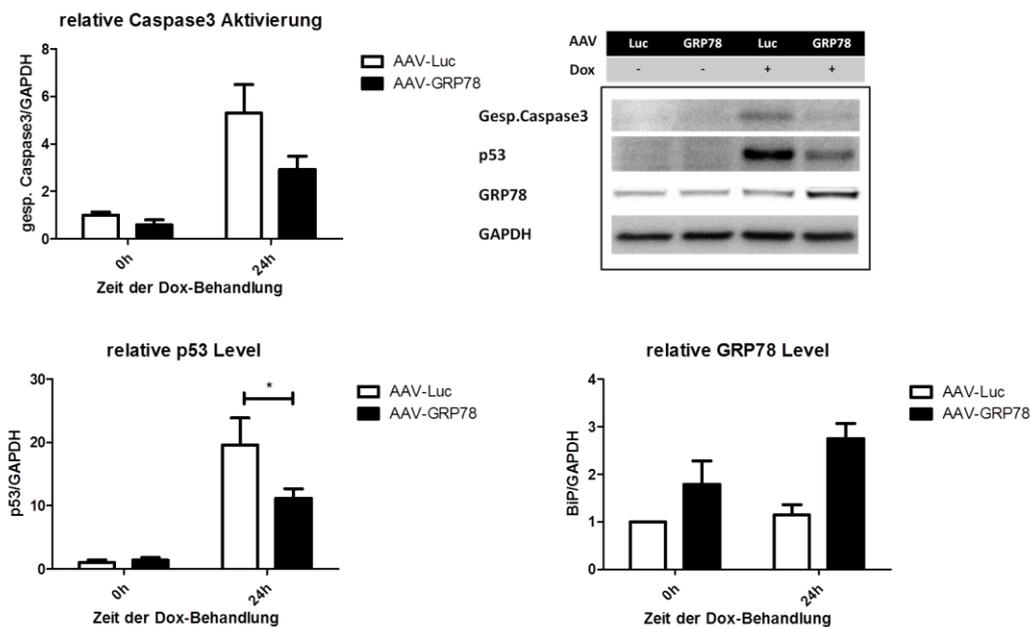


Abbildung 3.4.7: Veränderungen der Aktivierung von Caspase3 und der Expression von p53 im Zusammenhang mit der Überexpression von GRP78. NRVCN wurden 2 Tage mit AAV-Luc (weiß) bzw. AAV-GRP78 (schwarz) inkubiert und dann die Behandlung mit 1 μ M Doxorubizin für 24h durchgeführt. Die Normierung erfolgte auf Proben ohne Doxorubizinbehandlung zum Zeitpunkt 0h. Durch die GRP78 Überexpression ließen sich die Doxorubizin induzierte Caspase-Aktivierung und die p53 Akkumulation signifikant reduzieren. Zeitpunkt 0h n=3; Zeitpunkt 24h n=5. Statistik: Two way ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* P<0,05). Rechts oben: Repräsentativer Western Blot der Veränderungen auf Proteinebene. Die Proteinexpression wurde auf die Expression von GAPDH normiert.

Diese Auswirkungen der GRP78 Überexpression auf die p53 Akkumulation könnte den antiapoptotischen Effekt schon erklären. Dennoch können auch noch andere Mechanismen, wie die Ca²⁺-Homöostase, eine Rolle in der protektiven Wirkung von GRP78 spielen.

3.4.3.3 Die GRP78 Überexpression beeinflusst die Aktivierung von CaMKII

Wie in Kapitel 3.2.3 gezeigt induziert Doxorubizin in NRVCN neben der Akkumulation von p53 auch die Phosphorylierung von PLN und CaMKII. PLN als Indikator der Ca^{2+} abhängigen CaMKII-Aktivität wird parallel zur p53 Akkumulation stark phosphoryliert, während die Autophosphorylierung der CaMKII 24h später auftritt. Die Versuche zur GRP78 Überexpression zeigten, dass die durch Doxorubizin induzierte PLN Phosphorylierung nach 24h fast komplett aufgehoben werden (Abbildung 3.4.8 und Abbildung 3.1.1). Es handelte sich dabei um einen alleinigen Effekt auf den Phosphorylierungsstatus, da sich die Gesamtmenge an PLN weder durch die Doxorubizinbehandlung noch die Virusbehandlung veränderte.

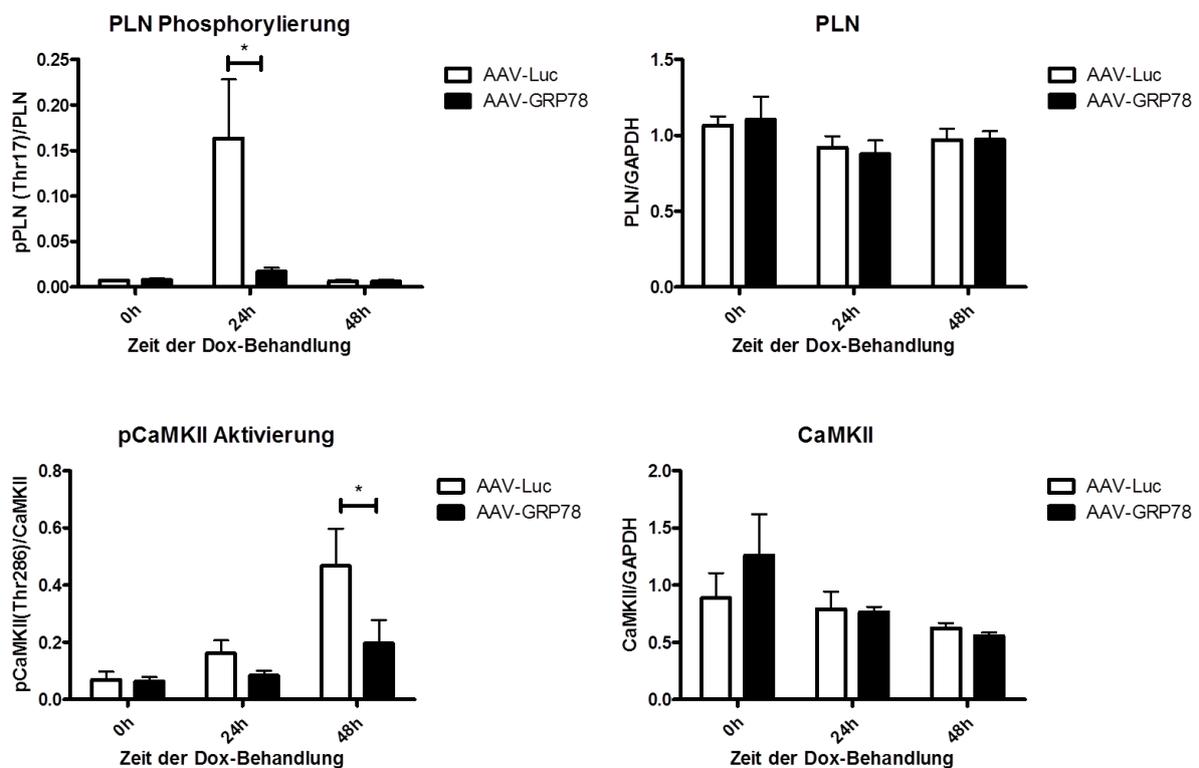


Abbildung 3.4.8: Phosphorylierung der Regulatoren der Ca^{2+} -Homöostase PLN, und CaMKII. NRVCN wurden 2 Tage mit AAV-Luc- bzw, AAV-GRP78 inkubiert. Dann erfolgte die Behandlung mit $1\mu M$ Doxorubizin für die angegebenen Zeiten. Die Quantifizierung der Phosphorylierung erfolgte im Western Blot durch Detektion mit einem phosphosensitiven Antikörper und einem nicht phosphosensitiven Antikörper. Rechts: Expressionsniveau von PLN und CaMKII ohne Berücksichtigung der Phosphorylierung. Die Überexpression von GRP78 reduzierte die im Rahmen der Doxorubizinbehandlung auftretende Phosphorylierung von PLN und CaMKII. Die Gesamtproteinlevel wurden durch Doxorubizin nicht verändert. Für die Normierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen. Statistik: Two way ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* $P < 0,05$).

Ähnlich verhält es sich bei der zeitlich darauf folgenden CaMKII Autophosphorylierung. Die über den Zeitverlauf von 48h graduell ansteigende CaMKII Phosphorylierung konnte durch die GRP78 Überexpression um 57% Prozent reduziert werden. Auch hier war kein signifikanter Einfluss von Doxorubizin- oder Virusbehandlung auf die gesamten CaMKII Expressionslevel zu erkennen (Abbildung 3.4.8 rechts).

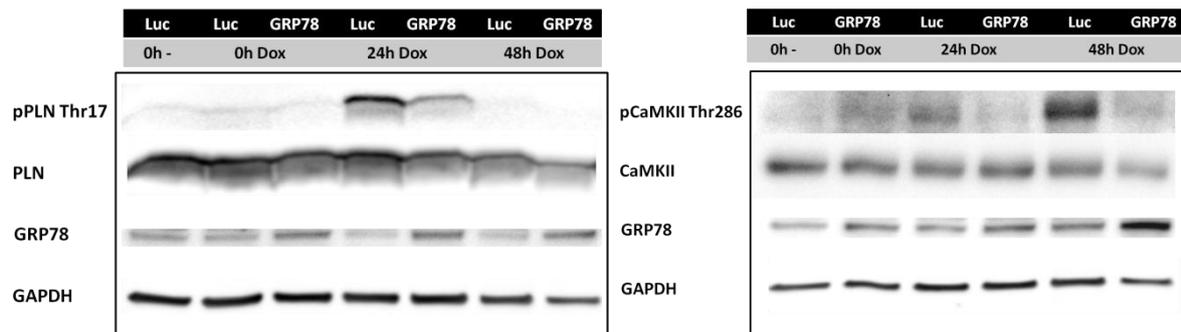


Abbildung 3.4.9: Exemplarische Western Blots zu den in Abbildung 3.4.8 dargestellten Ergebnissen. Gezeigt ist die Expression von Phospholamban (PLN), pPLN(Thr17), Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase (CaMKII), pCaMKII(Thr286) und GRP78 zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Doxorubizinbehandlung. GRP78: Behandlung mit AAV-GRP78 2 Tage vor Doxorubizingabe; Luc: Behandlung mit AAV-Luc 2 Tage vor Doxorubizingabe. Zum Vergleich ist eine mit AAV-Luc aber nicht mit Doxorubizin behandelte Probe des Zeitpunktes 0h mit aufgetragen. Für die Normierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen.

Die GRP78 Überexpression verhindert also die im Rahmen der Doxorubizintoxizität nach 24h auftretende Aktivierung der CaMKII und die damit verbundene Phosphorylierung von PLN. Gleichzeitig wird auch die darauf folgende Autophosphorylierung und damit die autonome Aktivität der CaMKII durch die GRP78 Überexpression reduziert.

Es konnte somit gezeigt werden, dass durch die Überexpression von GRP78 mit p53 und CaMKII die zentralen Regulatoren zweier potenziell apoptotischer Signalwege inhibiert werden, die beide in der Doxorubizinkardiotoxizität aktiviert sind. Eine GRP78 Überexpression ist also protektiv und führt *in vitro* zu einer verringerten Apoptose. Das tatsächliche therapeutische Potenzial kann allerdings nur *in vivo* getestet werden.

3.5 Untersuchung der GRP78 Überexpression im *in vivo* Modell der Doxorubizin Kardiotoxizität

Gegenüber dem *in vitro* Modell der Doxorubizinkardiotoxizität hat das *in vivo* Modell den Vorteil, dass nur so der Effekt unter funktionellen Gesichtspunkten und im physiologischen Zusammenhang untersucht werden kann. Insbesondere lassen sich die Auswirkung auf die Sterblichkeit und kontraktile Parameter als Maßstab für eine durch Doxorubizin verursachte Kardiomyopathie untersuchen.

