

Aus dem
CharitéCentrum für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin CC 11
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Burkert Pieske

Habilitationsschrift

Untersuchung ARC-vermittelter zytoprotektiver Effekte in Herz, Leber und Hirn

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin und Kardiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Stefan Donath

Eingereicht: März 2018
Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Thum, PhD, Hannover
2. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Maack, Würzburg

Für
Kathi, Amélie, Linnéa, Jakob, Elijah, Madeleine, Noah und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
1. Einleitung	6
1.1 Apoptose.....	6
1.2 Programmierte Nekrose und Nekroptose	8
1.3 Pathophysiologische Bedeutung von Apoptose und Nekrose bei Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutem Leberversagen und Schlaganfall	9
1.4 TAT-Protein Transduktion.....	13
1.5 Der Apoptose Repressor mit Caspasen-Rekrutierungsdomäne (ARC).....	14
1.6 Zielsetzung.....	15
2. Eigene Arbeiten	17
2.1 Funktionelle Bedeutung von endogenem ARC im Rahmen von biomechanischem und ischämischem Stress	18
2.2 Funktionelle Bedeutung von endogenem und ektoem ARC bei der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität neonataler Rattenkardiomyozyten	30
2.3 Therapeutische Bedeutung der TAT-ARC Protein Transduktion im akuten fulminanten Leberversagen	42
2.4 Therapeutische Bedeutung von ektoem ARC bei Paracetamol-induzierter hepatozellulärer Nekrose	56
2.5 Pathophysiologische und therapeutische Bedeutung von endogenem und ektoem ARC beim Schlaganfall der Maus	67
3. Diskussion	86
4. Zusammenfassung	92
5. Literaturangaben	95
Danksagung	103
Erklärung	104

Abkürzungen

ACC	N-Acetylcystein
AMPA	D,L-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazolpropionsäure
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ARC	Apoptose Repressor mit Caspasen-Rekrutierungsdomäne
ASK1	Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1
BAX	BCL-2 Associated X Protein
BCL-2	B-Cell Lymphoma-2
BH	BCL-2 Homology
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist
CARD	Caspasen-Rekrutierungsdomäne
CD95	Fas Rezeptor
CK2	Casein Kinase 2
ConA	Concanavalin A
CsA	Cyclosporin A
CTL	zellschädigende T-Lymphozyten
dATP	desoxy-Adenosin-Tri-Phosphat
DAXX	Death Domain Associated Protein
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signalling Complex
FADD	Fas Associated Death Domain Protein
FAS	auch FAS Rezeptor
FASL	Fas-Ligand
GalN/LPS	D-Galaktosamin/Lipopolysaccharid
GSH	Gluthation
HMGB1	High Mobility Group Protein B1
I κ B α	Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-cells Inhibitor Alpha
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase

JNK 1-3	c-Jun N-Terminal Kinase 1-3
Jo2	agonistischer Fas Antikörper
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen
MCAo	Arteria cerebri media Verschluss
MMP	mitochondriale Membranpermeabilisierung
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
NAPQI	N-Acetyl-p-Benzoquinone Imine
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer Of Activated B Cells
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P/E	Prolin/Glutamat
PTD	Protein Transduktionsdomäne
RIP	Receptor Interacting Protein
RIP1	Receptor Interacting Protein 1
RIP3	Receptor Interacting Protein 3
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
tBID	trunkiertes Bid
TAT- β Gal	TAT- β -Galaktosidase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TNFR1	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1
TRAIL	Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R1/2	Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor

1. Einleitung

1.1 Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um einen streng regulierten programmierten Zelltod, der durch typische zellmorphologische Veränderungen gekennzeichnet ist und zum Absterben überschüssiger oder geschädigter Zellen führt.^{1,2,3} Dadurch trägt die Apoptose sowohl zur Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase unter physiologischen Bedingungen als auch zur Elimination von geschädigten Zellen unter pathologischen Bedingungen bei. Regulatorisch liegt der Apoptose ein komplexes Zusammenspiel verschiedener pro- als auch antiapoptotischer Signalkaskaden zugrunde. Kommt es durch ein Überwiegen proapoptotischer Stimuli oder einen Wegfall antiapoptotischer Schutzmechanismen zu einer Aktivierung sogenannter Caspasen, wird der programmierte Zelltod letztendlich vollstreckt.⁴ Dabei führt der aktiv gesteuerte Ablauf charakteristischer molekularer und zellmorphologischer Stadien schließlich zum vollständigen und rückstandslosen Zellabbau, ohne wie beim nekrotischen Zelltod einen Verlust der Membranintegrität mit nachfolgender Entzündungsreaktion zu bedingen.^{1,2,3} Grundsätzlich kann die Apoptose durch zwei verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden eingeleitet werden. Es werden der intrinsische, mitochondrial-vermittelte und der extrinsische, rezeptor-vermittelte Signalweg unterschieden.^{5,6} Der intrinsische, mitochondriale Apoptoseweg kann durch verschiedene extra- und intrazelluläre Zelltodsignale wie Ischämie bzw. Hypoxie, reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), zelltoxische Substanzen, radioaktive Strahlung und Mangel an Nährstoffen bzw. Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Hierbei führt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Proteine der sogenannten BCL-2 Familie in der Regel zu einer Aktivierung von proapoptotischem BID und/oder BAX, was in einer BAX Translokation vom Zytoplasma zur äußeren mitochondrialen Membran resultiert und eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran bedingt.^{7,8,9} Aus der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran resultiert eine Freisetzung von intermembranösen Proteinen wie Cytochrom c, Apoptosis Inducing Factor, Smac/Diablo und Endonuklease G ins Zytoplasma der Zelle.¹⁰⁻¹³ Zytosolisches Cytochrom c bildet gemeinsam mit desoxy-Adenosin-Tri-Phosphat (dATP), Apoptotic Protease Activating Factor-1 (APAF-1) und Procaspase-9 einen Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird und nachfolgend zur Aktivierung der Initiator-Caspase