Für die Untersuchung wurden männlichen C57/Bl6 Mäusen $3 \cdot 10^{12}$ Virusgenome (entweder AAV9-Luc oder AAV9-GRP78) über die Schwanzvene injiziert. Die Doxorubizinbehandlung wurde 3 Wochen später gestartet, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. 27h nach der letzten Injektion wurde allen Tieren Blut entnommen um mit den Levels des kardialen Zelltodmarkers hsTnT ein Korrelat für den Untergang von Kardiomyozyten zu bestimmen. Außerdem wurde eine Überlebenskurve erstellt. Von den überlebenden Tieren wurden die kontraktile Parameter durch Echokardiographie und Aufzeichnung der intraventrikulären Druck-Volumen-Kurven bestimmt. Die GRP78 Expression wurde durch Western Blotting überprüft.

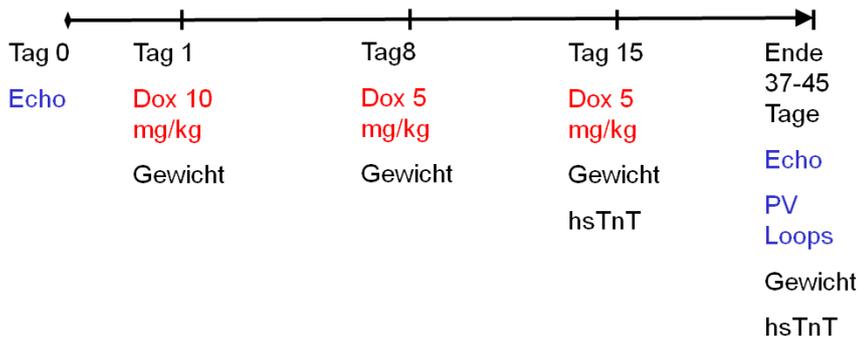


Abbildung 3.5.1: Übersicht über das *in vivo* Modell der Doxorubizin induzierten Kardiotoxizität. Verwendet wurden 7 Wochen alte männliche C57/Bl6JN Mäuse. Die Virusbehandlung erfolgte 3 Wochen vor Tag 0 mit $3 \cdot 10^{12}$ Virusgenomen i.v. über die Schwanzvene. 10 bzw. 5 mg/kg frisch angesetztes Doxorubizin wurden einmal pro Woche i.p. injiziert. Am Versuchsende erfolgte eine echokardiographische Untersuchung, sowie die Aufzeichnung intraventrikulärer Druck/Volumen-Kurven mittels Katheter.

Der AAV9 vermittelte Gentransfer führte zu einer 2-5 fachen Überexpression von GRP78 gegenüber den mit AAV-Luc behandelten Kontrolltieren. Mit dem Hintergrund der *in vitro* Ergebnisse zur Dosisabhängigkeit des protektiven Effekts von GRP78 wurden Tiere mit einer GRP78 Expression ausgeschlossen, die das 4 fache der Expression in den nicht Doxorubizin behandelten Kontrolltiere überschritt. Der Wert wurde hier höher angelegt, da unter Annahme eines antiapoptotischen Effekts über den langen Zeitraum eine Anreicherung GRP78 exprimierender Zellen nach Doxorubizinbehandlung zu erwarten ist. In der Tat war die GRP78 Expression in den Doxorubizin behandelten Tieren gegenüber den mit AAV-GRP78 und NaCl behandelten Tieren trotz gleicher Virusmenge um ca. 30% erhöht (Abbildung 3.5.2). Bei den Luciferase-behandelten Tieren war für diesen Zeitpunkt keine Veränderung der GRP78 Expression festzustellen.

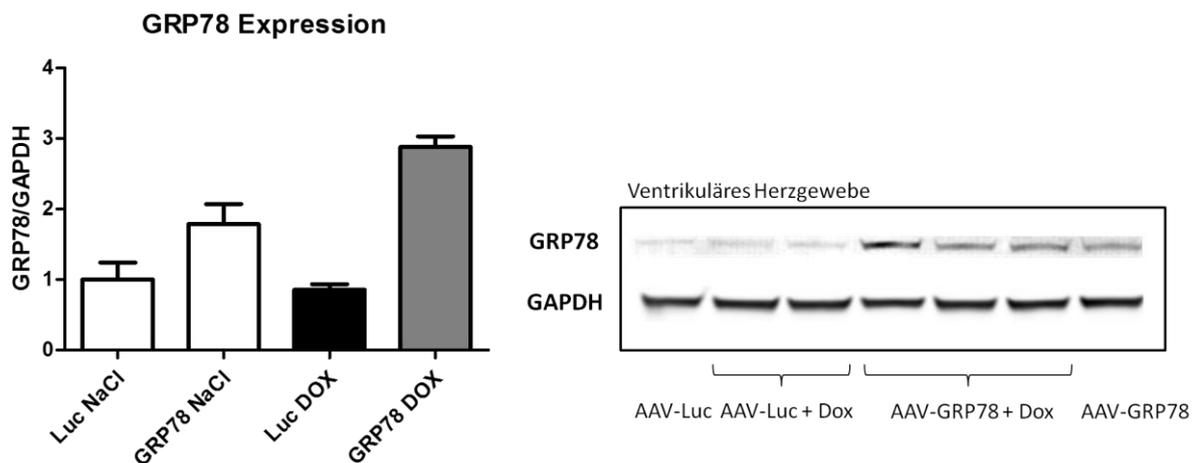


Abbildung 3.5.2: GRP78 Proteinexpression am Versuchsende ca. 45 Tage nach der ersten Doxorubizininjektion. Männlichen C57/Bl6 Mäusen wurden $3 \cdot 10^{12}$ Virusgenome über die Schwanzvene injiziert. Nach 3 Wochen erfolgte die Behandlung mit insgesamt 20 mg/kg Doxorubizin (schwarz/grau) bzw. dem gleichen Volumen NaCl (weiß). Die GRP78 Expression im Myokardgewebe wurde im Western Blot durch Detektion mit einem GRP78 Antikörper bestimmt. Zur Normierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen. Durch die Behandlung mit AAV-GRP78 ließ sich eine 2 bis 3 fache Überexpression von GRP78 gegenüber den Luciferasetieren erreichen.

Durch den AAV-vermittelten Gentransfer ließ sich also eine ausreichende Überexpression von GRP78 im Ventrikel erzielen, so dass die Effekte einer Überexpression auch *in vivo* untersucht werden konnten.

3.5.1 GRP78 schützt Kardiomyozyten vor Doxorubizinkardiotoxizität *in vivo*

Analog zu den *in vitro* Versuchen mit NRVCN ist zu erwarten, dass auch *in vivo* das Zellsterben früh und innerhalb der ersten 2 Tage nach Doxorubizininjektion auftritt. Daher wurden 27h nach der letzten Injektion Blutproben genommen und die Level des hsTnT im Plasma bestimmt. Die Konzentration des hsTnT im Plasma stieg bei den mit Luciferase und Doxorubizin behandelten Tieren um das 4 fache gegenüber unbehandelten Kontrolltieren an. Durch die Überexpression von GRP78 konnte dieser Anstieg um ca. 25% reduziert werden (Abbildung 3.5.3 Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.).

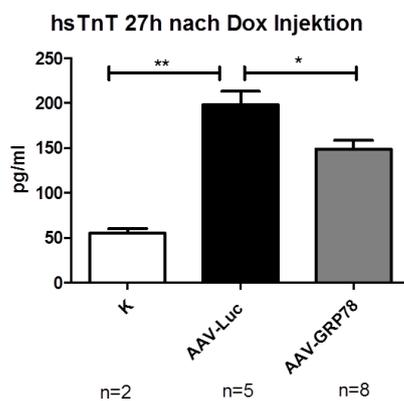


Abbildung 3.5.3: Level des myokardialen Zelltodmarkers hsTnT im Plasma 27h nach Injektion von 5mg/kg Doxorubizin. Es handelte sich um die letzte von drei Injektionen, mit der eine kumulative Dosis von 20 mg/kg erreicht wurde. K: mit NaCl behandelte Kontrollgruppe; AAV- Luc: Mit AAV-Luc und Doxorubizin behandelte Gruppe; AAV-GRP78: Mit AAV-GRP78 und Doxorubizin behandelte Gruppe. Die Behandlung mit Doxorubizin führte zu einer Erhöhung der hsTnT Level im Plasma, die durch GRP78 Überexpression reduziert werden konnte. Statistik: One-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* $P < 0,05$).

Die GRP78 Überexpression verhindert als nicht nur *in vitro* die Apoptose, auch *in vivo* lässt sich der Untergang von Kardiomyozyten reduzieren. Die Frage ist, ob sich der protektive Effekt auch in der Herzfunktion und dem Überleben niederschlägt.

3.5.2 Die Überexpression von GRP78 verbessert Überleben und kontraktile Parameter nach Doxorubizinbehandlung

Als allgemeines Maß für die Toxizität von Doxorubizin wird häufig die Abnahme des Körpergewichts herangezogen. Die Behandlung der Mäuse mit einer kumulativen Doxorubizindosis von 20mg/kg führte zu einer Körpergewichtsabnahme um 14%. Auf diesen, nicht spezifisch kardialen Parameter hatte die GRP78 Überexpression keinen Einfluss (Abbildung 3.5.4). Anders sieht das bei der Betrachtung des Überlebenszeitraums nach Start der Doxorubizinbehandlung aus. Die virale Überexpression der Luciferase und von GRP78 an sich hatte keinen negativen Effekt auf das Überleben. Keines der mit NaCl behandelten

Kontrolltiere verstarb bis zum Versuchsende. Dagegen traten 20 Tage nach Injektion der ersten Doxorubizindosis bei den mit AAV-Luciferase und Doxorubizin behandelten Tieren die ersten Todesfälle auf (Abbildung 3.5.4). Auch hier zeigte sich die GRP78 Überexpression protektiv. Erst nach ca. 34 Tagen setzte in der mit GRP78 und Doxorubizin behandelten Gruppe eine deutliche Erhöhung der Zahl der Todesfälle ein. Die GRP78 Überexpression führte somit zu einem signifikant verlängerten Überleben.

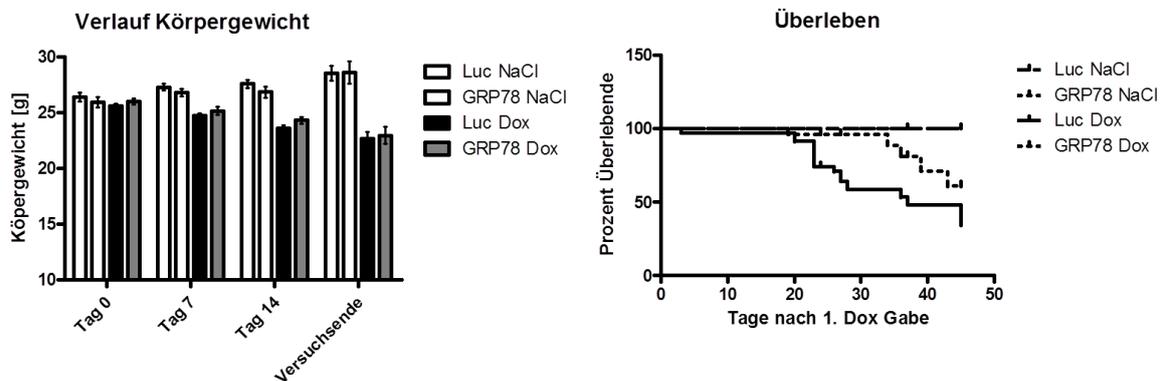


Abbildung 3.5.4: Verlauf des Körpergewichts und des Überlebens während der Behandlung mit einer kumulativen Doxorubizindosis von 20 mg/kg. Links: Das Körpergewicht wurde vor jeder Doxorubizininjektion und am Versuchsende bestimmt. 3 Wochen vor Start der Behandlung mit Doxorubizin (schwarz/grau) bzw. NaCl (weiß) wurden die Mäuse mit $3 \cdot 10^{12}$ Virusgenome AAV-Luc (Luc) bzw. AAV-GRP78 (GRP78) i.v. injiziert. Im Verlauf des Körpergewichts zeigte sich kein Unterschied zwischen den Luciferase und den GRP78 behandelten Gruppen. Die Gewichtsabnahme der mit Doxorubizin injizierten Tiere war signifikant. Luc NaCl n=12; GRP78 NaCl n=12; Luc Dox n=30; GRP78 Dox n=30. Statistik: Two-way-ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test. Rechts: Während des Versuches wurde der Überlebenszeitraum der einzelnen Tiere aufgezeichnet und eine Überlebenskurve erstellt. Die GRP78 Überexpression verlängerte das Überleben nach der Doxorubizinbehandlung signifikant gegenüber den mit Luciferase behandelten Tieren. Luc NaCl n=10; GRP78 NaCl n=10; Luc Dox n=29; GRP78 n=25 Statistik: Gehan-Breslow-Wilcoxon Test (P= 0,0391).

Um den tatsächlichen Einfluß der GRP78 auf die Ausbildung der Doxorubizinkardiomyopathie zu untersuchen erfolgte eine Evaluation der Herzfunktion durch Echokardiographie. Leider konnte die in den Etablierungsversuchen beobachtete Verringerung der Ejektionsfraktion durch die Doxorubizinbehandlung nicht reproduziert werden. Bei der Betrachtung der Ejektionsfraktion war kein Unterschied zwischen Luciferase injizierten Tieren mit und ohne Doxorubizinbehandlung zu verzeichnen, dafür jedoch eine Verschlechterung der mit GRP78 und Doxorubizin behandelten Tiere. Zur weiteren Evaluierung und Analyse dieses Ergebnisses wurden die Verkürzungsfraction (FS) und die katheterbasierte Bestimmung der Ejektionsfraktion als unabhängig gewonnene Parameter herangezogen. Hier konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Zwischen den unterschiedlichen behandelten Gruppen kam es somit zu keiner aussagekräftigen reproduzierbaren Änderung der globalen Herzfunktion (Abbildung 3.5.5).

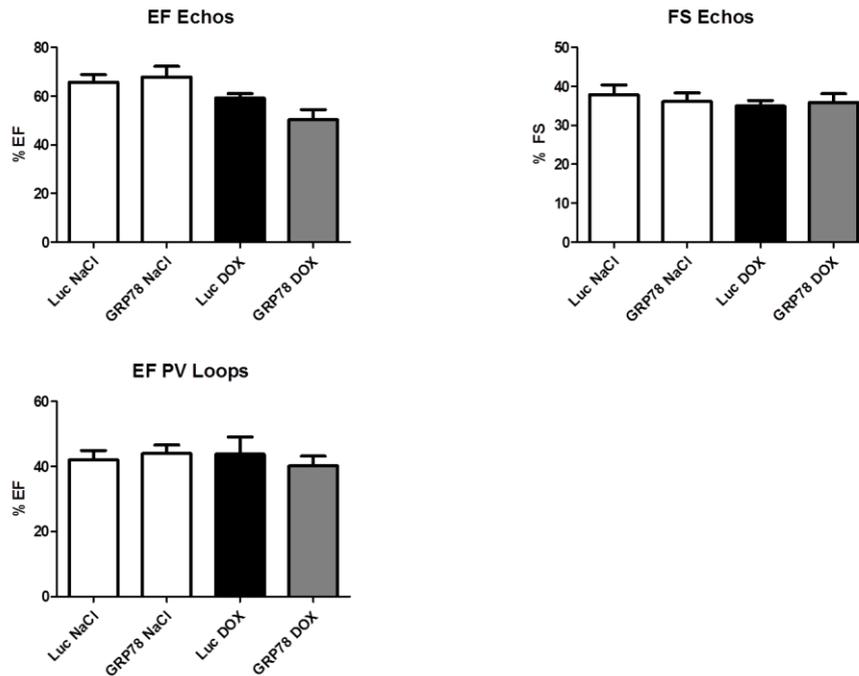


Abbildung 3.5.5: Einfluß der GRP78 Überexpression auf Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion *in vivo*. Oben Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) und Verkürzungsfraktion (FS) aus der echokardiographischen Bestimmung im wachen Zustand. Für die EF wurden pro Tier eine, für die FS 5 Kontraktionen ausgewertet. Die Werte wurden am Versuchsende ca. 45 Tage nach Behandlung mit einer kumulativen Gesamtdosis von 20 mg/kg Doxorubizin (grau/schwarz) bzw. dem gleichen Volumen NaCl (weiß) bestimmt. Vor Start der jeweiligen Behandlung wurden $3 \cdot 10^{12}$ Virusgenome AAV-Luc (schwarz) bzw. AAV-GRP78 (grau) über die Schwanzvene injiziert. Unten: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) in denselben Tieren, bestimmt über intraventrikuläre Druck-Volumenmessung unter i.p. Narkose. Es wurden pro Tier mind. 8 Kurven mit der besten Katheterposition ausgewertet. Gruppengrößen: Luc NaCl n=5; GRP78 NaCl n=5; Luc Dox n=12; GRP78 Dox n=13. Statistik: One-way ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test.

Daraufhin wurde als sensitiverer Parameter der Herzfunktion die maximale und minimale intraventrikuläre Druckänderungsrate aus den Kathetermessungen herangezogen. Hier war nach Behandlung mit Doxorubizin in der Luciferase behandelten Gruppe eine signifikante Verschlechterung sowohl des systolischen Parameters (der maximalen Druckänderungsrate bei der Kontraktion) als auch des diastolischen Parameters (der minimalen Druckänderungsrate in der Relaxation) zu beobachten.

Durch die GRP78 Überexpression zeigte sich bei dem systolischen Wert ein positiver Trend hin zu einer verbesserten Funktion. Statt einer Verringerung der maximalen Druckänderungsrate um 28% in der Luciferasegruppe reduzierte sie sich in der GRP78 behandelten Gruppe nur um 14%. Noch positiver fiel das Ergebnis bei der Betrachtung des diastolischen Parameters aus. Die in der Luciferasegruppe durch Doxorubizin induzierte Veränderung der minimalen Druckänderungsrate um 31% konnte durch die GRP78 Überexpression mit Abfall um nur 9% fast komplett verhindert werden (Abbildung 3.5.6).

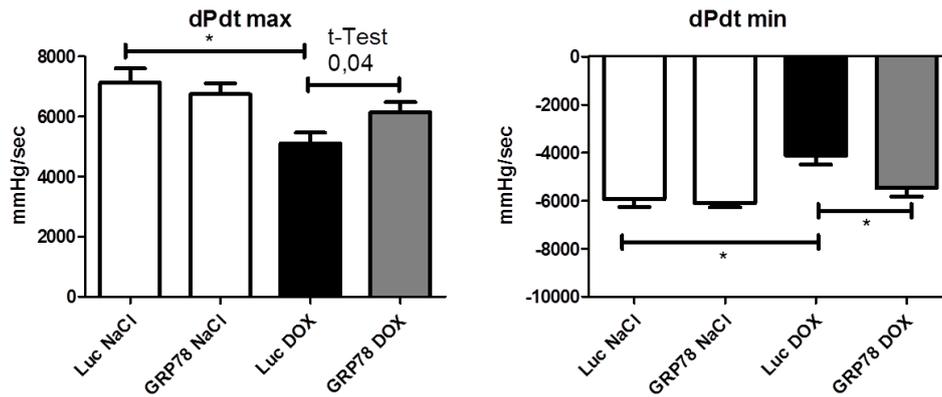


Abbildung 3.5.6: Einfluß der GRP78 auf sensitivere Parameter der Herzfunktion *in vivo*. Maximale und Minimale Druckänderungsraten (dPdt max bzw. dPdt min) am Versuchsende ca. 45 Tage nach Behandlung mit einer kumulativen Gesamtdosis von 20 mg/kg Doxorubizin (grau/schwarz) bzw. dem gleichen Volumen NaCl (weiß). Vor Start der jeweiligen Behandlung wurden $3 \cdot 10^{12}$ Viruspartikel AAV-Luc bzw. AAV-GRP78 über die Schwanzvene injiziert. Die Druckänderungsraten wurden über intraventrikuläre Druck-Volumenmessungen gewonnen. Es wurden pro Tier mindestens 8 Kurven mit der besten Katheterposition ausgewertet.

Gruppengrößen: Luc NaCl n=9; GRP78 NaCl n=10; Luc Dox n=14; GRP78 Dox n=15. Statistik: One-way ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* P<0,05).

Neben der minimalen Druckänderungsrate konnten außerdem positive Effekte auf einen weiteren Parameter der Relaxation ausgemacht werden. Der Parameter Tau gibt die Zeit für eine Halbmaximale Druckänderung an und ist nach Doxorubizinbehandlung in der Luciferasegruppe signifikant um 70% erhöht. Dies entspricht einer verlangsamteten Relaxation des Ventrikels in der Diastole. Auch hier zeigte sich mit der GRP78 Überexpression eine Normalisierung und Reduktion des Anstiegs von Tau um 28%.

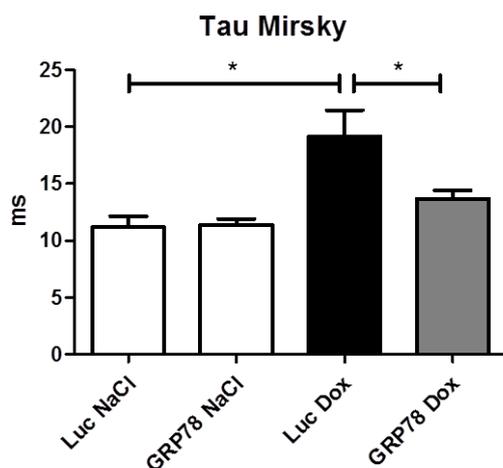


Abbildung 3.5.7: Veränderung des Relaxationsparameters Tau Mirsky. Der Parameter Tau wurde über intraventrikuläre Druck-Volumenmessung ca. 45 Tage nach Behandlung von C57/Bl6 Mäusen mit einer kumulativen Gesamtdosis von 20 mg/kg Doxorubizin (grau/schwarz) bzw. dem gleichen Volumen NaCl (weiß) gewonnen. Vor Start der jeweiligen Behandlung wurden $3 \cdot 10^{12}$ Virusgenome AAV-Luc (schwarz) bzw. AAV-GRP78 (grau) über die Schwanzvene injiziert. Es wurden pro Tier mind. 8 Kurven mit der besten Katheterposition ausgewertet. Gruppengrößen: Luc NaCl n=8; GRP78 NaCl n=9; Luc Dox n=6; GRP78 Dox n=6. Statistik: One-way ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test (* P<0,05).

Somit zeigte sich auch im *in vivo* Modell der Doxorubizinkardiotoxizität die protektive Wirkung einer GRP78 Überexpression, ausgedrückt durch ein verlängertes Überleben der Tiere und eine verbesserte Relaxation des linken Ventrikels in Verbindung mit reduziertem Untergang von Kardiomyozyten.

4 Diskussion

Die Anwendung des Chemotherapeutikums Doxorubizin wird durch eine mit der kumulativen Gesamtdosis korrelierenden Gefahr der Ausbildung einer Kardiomyopathie eingeschränkt. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass das ER Chaperon GRP78 mit der Resistenzausbildung einiger Tumoren gegen eine Doxorubizinbehandlung in Verbindung gebracht wird. Eine GRP78 Überexpression zeigte sich dementsprechend in immortalisierten Zelllinien bereits als protektiv im Zusammenhang mit einer Anthrazyklinbehandlung [64]. Allerdings folgte noch keine Übertragung dieser Erkenntnisse in den kardialen Bereich, insbesondere mit der Untersuchung der Effekte einer GRP78 Überexpression *in vivo*. Dies ist besonders deshalb relevant, weil kardiale Nebenwirkungen ein Hauptproblem der Anthrazyklin-basierten Chemotherapie darstellen. In dieser Arbeit sollte daher das therapeutische Potenzial einer kardialen Gentherapie mit GRP78 in einem klinisch relevanten Modell getestet werden und Hinweise auf mögliche protektive Mechanismen gewonnen werden. Eine Gentherapie hätte gegenüber vielen anderen Therapeutika den Vorteil, dass durch die Kombination eines Virus mit einem gewebespezifischen Promotor eine gezielte Therapie der Kardiomyozyten möglich ist. Der Tumor wird nicht erreicht. Dies ist mit systemisch applizierten Therapeutika nicht möglich.

4.1 Einordnung der Relevanz der gewählten Modelle

Die Ursachen der durch Doxorubizin ausgelösten toxischen Wirkung und der damit verbundenen Ausbildung einer Kardiomyopathie sind schon lange Gegenstand intensiver Forschungen. Erst langsam wächst das Verständnis für die molekularen Vorgänge, die die Toxizität hervorrufen. Grund dafür sind unter anderem unterschiedliche Versuchsaufbauten und Doxorubizin-Dosen, die in den Experimenten verwendet werden [80]. Denn die Aktivierung unterschiedlicher zytotoxischer Signalwege hängt durchaus auch von der gewählten Dosis abhängig [81]. Im Folgenden sollen daher die in dieser Arbeit untersuchten Modelle bezüglich ihrer Relevanz und Vergleichbarkeit eingeordnet werden.

Im Patienten wurden Doxorubizin-Plasma-Spitzenkonzentrationen von ca. 200µg/L (0,5µM) gemessen [82]. Diese liegt geringfügig niedriger als die in dieser Arbeit *in vitro* verwendete Konzentration von 1µM. Es darf allerdings nicht vergessen werden, dass Patienten bei mehrmaliger Behandlung noch unterhalb der kumulativen Dosis von 500 mg/m² liegen sollten. Im Vergleich zu anderen publizierten *in vitro* Studien liegt die verwendete Dosis im Mittelfeld. Die gebräuchlichen Dosen reichen von 0,1 bis 20µM. Für die Auswahl war die Vergleichbarkeit mit den klinischen Plasmaleveln relevant und, dass sich der Zelltod *in vitro* innerhalb von 24h induzieren ließ. Dies war bei 0,5µM und 1µM der Fall.

Die für die *in vivo* Versuche verwendete kumulative Dosis von 20 mg/kg ist eine im Mausmodell häufig verwendete Konzentration, mit der sich in der Regel unabhängig vom Gabeschema eine Herzinsuffizienz mit verringerter Ejektionsfraktion produzieren lässt [83, 84]. Im Kaninchenmodell mit einer kumulativen Doxorubizin-Gesamtdosis von 12-18 mg/kg i.p. lag die Konzentration im Ventrikel bei ungefähr 1µM [85]. Es ist also zu erwarten, dass sich im Mausmodell die ventrikuläre Konzentration in einem ähnlichen Bereich befindet. Die zwei in dieser Arbeit untersuchten Modelle sollten sich also bezüglich der verwendeten Doxorubizindosis ähneln und bewegen sich nur leicht über dem Rahmen einer klinisch verwendeten Dosierung. Dennoch waren die durch Doxorubizin im *in vivo* Mausmodell induzierten kardialen Effekte relativ schwach, sodass die tatsächlich Doxorubizinkonzentration im Ventrikel wohl unter 1µM lag.

4.2 Doxorubizin induzierte Effekte *in vivo* und *in vitro*

Zunächst wurde untersucht, ob das *in vivo* und das *in vitro* Modell die Doxorubizinkardiotoxizität hinsichtlich einer ventrikulären Dysfunktion und der Induktion von Zelltod abbilden. Wie in der Einleitung dargelegt, wird die Doxorubizinkardiotoxizität mit einer Vielfalt an Mechanismen in Verbindung gebracht. Diskutiert werden eine mitochondriale Dysfunktion mit der Bildung von ROS, Änderungen der Ca²⁺-Homöostase und DNA Schädigung. All diese Mechanismen sind eng mit der Aktivierung von Apoptose aber auch untereinander verknüpft [siehe Kapitel 1.2 der Einleitung]. Daher wurden neben der Aktivierung von Apoptose auch gezielt die durch Doxorubizin induzierten Veränderungen dieser Signalwege in NRVCN untersucht.

4.2.1 Doxorubizin induziert Apoptose in Verbindung mit einer kontraktile Dysfunktion

Klinisch zeigt sich die Doxorubizintoxizität durch die Ausbildung einer Herzinsuffizienz mit verringerter Ejektionsfraktion [6]. Bei der Etablierung spiegelte das Mausmodell dieses Charakteristikum einer Kardiomyopathie wider. 3 Wochen nach Start der Doxorubizinbehandlung wurde mit einer kumulativen Dosis von 20 mg/kg eine signifikante Verringerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion festgestellt. Diese Dosis zeigte sich in vielen unterschiedlichen Modellen als ausreichend um eine verlässliche Doxorubizinkardiomyopathie zu induzieren [86, 87]. Im Therapieversuch mit der GRP78 Überexpression konnte die Änderung der Ejektionsfraktion allerdings nicht reproduziert werden. Es war jedoch eine signifikante Verschlechterung der systolischen und diastolischen Druckänderungsraten zu verzeichnen. Die Erhöhung des Parameters Tau, der die Relaxation des Ventrikels beschreibt, spricht insbesondere für eine diastolische Insuffizienz. Dies deutet darauf hin, dass bei diesem Versuch ein frühes, noch kompensiertes Stadium der Doxorubizinkardiomyopathie abgebildet ist. Zu einem ähnlichen Schluß kamen auch Schmitt

et al., die zeigen konnten, dass eine diastolische Dysfunktion ein frühes, schon bei geringen Doxorubizindosen auftretendes Ereignis ist, das der systolischen Dysfunktion mit einer verringerten Ejektionsfraktion vorausgeht [88].

Mögliche Ursachen einer ventrikulären Dysfunktion sind vielfältig. Im Falle von Doxorubizin wird insbesondere der Untergang von Kardiomyozyten dafür verantwortlich gemacht [89]. Im *in vivo* Mausmodell konnte, durch erhöhte Level des kardialen Zelltodmarkers Troponin T (hsTnT), 27h nach Doxorubizininjektion ein signifikanter Untergang von Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Selbst am Versuchsende nach 21 Tagen waren die hsTnT Werte im Vergleich zu NaCl behandelten Kontrolltieren noch leicht erhöht.

Auch nach der Behandlung von NRVCN mit 1µM Doxorubizin trat nach 24h (ToxiLight Assay) bzw. 48h (Caspase3-Spaltung) eine starke Aktivierung des Zelltodes auf. Zu beiden Zeitpunkten war auch im TUNEL Assay eine hohe Anzahl apoptotischer Nuklei zu sehen. Dieser Verlauf deckt sich mit zahlreichen Publikationen zur Induktion von Apoptose und Zelltod durch Doxorubizin *in vivo* und *in vitro* [90-92]. Sowohl im *in vivo* als auch im *in vitro* Modell führt Doxorubizin also zu Apoptose bzw. Zelltod.

4.2.2 Doxorubizin führt zu vermehrter Aktivierung Ca²⁺ abhängiger Proteine

Veränderungen in den zytosolischen und mitochondrialen Ca²⁺-Leveln im Rahmen der Doxorubizintoxizität wurden bereits beschrieben [19, 26]. Doxorubizin erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors (RyR) und führt damit zur Erhöhung des diastolischen SR Ca²⁺ Lecks sowie zur Depletion des SR Ca²⁺ gehalts [19]. Im Zusammenhang mit erhöhten Ca²⁺ Spiegel n findet meist eine CaMKII Aktivierung statt [28]. Tatsächlich wurde gezeigt, dass CaMKII in Folge des durch Doxorubizin induzierten Ca²⁺ Lecks phosphoryliert wird und zu einer weiteren Dysregulation des Ca²⁺ Haushalts beiträgt [93]. Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine Aktivierung und Phosphorylierung von CaMKII im Rahmen der Doxorubizinkardiotoxizität *in vitro* bestätigt werden. Als Nachweis der Ca²⁺-abhängigen Aktivierung von CaMKII wurde die Phosphorylierung von PLN herangezogen. Dessen Phosphorylierung an Thr17 erfolgt spezifisch durch CaMKII [94]. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von PLN und damit die CaMKII Aktivität 16-24h nach der Behandlung mit 1µM Doxorubizin stark erhöht ist. Dies weist auf erhöhte zytosolische Ca²⁺-Level hin, kann aber auch mit oxidativem Stress in Verbindung stehen [95]. Allerdings konnten weder für den 16h Zeitpunkt noch den 24h Zeitpunkt eindeutig erhöhte ROS-Level nachgewiesen werden. Auch die häufig mit ROS in Verbindung gebrachte Phosphorylierung von AKT trat erst nach 24h, also nach dem initialen Anstieg der PLN-Phosphorylierung auf [79]. Die Aktivierung der CaMKII kann also nicht eindeutig auf ROS zurückgeführt werden.

Im weiteren Verlauf der Doxorubizinbehandlung konnte nach 48h die Phosphorylierung von CaMKII an Thr286 nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um eine Autophosphorylierung, die als Folge einer anhaltenden Aktivierung zu sehen ist und eine Art Ca²⁺-Gedächtnis darstellt [29]. Die Phosphorylierung der CaMKII im Rahmen der

Doxorubizinkardiotoxizität wurde ursprünglich von Sag et al nachgewiesen und konnte hier erstmals reproduziert werden [93].

Durch die Phosphorylierung an Thr286 wird CaMKII konstitutiv und Ca^{2+} unabhängig aktiv. Eine erhöhte CaMKII Aktivität kann Arrhythmien und eine diastolische Dysfunktion auslösen [96]. Interessanterweise ist die CaMKII-Aktivierung aber auch ein Zwischenschritt vieler apoptotischer Stimuli, insbesondere bei Ca^{2+} stimulierter Apoptose [33, 97]. In diesem Zusammenhang ist besonders darauf hinzuweisen, dass mitochondriale CaMKII über die Phosphorylierung des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters den Ca^{2+} -Einstrom und damit die mitochondriale Integrität und Apoptose direkt beeinflusst [35]. Außerdem kann die CaMKII vermittelte Phosphorylierung des RyR Ca^{2+} induzierten Zelltod auslösen [98]. Damit stellt die durch Doxorubizin erhöhte CaMKII Aktivierung einen möglichen Mechanismus der Doxorubizintoxizität dar.

4.2.3 Doxorubizin führt zu einer Akkumulation von p53

Die zytotoxische Wirkung vieler Chemotherapeutika, insbesondere auch Doxorubizin, ist mit einer Akkumulation von p53 verbunden [99, 100]. Dieser Effekt konnte in den NRVCN reproduziert werden. Nach 3h war ein leichter Anstieg und nach 16-24h Doxorubizinbehandlung eine signifikante Erhöhung der p53 Level zu verzeichnen. p53 Aktivierung kann durch mehrere Wege erfolgen. Ein Hauptauslöser der p53 Akkumulation ist dabei das Auftreten starker DNA Schädigungen [44]. Grund für die erhöhten p53 Level könnten also die durch Inhibierung der Topoisomerase induzierte Doppelstrangbrüche sein [57]. Jedoch kann p53 auch durch oxidativen Stress und CaMKII aktiviert werden und akkumulieren [45, 101]. Im Zeitverlauf kam es zunächst zur Akkumulation von p53 und erst dann zur Phosphorylierung von AKT und Spaltung von Caspase3. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass der Anstieg der p53 Expression der mitochondrialen Dysfunktion voraus geht und spricht für eine DNA Schädigung als frühem Ereignis in der Doxorubizintoxizität [102]. Das Auftreten von DNA-Schäden konnte durch die frühe Rekrutierung von Phospho-Histon 2A.X schon 1h nach Doxorubizinbehandlung nachgewiesen werden. Es ist jedoch durchaus möglich, dass die p53 Akkumulation später durch andere Stimuli verstärkt wird.

Dafür spricht z.B., dass das Maximum der Caspase3 Aktivierung zeitlich mit der CaMKII Phosphorylierung zusammenfällt, während zu diesem Zeitpunkt die p53 Level bereits wieder sinken. Auch das Ausmaß der Aktivierung ist vergleichbar. In der Tat ist die Notwendigkeit von p53 für das Auslösen von Apoptose durch Doxorubizin gerade auch für Kardiomyozyten umstritten (siehe Kapitel 4.3.1). Die Ca^{2+} -unabhängige CaMKII Aktivierung könnte daher durchaus direkt und p53 unabhängig für eine zusätzliche Induktion der Apoptose verantwortlich sein.

4.2.4 Doxorubizin verringert die Expression des ER Chaperons GRP78

Während eine positive Rolle von ER Stress und einer damit verbundenen GRP78 Überexpression für das Überleben von Tumorzellen gut beschrieben ist, ist der Einfluss von Doxorubizin auf die endogenen GRP78 Level des kardialen Gewebes relativ schlecht untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte mit einem KDEL spezifischen Antikörper eine signifikante Reduktion der GRP78 Expression nach 16h Doxorubizinbehandlung nachgewiesen werden, die danach wieder leicht anstieg. Die KDEL-Sequenz stellt das ER Retentionssignal dar und ist bei der ER-ansässigen Form von GRP78 und dem membranständigen GRP78 zu finden [103, 104]. Interessanterweise war diese Herunterregulation mit einem nicht KDEL-spezifischen Antikörper, der ein allgemeines Epitop von GRP78 erkennt weder *in vivo* noch *in vitro* zu detektieren. *In vitro* ging der Trend hier eher zu einer Hochregulation. Gleichzeitig waren in beiden Modellen die GRP78 mRNA Level verringert.

Dies spiegelt die widersprüchlichen zu dieser Frage publizierten Daten wieder. Einige Gruppen sehen nach Doxorubizinbehandlung keine Veränderungen der GRP78 Gesamtproteinlevel, andere sehen eine Hochregulation [105-107]. Sicherlich ist dies auch auf die Verwendung unterschiedlicher Modelle und Zelllinien zurückzuführen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten weisen allerdings auch auf eine kompartimentspezifische Depletion oder Translokation von GRP78 hin.

Die Herunterregulation der KDEL-Form trat gleichzeitig mit der Akkumulation von p53, der PLN Phosphorylierung und der Detektion von Zelltod im ToxiLight Assay auf. Es stellte sich also die Frage, ob die GRP78 Depletion ein Auslöser des Doxorubizin induzierten Zelltodes ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Effekt von Doxorubizin im Vergleich zu NRVCN mit GRP78 Knockdown untersucht .

4.2.5 Der Knockdown von GRP78 verstärkt die Apoptose, aktiviert jedoch andere Signalwege als Doxorubizin

Ein alleiniger GRP78 Knockdown löst bereits Apoptose aus, unterstützt sie allerdings auch im Zusammenhang mit vielen Stressoren [108, 109]. Insbesondere können durch den Knockdown von GRP78 Tumorzellen für eine Chemotherapie sensitiviert werden [110, 111]. In diesen Untersuchungen wurde jedoch in der Regel mit GRP78 überexprimierenden Tumoren gearbeitet und nicht der Effekt auf physiologische GRP78 Level untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass der alleinige Knockdown von GRP78 in NRVCN Zelltod auslöst. Allerdings fiel die Zelltodaktivierung deutlich geringer aus, als durch die Doxorubizinbehandlung, obwohl beide Behandlungen eine vergleichbare Reduktion der GRP78 Level induzierten. Durch die siGRP78 Behandlung zusätzlich zu Doxorubizin konnte die Kardiotoxizität zwar erhöht werden, der Effekt war jedoch rein additiv und nicht synergistisch. Hinzu kommt, dass der GRP78 Knockdown eine massive Erhöhung der CHOP Expression (und damit des ER Stress) zur Folge hat, Doxorubizin jedoch

nur eine moderate CHOP Induktion herbeiführt. Dies sind starke Hinweise darauf, dass der GRP78 Knockdown und Doxorubizin unterschiedliche Signalwege aktivieren und die durch Doxorubizin induzierte Depletion von GRP78 nicht die Hauptursache der Kardiotoxizität ist.

Dennoch ist es denkbar, dass die erniedrigten GRP78 Level, insbesondere im SR, die Doxorubizintoxizität zwar nicht auslösen, aber unterstützen. Das SR ist neben den Mitochondrien eines der in der Kardiotoxizität hauptsächlich betroffenen Organellen [112]. GRP78 ist ein wichtiger Regulator der ER Funktion und Homöostase und reguliert außerdem den Ca^{2+} -Strom zwischen ER und Mitochondrien [74]. Die Erniedrigung der KDEL-GRP78 Level durch Doxorubizin setzt also eventuell protektive Mechanismen außer Kraft. Eine GRP78 Überexpression könnte in diesem Fall protektiv wirken.

4.3 GRP78 verringert die Doxorubizinkardiotoxizität *in vitro* und *in vivo*

Die gezielte Überexpression von GRP78 wurde durch Gentransfer mit einem AAV Serotyp6 unter der Kontrolle eines kardialen Promotors erreicht. Damit konnte eine 3-7 fache Überexpression von GRP78 erzielt werden. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte so ein therapeutisches Fenster grob bestimmt werden. Demzufolge schützt die GRP78 Überexpression vor der Doxorubizinkardiotoxizität, dieser Effekt scheint sich aber ab einer ca. 3 fachen Überexpression in einen pro-apoptotischen Effekt mit erhöhter Caspase3 Aktivierung umzukehren. Pro-apoptotische Effekte durch GRP78 sind insbesondere im Zusammenhang mit der membranständigen Form von GRP78 bekannt. So kann über membranständiges GRP78 der extrinsische Apoptosesignalweg z.B. durch endogene, zirkulierende Proteine wie Par-4 oder TRAIL, aber auch durch einen gegen GRP78 gerichteten Autoantikörper aktiviert werden [70, 71]. Eine starke Überexpression kann auch zur vermehrten Lokalisierung von GRP78 in anderen Kompartimenten führen, wodurch eventuell andere Effekte als durch SR lokalisiertes GRP78 induziert werden können [64, 67].

Innerhalb des therapeutischen Fensters der GRP78 Überexpression (1,5 bis 3 fache Überexpression) trat eine Reduktion des apoptotischen Zelltodes auf, nachgewiesen durch verringerte Caspase 3 Aktivierung und reduziertes Auftreten TUNEL positiver Zellen. Das Ausbleiben eines Effekts durch GRP78 im ToxiLight Assay widerlegt den protektiven Effekt nicht zwingend, da der Assay mit dem Austritt von Enzymen aus der Zelle einen sehr unspezifischen und erst nach der Caspaseaktivierung auftretenden Parameter erfasst [113]. Die GRP78 Überexpression zeigte sich frühestens nach 48h Doxorubizinbehandlung protektiv, damit ist ein positiver Effekt im ToxiLight Assay erst zu einem späteren Zeitpunkt zu erwarten, der allerdings durch den experimentellen Aufbau nicht erfasst wurde.

Die *in vivo* Daten unterstützen diese Ansicht. Durch die Behandlung mit AAV-GRP78 konnte die initiale Schädigung des Myokards, gemessen an den hsTnT Leveln im Plasma 27h nach der Injektion von Doxorubizin, signifikant gesenkt werden. Die Troponinlevel im Plasma

gelten als Marker für myokardialen Schaden, der bei Nekrose und Apoptose aus den Kardiomyozyten ins Blut frei gesetzt wird und haben einen prädiktiven Wert für die Ausbildung einer Doxorubizinkardiomyopathie [114-116]. Somit konnte erstmals ein protektiver Effekt durch GRP78 in der Doxorubizinkardiotoxizität in zwei Modellen nachgewiesen werden.

Der verringerte Zelltod schlägt sich auch funktionell nieder. Neben dem antiapoptotischen Effekt von GRP78 konnte *in vivo* ein verbessertes Überleben festgestellt werden. Zwischen den beiden Doxorubizin behandelten Gruppen ist dabei kein Unterschied im Gewichtsverlust festzustellen, der das verbesserte Überleben erklären könnte. Zusammen mit der durch den MLC-Promotor erreichten kardialen Spezifität der Expression des Transgens spricht dies dafür, dass es ein spezifisch kardialer Effekt ist, der das Überleben verlängert. In der Tat zeigte sich mit GRP78 Überexpression eine signifikante Verbesserung der diastolischen Relaxation, angezeigt durch eine verbesserte minimale Druckänderungsrate und eine Reduktion des Parameters Tau. Veränderungen in der Relaxation kommt in der Doxorubizinkardiotoxizität eine große Bedeutung zu, da sie sich schon in frühen Stadien der Kardiomyopathie manifestieren und prädiktiv für eine systolische Dysfunktion sind [88, 117]. Dementsprechend zeigte sich mit GRP78 Behandlung auch nur ein Trend zu einer verbesserten systolischen Druckänderungsrate.

Mit der Reduktion der Apoptose und der Relaxation verbessert die GRP78 Überexpression also bereits frühe Ereignisse auf dem Weg zur Entwicklung einer Doxorubizinkardiomyopathie. Die Untersuchung möglicher Mechanismen der GRP78 vermittelten Protektion erfolgte daher *in vitro*.

4.3.1 GRP78 Überexpression verringert die Doxorubizin induzierte p53 Akkumulation

Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben ging die Doxorubizinbehandlung mit einem Anstieg in der p53 Expression einher. Nach 24h Doxorubizinbehandlung waren im Zusammenhang mit der GRP78 Überexpression die p53 Level reduziert. Dies kann eine Ursache der nach 48h beobachteten Reduktion der Apoptose sein. Für positive Effekte einer verringerten oder veränderten p53 Aktivität bzw. Expression gibt es zahlreiche Beispiele. Mutationen in p53 werden in eine enge Verbindung mit der Resistenz von Tumorzelllinien gegen Anthrazykline gebracht [118]. Auch der gezielte kardiale Knockout von p53 *in vivo* konnte die Doxorubizin induzierte Apoptose verringern und in Folge die ventrikuläre Kontraktilität verbessern [119]. Diesen Beobachtungen stehen Veröffentlichungen entgegen, nach denen p53 in adulten Kardiomyozyten und *in vivo* die Apoptose bzw. die als Antwort auf den Verlust von Kardiomyozyten auftretende Fibrose nur gering zu beeinflussen scheint [53, 120]. Die Relevanz von p53 in der Doxorubizinkardiotoxizität ist also noch nicht eindeutig geklärt.

Es stellt sich außerdem die Frage, wie eine GRP78 Überexpression zu verringerter p53 Akkumulation führen kann. Da p53 ein Teil der Antwort auf DNA Schädigungen ist und Doxorubizin über die Hemmung der Topoisomerase II DNA Strangbrüche induziert, liegt als Ursache der p53 Reduktion eine verringerte Schädigung der DNA nahe. In der Tat konnte die durch UV-Strahlung verursachte Schädigung der DNA durch den Knockdown von GRP78 verstärkt werden [77]. Eine GRP78 Überexpression könnte also durchaus zu einer verringerten DNA Schädigung führen. Dies muss im Zusammenhang mit der Doxorubizintoxizität noch überprüft werden.

Ein wichtiger Faktor in der Akkumulation von p53 kann allerdings auch die CaMKII-Aktivität sein [101].

4.3.2 GRP78 Überexpression normalisiert die CaMKII-Aktivität

Die Verknüpfung von CaMKII und myokardialer Apoptose wurde bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert. Übereinstimmend mit der verringerten Doxorubizin induzierten Apoptose konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich durch die GRP78 Überexpression die Doxorubizin induzierte Aktivierung der CaMKII *in vitro* signifikant reduzieren, sogar fast komplett aufheben lässt. Dies zeigte sich durch eine reduzierte Phosphorylierung von PLN an Thr17 nach 24h und eine ebenfalls reduzierte Autophosphorylierung von CaMKII nach 48h. Beispiele für den antiapoptotischen Effekt einer CaMKII Inhibierung gibt es bereits aus anderen Bereichen. So verringert die Hemmung der mitochondrialen sowie der zytosolischen CaMKII die im Zusammenhang mit dem Ischämie/Reperfusionsschaden auftretende Apoptose [35, 121]. Auch im Herzinfarktmodell mit Isoprenalin induzierter Apoptose lässt sich der Zelltod durch CaMKII Inhibierung aufhalten [122].

CaMKII verursacht Zelltod und eine kontraktile Dysfunktion über die Phosphorylierung des RyR [21, 98]. Positive Effekte einer CaMKII Inhibierung werden daher vor allem auf die Verringerung des RyR Rezeptor vermittelten diastolischen Ca^{2+} Lecks zurückgeführt [123]. In diesem Zusammenhang ist es wichtig noch einmal zu erwähnen, dass ein diastolisches Ca^{2+} -Leck und erhöhte zytosolische Ca^{2+} Spiegel auch in der Doxorubizinkardiotoxizität auftreten und eine mögliche Ursache der beobachteten Apoptose und Dysfunktion darstellen [19]. Eine durch Inhibierung der CaMKII reduzierte RyR-Aktivität kann also den antiapoptotischen Effekt und auch die verbesserte Kontraktilität nach GRP78 Behandlung erklären.

Durch die in Folge der GRP78 Überexpression verringerte Aktivität der CaMKII kann allerdings auch das verlängerte Überleben der AAV-GRP78 behandelten Mäuse erklärt werden. Aufgrund der noch nicht manifestierten Kardiomyopathie im Versuch ist die Pumpfunktion als Grund für den Tod auszuschließen. Interessanterweise ist allerdings zwischen den beiden Doxorubizin behandelten Gruppen kein Unterschied im Gewichtsverlust festzustellen, der das verbesserte Überleben in der GRP78 Gruppe erklären könnte. Zusammen mit der durch den MLC-Promotor erreichten kardialen Spezifität der Expression des Transgens spricht dies dafür, dass es trotz nur geringer Veränderungen in der Pumpfunktion ein spezifisch kardialer Effekt ist, der das Überleben verlängert. Die

wahrscheinlichste Todesursache ist daher das Auftreten von Arrhythmien mit kardialem Arrest, wie sie auch in der akuten Doxorubizintoxizität auftreten können [124]. Die CaMKII als ein zentraler Regulator der Ca^{2+} Ströme wird innerhalb vieler Kardiomyopathiemodelle mit der Ausbildung von tödlichen Arrhythmien in Verbindung gebracht [125, 126]. Die in dieser Arbeit festgestellte Reduzierung der CaMKII Aktivität durch GRP78 Überexpression sollte also antiarrhythmisch wirken und könnte so zum verlängerten Überleben führen.

Dies ist die erste Arbeit, die Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen GRP78 und der CaMKII-Aktivität in einem Kardiomyopathiemodell beschreibt. Eine interessante Fragestellung für zukünftige Projekte ist daher, wie GRP78 die CaMKII Aktivierung reduzieren kann. Da in der vorliegenden Arbeit kein schlüssiger Beweis für erhöhte ROS-Level gefunden werden konnte, ist die initiale Aktivierung der CaMKII durch Ca^{2+} am Wahrscheinlichsten. Eine direkte Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase und der freien Ca^{2+} -Level durch GRP78 steht dabei im Einklang mit bereits beschriebenen Funktionen des ER Chaperons.

Zum Beispiel lässt sich durch im Rahmen des ER Stress erhöhten Level von GRP78 ein oxidativ induzierter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Level und die dadurch ausgelöste Apoptose verhindern. Interessanterweise lässt sich der gleiche protektive Effekt durch den Ca^{2+} -Chelator EGTA erzielen [127]. In einem sehr einfachen Modell könnte die Fähigkeit von GRP78 Ca^{2+} zu binden zu einer Reduktion des freien Ca^{2+} und damit zu einer Stabilisierung der Ca^{2+} -Homöostase unter Stress beitragen [128]. GRP78 ist allerdings auch an der Regulation Ca^{2+} transportierender Kanäle wie dem SR Ca^{2+} Kanal Translocon und dem mitochondrialen Ca^{2+} -Transporter IP3R beteiligt, so dass ein direkter Einfluss auf die Ca^{2+} Ströme denkbar ist [74, 129].

4.4 Fazit und Ausblick

Ein bleibendes Problem in der Anwendung des Chemotherapeutikums Doxorubizin ist das Auftreten kardiotoxischer Nebenwirkungen, die die maximal anwendbare Dosis einschränken. Interessanterweise ist die Resistenz vieler Tumore gegenüber einer Doxorubizintherapie mit einer Hochregulation des ER Chaperons GRP78 verbunden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob eine gezielte kardiale GRP78 Überexpression die Doxorubizinkardiotoxizität verhindern kann. Es wurde dafür ein *in vivo* Modell etabliert, das eine beginnende Doxorubizinkardiomyopathie widerspiegelt, sodass der Einfluss der GRP78 Überexpression auf frühe Vorgänge in der Doxorubizinkardiotoxizität untersucht werden konnte. In diesem Modell konnte erstmals gezeigt werden, dass durch die kardial spezifische GRP78 Überexpression *in vivo* eine verringerte Sterblichkeit sowie eine verbesserte systolische und diastolische Funktion nach Doxorubizinbehandlung auftreten. Dies konnte mit einem verringerten Zellsterben *in vivo* und *in vitro* in Zusammenhang gebracht werden.

Daneben deuten die *in vitro* Versuche darauf hin, dass Doxorubizin in Kardiomyozyten zu einer kompartimentspezifischen Depletion von GRP78 im Sarkoplasmatischen Retikulum

führt. Diese ist nicht ursächlich für die Doxorubizinkardiotoxizität, inhibiert allerdings eventuell protektive Mechanismen.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können außerdem folgende neue Hypothesen bezüglich des Mechanismus des protektiven Effekts von GRP78 auf die Doxorubizin induzierte Kardiotoxizität gebildet werden (Abbildung 4.4.1):

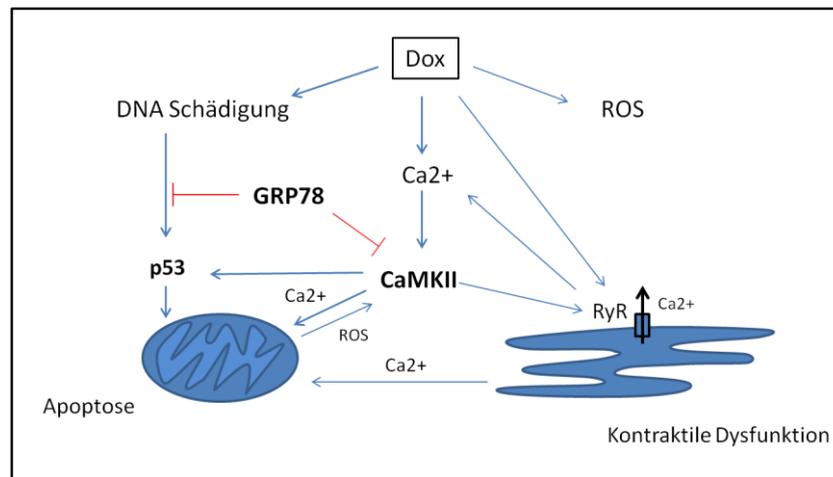


Abbildung 4.4.1: Schematische Darstellung der durch Doxorubizin beeinflussten Signalwege, die mit der Doxorubizinkardiotoxizität in Verbindung stehen (blau) und der durch GRP78 Überexpression induzierten Effekte (rot). Doxorubizin (Dox) führt zur Induktion von Apoptose durch Schädigung der DNA und eine dadurch induzierte p53 Akkumulation. Außerdem führt Doxorubizin zu erhöhten cytosolischen Ca²⁺-Leveln, welche die Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) aktivieren. Aktive CaMKII erhöht den Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR über den Ryanodinrezeptor (RyR) und den Ca²⁺-Strom in die Mitochondrien. Die Folge sind Apoptose, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die den Prozess verstärken und eine kontraktile Dysfunktion.

Hypothese A): Hauptmechanismus der Doxorubizintoxizität ist die durch DNA-Schädigung ausgelöste Akkumulation von p53, die die Apoptose initiiert. Eine direkte protektive Wirkung von GRP78 in der DNA-Reparatur oder die Verhinderung der DNA Schädigung führt zu geringerer Akkumulation von p53 und verringerter Apoptose.

Diese Hypothese ergibt sich aus den im Zusammenhang mit der GRP78 Überexpression reduzierten p53 Leveln und der nachgewiesenen Induktion der DNA-Reparaturprogramme nach Doxorubizinbehandlung. Gegenstand zukünftiger Arbeiten wäre demnach der Nachweis einer Reduktion der Doxorubizin induzierten DNA-Schädigung durch GRP78. Eine Möglichkeit ist, die frühe Akquirierung und Aktivierung von DNA-Reparaturenzymen wie z.B. Phospho-Histon 2A.X oder "Ataxia telangiectasia mutated" (ATM) nach Doxorubizinbehandlung mit und ohne GRP78 Knockdown zu quantifizieren [130]. Ein direkter Nachweis des Effekts der viralen GRP78 Überexpression erwies sich aufgrund der Rekrutierung von Phospho-Histon 2a.X durch das Virus als nicht möglich [131]. Interessant wäre auch, die Effekte einer gezielten nukleären Überexpression von GRP78 zu untersuchen. Außerdem sollte in Hinblick auf die widersprüchliche Literatur bezüglich der Rolle von p53 für die Apoptose, die Relevanz der p53 Reduktion in dem untersuchten Modell z.B. durch einen p53 Knockdown geprüft werden.

Diese Hypothese ist besonders deshalb interessant, weil mit der DNA-Schädigung ein primärer, ursächlicher Mechanismus der Doxorubizintoxizität mit dem protektiven Effekt der GRP78 Überexpression verknüpft werden kann.

Hypothese B) Doxorubizin induziert ein diastolisches Ca^{2+} Leck, in Folge dessen CaMKII aktiviert wird. Die Aktivierung der CaMKII durch Doxorubizin führt zur Apoptose. Entweder durch Erhöhung des ER Ca^{2+} Lecks über RyR Phosphorylierung oder über die direkte Erhöhung des Ca^{2+} Transports in die Mitochondrien. GRP78 wiederum verringert die durch Doxorubizin induzierte Aktivierung der CaMKII und normalisiert die Ca^{2+} -Ströme, wodurch weniger Apoptose stattfindet.

Der Nachweis des direkten antiapoptotischen Effekts einer CaMKII Inhibierung (z.B. durch das "Autocamtide-2-Related Inhibitory Peptide") in der Doxorubizinkardiotoxizität muss in zukünftigen Arbeiten noch geführt werden. Da dysregulierte Ca^{2+} -Ströme über den RyR in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind, sollte auch das postulierte Auftreten einer verringerten Phosphorylierung des RyR nach GRP78 Behandlung im Kontext der Doxorubizinbehandlung verifiziert werden. Insbesondere die Aktivität des RyR durch Messung der Ca^{2+} -Transienten ist hierbei von Bedeutung, da der RyR auch durch andere Modifikation als die Phosphorylierung reguliert wird [132]. Außerdem sollte gezielt der Einfluss der mitochondrialen CaMKII untersucht werden, da diese eng mit Ca^{2+} und ROS vermitteltem Zelltod in Verbindung steht [35].

Die Bedeutung der CaMKII wurde im Zusammenhang mit der Doxorubizinkardiotoxizität bisher kaum untersucht. Ein Einfluss von GRP78 auf die CaMKII Aktivierung war bisher sogar gänzlich unbekannt. Die vorliegende Arbeit bietet daher Anstöße für ein tiefergehendes Verständnis der Doxorubizin-Kardiotoxizität und weist Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapien auf.

5 Literaturverzeichnis

1. Khasraw, M., R. Bell, and C. Dang, *Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review*. Breast, 2012. **21**(2): p. 142-9.
2. Singal, P.K. and N. Iliskovic, *Doxorubicin-induced cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1998. **339**(13): p. 900-5.
3. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
4. Kilickap, S., et al., *Doxorubicin-induced second degree and complete atrioventricular block*. Europace, 2005. **7**(3): p. 227-30.
5. Chatterjee, K., et al., *Doxorubicin cardiomyopathy*. Cardiology, 2010. **115**(2): p. 155-62.
6. Von Hoff, D.D., et al., *Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure*. Ann Intern Med, 1979. **91**(5): p. 710-7.
7. Bovelli, D., et al., *Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents and radiotherapy-related heart disease: ESMO Clinical Practice Guidelines*. Ann Oncol, 2010. **21** Suppl 5: p. v277-82.
8. Lenneman, A.J., et al., *Heart transplant survival outcomes for adriamycin-dilated cardiomyopathy*. Am J Cardiol, 2013. **111**(4): p. 609-12.
9. Lipshultz, S.E., et al., *Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood*. N Engl J Med, 1991. **324**(12): p. 808-15.
10. Von Hoff, D.D., et al., *Daunomycin-induced cardiotoxicity in children and adults. A review of 110 cases*. Am J Med, 1977. **62**(2): p. 200-8.
11. Oechsle, K., et al., *Four consecutive multicenter phase II trials of adjuvant chemoradiation in patients with completely resected high-risk gastric cancer: the experience of the German AIO/ARO/CAO group*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(2): p. 163-72.
12. Moreira, A.C., et al., *Mitochondrial apoptosis-inducing factor is involved in doxorubicin-induced toxicity on H9c2 cardiomyoblasts*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(12 Pt A): p. 2468-78.
13. Childs, A.C., et al., *Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio*. Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4592-8.
14. Kalivendi, S.V., et al., *Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium*. Biochem J, 2005. **389**(Pt 2): p. 527-39.
15. Konorev, E.A., S. Vanamala, and B. Kalyanaraman, *Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(12): p. 1723-8.
16. Becherer, U., et al., *Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles*. Nat Neurosci, 2003. **6**(8): p. 846-53.

17. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.
18. Scoote, M. and A.J. Williams, *Myocardial calcium signalling and arrhythmia pathogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(4): p. 1286-309.
19. Wang, Y.X. and M. Korth, *Effects of doxorubicin on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocardium*. Circ Res, 1995. **76**(4): p. 645-53.
20. Bers, D.M., D.A. Eisner, and H.H. Valdivia, *Sarcoplasmic reticulum Ca₂⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca₂⁺ transport*. Circ Res, 2003. **93**(6): p. 487-90.
21. Ai, X., et al., *Ca₂⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca₂⁺ leak in heart failure*. Circ Res, 2005. **97**(12): p. 1314-22.
22. Csordas, G. and G. Hajnoczky, *SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1352-62.
23. Griffiths, E.J. and G.A. Rutter, *Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1324-33.
24. Mattson, M.P. and S.L. Chan, *Calcium orchestrates apoptosis*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(12): p. 1041-3.
25. Kuznetsov, A.V., et al., *Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(6): p. 1144-52.
26. Chacon, E., R. Ulrich, and D. Acosta, *A digitized-fluorescence-imaging study of mitochondrial Ca₂⁺ increase by doxorubicin in cardiac myocytes*. Biochem J, 1992. **281 (Pt 3)**: p. 871-8.
27. Edman, C.F. and H. Schulman, *Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca₂⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1221**(1): p. 89-101.
28. Mattiazzi, A., et al., *Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **308**(10): p. H1177-91.
29. Hudmon, A. and H. Schulman, *Neuronal CA₂⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 473-510.
30. Palomeque, J., et al., *Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca₂⁺ dependence of Ca₂⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species*. Circ Res, 2009. **105**(12): p. 1204-12.
31. Zhang, T., et al., *The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure*. Circ Res, 2003. **92**(8): p. 912-9.
32. Luo, M. and M.E. Anderson, *Mechanisms of altered Ca₂⁺ handling in heart failure*. Circ Res, 2013. **113**(6): p. 690-708.
33. Zhu, W., et al., *Activation of CaMKII δ C is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10833-9.
34. Wright, S.C., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase II mediates signal transduction in apoptosis*. FASEB J, 1997. **11**(11): p. 843-9.
35. Joiner, M.L., et al., *CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart*. Nature, 2012. **491**(7423): p. 269-73.

36. Minotti, G., et al., *Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms*. *Methods Enzymol*, 2004. **378**: p. 340-61.
37. Zhang, S., et al., *Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *Nat Med*, 2012. **18**(11): p. 1639-42.
38. Lebrecht, D. and U.A. Walker, *Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity*. *Cardiovasc Toxicol*, 2007. **7**(2): p. 108-13.
39. Zorov, D.B., et al., *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes*. *J Exp Med*, 2000. **192**(7): p. 1001-14.
40. Orrenius, S. and B. Zhivotovsky, *Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free*. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(4): p. 188-9.
41. Turley, H., et al., *The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues*. *Br J Cancer*, 1997. **75**(9): p. 1340-6.
42. Zunino, F. and G. Capranico, *DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines*. *Anticancer Drug Des*, 1990. **5**(4): p. 307-17.
43. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis*. *Cancer Lett*, 2013. **332**(2): p. 237-48.
44. Sakaguchi, K., et al., *DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade*. *Genes Dev*, 1998. **12**(18): p. 2831-41.
45. Liu, B., Y. Chen, and D.K. St Clair, *ROS and p53: a versatile partnership*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **44**(8): p. 1529-35.
46. Antonsson, B., et al., *Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria*. *Biochem J*, 2000. **345 Pt 2**: p. 271-8.
47. Sevrioukova, I.F., *Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(12): p. 2545-79.
48. Matoba, S., et al., *p53 regulates mitochondrial respiration*. *Science*, 2006. **312**(5780): p. 1650-3.
49. Liu, Z., et al., *PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(5): p. 1647-54.
50. Marchenko, N.D., A. Zaika, and U.M. Moll, *Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(21): p. 16202-12.
51. Zhao, Y., et al., *p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3745-50.
52. Sayan, B.S., et al., *p53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13566-73.
53. Wang, S., et al., *Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): p. 25535-43.
54. Goormaghtigh, E., et al., *Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity*. *Biophys Chem*, 1990. **35**(2-3): p. 247-57.

55. Veronese, F.M., et al., *PEG-doxorubicin conjugates: influence of polymer structure on drug release, in vitro cytotoxicity, biodistribution, and antitumor activity*. *Bioconjug Chem*, 2005. **16**(4): p. 775-84.
56. Weiss, G., M. Loyevsky, and V.R. Gordeuk, *Dexrazoxane (ICRF-187)*. *Gen Pharmacol*, 1999. **32**(1): p. 155-8.
57. Lyu, Y.L., et al., *Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane*. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8839-46.
58. Marty, M., et al., *Multicenter randomized phase III study of the cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) in advanced/metastatic breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy*. *Ann Oncol*, 2006. **17**(4): p. 614-22.
59. Schlitt, A., et al., *Cardiotoxicity and oncological treatments*. *Dtsch Arztebl Int*, 2014. **111**(10): p. 161-8.
60. Aberuyi, N., S. Rahgozar, and A. Moafi, *The role of ATP-binding cassette transporter A2 in childhood acute lymphoblastic leukemia multidrug resistance*. *Iran J Ped Hematol Oncol*, 2014. **4**(3): p. 118-26.
61. Riou, J.F., et al., *Altered topoisomerase I activity and recombination activating gene expression in a human leukemia cell line resistant to doxorubicin*. *Biochem Pharmacol*, 1993. **46**(5): p. 851-61.
62. Zheng, Y.Z., et al., *The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **145**(2): p. 349-58.
63. Lee, H.K., et al., *GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis*. *Neuro Oncol*, 2008. **10**(3): p. 236-43.
64. Reddy, R.K., et al., *Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(23): p. 20915-24.
65. Pyrko, P., et al., *The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas*. *Cancer Res*, 2007. **67**(20): p. 9809-16.
66. Lee, A.S., *Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential*. *Nat Rev Cancer*, 2014. **14**(4): p. 263-76.
67. Ni, M., Y. Zhang, and A.S. Lee, *Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting*. *Biochem J*, 2011. **434**(2): p. 181-8.
68. Tsang, K.Y., et al., *In vivo cellular adaptation to ER stress: survival strategies with double-edged consequences*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 13): p. 2145-54.
69. Misra, U.K., R. Deedwania, and S.V. Pizzo, *Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13694-707.
70. Burikhanov, R., et al., *The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis*. *Cell*, 2009. **138**(2): p. 377-88.
71. Misra, U.K., et al., *Ligation of cancer cell surface GRP78 with antibodies directed against its COOH-terminal domain up-regulates p53 activity and promotes apoptosis*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(5): p. 1350-62.
72. Liu, H., et al., *Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(35): p. 21751-9.

73. Ouyang, Y.B., et al., *Overexpressing GRP78 influences Ca²⁺ handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress*. *Mitochondrion*, 2011. **11**(2): p. 279-86.
74. Hayashi, T. and T.P. Su, *Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival*. *Cell*, 2007. **131**(3): p. 596-610.
75. Matsumoto, A. and P.C. Hanawalt, *Histone H3 and heat shock protein GRP78 are selectively cross-linked to DNA by photoactivated gilyvocarcin V in human fibroblasts*. *Cancer Res*, 2000. **60**(14): p. 3921-6.
76. Barker, S., et al., *Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(40): p. 33826-38.
77. Zhai, L., et al., *Decreased cell survival and DNA repair capacity after UVC irradiation in association with down-regulation of GRP78/BiP in human R5a cells*. *Exp Cell Res*, 2005. **305**(2): p. 244-52.
78. Mekada, K., et al., *Genetic differences among C57BL/6 substrains*. *Exp Anim*, 2009. **58**(2): p. 141-9.
79. Ushio-Fukai, M., et al., *Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(32): p. 22699-704.
80. Simunek, T., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*. *Pharmacol Rep*, 2009. **61**(1): p. 154-71.
81. Muller, I., et al., *Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **230**(2): p. 254-7.
82. Hempel, G., et al., *Peak plasma concentrations of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002. **49**(2): p. 133-41.
83. Zhang, W., et al., *Loss of Abcc1 (Mrp1) potentiates chronic doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015.
84. Hadi, N., et al., *Vitamin E and telmisartan attenuates doxorubicin induced cardiac injury in rat through down regulation of inflammatory response*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2012. **12**: p. 63.
85. Dodd, D.A., et al., *Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1697-705.
86. Li, K., et al., *Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin*. *Circulation*, 2006. **113**(18): p. 2211-20.
87. Fan, G.C., et al., *Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity*. *Circ Res*, 2008. **103**(11): p. 1270-9.
88. Schmitt, K., et al., *Early detection of doxorubicin and daunorubicin cardiotoxicity by echocardiography: diastolic versus systolic parameters*. *Eur J Pediatr*, 1995. **154**(3): p. 201-4.
89. Zhang, Y.W., et al., *Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009. **57**(6): p. 435-45.
90. Arola, O.J., et al., *Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis*. *Cancer Res*, 2000. **60**(7): p. 1789-92.

91. Lai, H.C., et al., *Propofol ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in rat cardiomyocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2011. **257**(3): p. 437-48.
92. Liu, J., et al., *ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(5): p. H1956-65.
93. Sag, C.M., et al., *CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(5): p. 749-59.
94. Mundina-Weilenmann, C., et al., *Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33561-7.
95. Erickson, J.R., et al., *CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 889-915.
96. Sossalla, S., et al., *Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKII δ (C) can be reversed by inhibition of late Na⁽⁺⁾ current*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(2): p. 263-72.
97. Olofsson, M.H., et al., *Charting calcium-regulated apoptosis pathways using chemical biology: role of calmodulin kinase II*. BMC Chem Biol, 2008. **8**: p. 2.
98. Di Carlo, M.N., et al., *CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **74**: p. 274-83.
99. Komarov, P.G., et al., *A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy*. Science, 1999. **285**(5434): p. 1733-7.
100. Balmer, M.T., et al., *Doxorubicin and 5-fluorouracil induced accumulation and transcriptional activity of p53 are independent of the phosphorylation at serine 15 in MCF-7 breast cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(8): p. 1000-12.
101. Toko, H., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II δ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2010. **122**(9): p. 891-9.
102. Sardao, V.A., et al., *Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in H9c2 cardiomyoblasts*. Cancer Chemother Pharmacol, 2009. **64**(4): p. 811-27.
103. Munro, S. and H.R. Pelham, *A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins*. Cell, 1987. **48**(5): p. 899-907.
104. Berger, C.L., et al., *A lymphocyte cell surface heat shock protein homologous to the endoplasmic reticulum chaperone, immunoglobulin heavy chain binding protein BIP*. Int J Cancer, 1997. **71**(6): p. 1077-85.
105. Lu, M., et al., *Prevention of Doxorubicin cardiopathic changes by a benzyl styryl sulfone in mice*. Genes Cancer, 2011. **2**(10): p. 985-92.
106. Kim, S.J., et al., *Doxorubicin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(2): p. 463-8.
107. Lou, Y., et al., *Resveratrol prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in H9c2 cells through the inhibition of endoplasmic reticulum stress and the activation of the Sirt1 pathway*. Int J Mol Med, 2015. **36**(3): p. 873-80.
108. Suzuki, T., et al., *Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells*. Arch Biochem Biophys, 2007. **468**(1): p. 1-14.

109. Chang, Y.J., et al., *GRP78 knockdown enhances apoptosis via the down-regulation of oxidative stress and Akt pathway after epirubicin treatment in colon cancer DLD-1 cells*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35123.
110. Virrey, J.J., et al., *Stress chaperone GRP78/BiP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(8): p. 1268-75.
111. Pi, L., et al., *Knockdown of glucose-regulated protein 78 abrogates chemoresistance of hypopharyngeal carcinoma cells to cisplatin induced by unfolded protein in response to severe hypoxia*. Oncol Lett, 2014. **7**(3): p. 685-692.
112. Olson, R.D., et al., *Doxorubicin cardiac dysfunction: effects on calcium regulatory proteins, sarcoplasmic reticulum, and triiodothyronine*. Cardiovasc Toxicol, 2005. **5**(3): p. 269-83.
113. Bailey, R.W., et al., *Sequence of physical changes to the cell membrane during glucocorticoid-induced apoptosis in S49 lymphoma cells*. Biophys J, 2009. **96**(7): p. 2709-18.
114. Kociol, R.D., et al., *Troponin elevation in heart failure prevalence, mechanisms, and clinical implications*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(14): p. 1071-8.
115. Kang, Y., et al., *Two-dimensional speckle tracking echocardiography combined with high-sensitive cardiac troponin T in early detection and prediction of cardiotoxicity during epirubicin-based chemotherapy*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(3): p. 300-8.
116. Lipshultz, S.E., et al., *Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury*. Circulation, 1997. **96**(8): p. 2641-8.
117. Stoddard, M.F., et al., *Prolongation of isovolumetric relaxation time as assessed by Doppler echocardiography predicts doxorubicin-induced systolic dysfunction in humans*. J Am Coll Cardiol, 1992. **20**(1): p. 62-9.
118. Aas, T., et al., *Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients*. Nat Med, 1996. **2**(7): p. 811-4.
119. Shizukuda, Y., et al., *Targeted disruption of p53 attenuates doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice*. Mol Cell Biochem, 2005. **273**(1-2): p. 25-32.
120. Feridooni, T., et al., *Cardiomyocyte specific ablation of p53 is not sufficient to block doxorubicin induced cardiac fibrosis and associated cytoskeletal changes*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22801.
121. Vila-Petroff, M., et al., *CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(4): p. 689-98.
122. Yang, Y., et al., *Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(6): p. H3065-75.
123. Bers, D.M., *CaMKII inhibition in heart failure makes jump to human*. Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1044-6.
124. Guglin, M., et al., *Introducing a new entity: chemotherapy-induced arrhythmia*. Europace, 2009. **11**(12): p. 1579-86.
125. Fischer, T.H., et al., *Ca(2+) /calmodulin-dependent protein kinase II equally induces sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak in human ischaemic and dilated cardiomyopathy*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(12): p. 1292-300.
126. van Oort, R.J., et al., *Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure*. Circulation, 2010. **122**(25): p. 2669-79.
127. Liu, H., et al., *Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca²⁺ increases and cell death*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 12858-62.

128. Lamb, H.K., et al., *The affinity of a major Ca²⁺ binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8796-805.
129. Alder, N.N., et al., *The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2005. **168**(3): p. 389-99.
130. Sharma, A., K. Singh, and A. Almasan, *Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage*. Methods Mol Biol, 2012. **920**: p. 613-26.
131. Cervelli, T., et al., *Processing of recombinant AAV genomes occurs in specific nuclear structures that overlap with foci of DNA-damage-response proteins*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 3): p. 349-57.
132. Hidalgo, C., et al., *Redox regulation of RyR-mediated Ca²⁺ release in muscle and neurons*. Biol Res, 2004. **37**(4): p. 539-52.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten allgemeinen Chemikalien...	24
Tabelle 2.1.2: Übersicht über die verwendeten Komplettsysteme und Kits.....	25
Tabelle 2.1.3: Allgemeine Verbrauchsmaterialien.	25
Tabelle 2.1.4: käufliche Medien und Lösungen für die Zellkultur.	29
Tabelle 2.1.6: Primärantikörper für Western Blotting.....	31
Tabelle 2.1.7: Für die Western Blot Detektion verwendete Sekundärantikörper.	31
Tabelle 2.1.8: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz.....	31
Tabelle 2.1.9: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	32
Tabelle 2.1.10: Sequenzen der verwendeten Realtime PCR Primer.	33
Tabelle 2.1.11: Verwendete Geräte.....	33
Tabelle 2.1.12: Verwendete Software zur Auswertung und Analyse.....	34
Tabelle 2.2.1: Behandlung von NRVCM mit Doxorubizin. Volumina der verwendeten Medien sowie Herstellung und eingesetztes Volumen der Vorverdünnung.....	46

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Strukturformel von Doxorubicin-Hydrochlorid.....	12
Abbildung 1.1.2: Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz in Abhängigkeit von der kumulativen Gesamtdosis Doxorubizin.....	13
Abbildung 1.2.1: Schematische Darstellung der an der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase beteiligten Proteine und deren Interaktion.	16
Abbildung 3.1.1: Anzeichen einer Kardiomyopathie 21 Tage nach Doxorubizininjektion.....	55
Abbildung 3.1.2: GRP78 Expression zu zwei Zeitpunkten nach der Injektion von Doxorubizin.	56
Abbildung 3.2.1: Nachweis des Zellsterbens verursacht durch Apoptose und Nekrose.	57
Abbildung 3.2.2: Veränderung der GRP78 Expression bei steigenden Doxorubizin Dosen....	58
Abbildung 3.2.3: Doxorubizin induzierte Veränderungen der GRP78 Expression.	59
Abbildung 3.2.4: Zeitliche Aktivierung des Zelltodes durch Doxorubizin.....	60
Abbildung 3.2.5: Nachweis von Apoptose durch den TUNEL Assay.....	61
Abbildung 3.2.6: Untersuchung des oxidativen Stress nach Doxorubizinbehandlung.	62
Abbildung 3.2.7: Untersuchung der Antwort auf DNA-Schädigung nach Doxorubizinbehandlung.....	63
Abbildung 3.2.8: Veränderungen in der Expression von Regulatoren der Ca^{2+} -Homöostase (PLN, CaMKII) im Zeitverlauf.....	64
Abbildung 3.3.1: Einfluß des Knockdowns von GRP78 auf Doxorubizintoxizität und Zelltod.	65

Abbildung 3.3.2: Expression von GRP78 und CHOP nach GRP78 Knockdown mit gleichzeitiger Doxorubizinbehandlung.....	66
Abbildung 3.3.3: Relative Zelltoderhöhung durch die Behandlung mit 0,5µM Doxorubizin..	67
Abbildung 3.4.1: Auswertung der Apoptoseaktivierung nach Doxorubizingabe in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung und der Stärke der Überexpression.....	68
Abbildung 3.4.2: Dosisabhängigkeit des antiapoptotischen Effekts der GRP78 Überexpression.....	68
Abbildung 3.4.3: Einfluß der GRP78 Überexpression auf die Doxorubizin-induzierte Caspase-3 Aktivierung.....	69
Abbildung 3.4.5: Einfluß der GRP78 Überexpression auf den Prozentsatz TUNEL positiver Zellen nach Doxorubizinbehandlung.....	70
Abbildung 3.4.4: Einfluß der GRP78 Behandlung auf den Doxorubizin induzierten Zelltod im ToxiLight Assay.....	70
Abbildung 3.4.6: Bildung von H ₂ O ₂ nach Doxorubizinbehandlung mit und ohne GRP78 Überexpression.....	71
Abbildung 3.4.7: Veränderungen der Aktivierung von Caspase3 und der Expression von p53 im Zusammenhang mit der Überexpression von GRP78.....	72
Abbildung 3.4.8: Phosphorylierung der Regulatoren der Ca ²⁺ -Homöostase PLN, und CaMKII.....	73
Abbildung 3.4.9: Exemplarische Western Blots zu den in Abbildung 3.4.8 dargestellten Ergebnissen.....	74
Abbildung 3.5.1: Übersicht über das <i>in vivo</i> Modell der Doxorubizin induzierten Kardiotoxizität.....	75
Abbildung 3.5.2: GRP78 Proteinexpression am Versuchsende ca. 45 Tage nach der ersten Doxorubizininjektion.....	75
Abbildung 3.5.3: Level des myokardialen Zelltodmarkers hsTnT im Plasma 27h nach Injektion von 5mg/kg Doxorubizin.....	76
Abbildung 3.5.4: Verlauf des Körpergewichts und des Überlebens während der Behandlung mit einer kumulativen Doxorubizindosis von 20 mg/kg.....	77
Abbildung 3.5.5: Einfluß der GRP78 Überexpression auf Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion <i>in vivo</i>	78
Abbildung 3.5.6: Einfluß der GRP78 auf sensitivere Parameter der Herzfunktion <i>in vivo</i>	79
Abbildung 3.5.7: Veränderung des Relaxationsparameters Tau Mirsky.....	79
Abbildung 4.4.1: Schematische Darstellung der durch Doxorubizin beeinflussten Signalwege.....	89

6.3 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
A	Adenin
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca ²⁺	Ca ²⁺
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Proteinkinase II
cDNA	Komplementäre DNA
CHOP	C/EBP homologes Protein
CMV	Cytomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxorubizin
EF	Ejektionsfraktion
ER/SR	Endoplasmatisches/Serkoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extrazelluläre signalregulierte Proteinkinase

	1 und 2
FS	Verkürzungsfraction
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRP78	Glukose reguliertes Protein (auch BiP)
h	Stunden
H2Omp	Millipore Wasser
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IRE1	<i>inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease 1</i>
kb	Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
Luc	<i>Firefly</i> Luciferase
MAPKinase	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
Met	Methionin
MLC	Myosinleichtkette 2v
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NFkappaB	<i>Nuclear Factor κB of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
NRVCM	Neonatale ventrikuläre Rattenkardiomyozyten
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PERK	<i>pancreatic ER kinase</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PLN	Phospholamban
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
siRNA	<i>small interferingRNA</i>
T	Thymin
Thr	Threonin
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
ÜN	über Nacht
Vg	Virusgenome
z.B.	zum Beispiel