Procaspase-9 führt.^{14,15} Caspase-9 aktiviert die Effektor-Caspase Caspase-3, die als Protease verschiedene intrazelluläre Eiweiße spaltet und damit deren Abbau sowie die Aufhebung der Zellstruktur einleitet.¹⁶ Der extrinsische Apoptoseweg wird durch Bindung spezifischer Liganden an in der Plasmamembran lokalisierte sogenannte „Todesrezeptoren“ bzw. „Death Receptors“ vermittelt. Zur Familie der Todesrezeptoren gehören eine Vielzahl von transmembranösen Proteinen, von denen die Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren (TNFR) und der Fas Rezeptor (CD95) die bedeutendsten sind.¹⁷ Die Aktivierung eines Todesrezeptors erfolgt nach spezifischer Bindung eines löslichen oder membrangebundenen Liganden (z.B. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α), Fas-Ligand (FasL)) an die extrazelluläre Bindungsstelle. Im Fas Rezeptor kommt es nach Bindung von FasL an den Rezeptor zu einer Zusammenlagerung mehrerer membranöser Rezeptoren und Approximation der intrazellulären Death Domains (DD).¹⁸ Hierdurch wird die Bindung des intrazellulären Adapter-Proteins Fas Associated Death Domain Proteins (FADD) ermöglicht, das ebenfalls eine DD besitzt und über diese mit der DD von Fas interagieren kann. Über die Death Effector Domain (DED) des FADD-Proteins findet eine Rekrutierung der Initiator-Caspase Procaspase-8 statt, die ebenfalls eine DED besitzt. Der aus Fas, FADD und Procaspase-8 gebildete Komplex wird als Death Inducing Signalling Complex (DISC) bezeichnet. Die Oligomerisierung mehrerer Procaspase-8 Proteine führt schließlich innerhalb des DISC durch autokatalytische Spaltung zur Aktivierung von Procaspase-8, die nachfolgend verschiedene Effektor-Caspasen, wie die Procaspasen-3, -6, und -7 aktiviert und zur Ausführung des Zelltodprogramms führt.¹⁶ Nicht in allen Zelltypen reicht die alleinige Aktivierung von Procaspase-8 zur Aktivierung von Procaspase-3 aus. In diesen Zellen wird zur Einleitung einer rezeptor-vermittelten Apoptose eine Verstärkung des Zelltodsignals durch eine zusätzliche Aktivierung des intrinsischen, mitochondrial-vermittelten Apoptosewegs notwendig. Nach Caspase-8-vermittelter Spaltung des proapoptotischen BH3-only-Proteins Bid kommt es zur mitochondrialen Translokation des trunkierten Bid (tBid), woraufhin Bax-vermittelt eine Freisetzung proapoptotischer Faktoren resultiert, die zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs führt.^{19,20}

1.2 Programmierte Nekrose und Nekroptose

Das Gleichgewicht zwischen zellulärer Proliferation und Zelltod ist von herausragender Bedeutung für die Homöostase höherer Organismen. Im Gegensatz zur Apoptose, handelt es sich bei nekrotischem Zelltod um einen Zelltod-Prozess, der mit akuter Zellschädigung zum Zusammenbruch der Zellmembran, Freisetzung von intrazellulären Proteinen ins umliegende Gewebe und daraus resultierender inflammatorischer Infiltration verbunden ist.³ Bis vor kurzem vertrat die Lehrmeinung, dass es sich bei nekrotischem Zelltod stets um die Folge eines unspezifischen Zellschadens oder Traumas handelt. Mit der Identifizierung spezifischer molekularer Mediatoren in der Signalkaskade der programmierten Nekrose hat die Erforschung des nekrotischen Zelltods eine Renaissance erfahren. Als Konsequenz der zugrundeliegenden Signaltransduktionskaskade entstand der Terminus „programmierte Nekrose“ zur Differenzierung Tumor Nekrose Faktor (TNF)-vermittelter Nekrose von unspezifischen Nekroseformen z. B. hervorgerufen durch Hitze oder Schock.^{21,22} Als Nekroptose wird programmierte, Receptor Interacting Protein 1 (RIP1)-abhängige Nekrose bezeichnet, die durch Zytokine induziert wird.^{23,24} Es ist mittlerweile klar, dass TNF-abhängige Signaltransduktion zumindest zu 3 verschiedenen Szenarien führen kann: Aktivierung von Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer Of Activated B Cells (NF- κ B), Apoptose oder programmierter Nekrose. Experimentelle Ergebnisse zeigen dabei, dass die Aktivierung einer Zellantwort oft die anderen inhibiert. Wenn die NF- κ B Aktivierung durch Synthese makromolekularer Inhibitoren oder Expression dominant-negativer Mutanten des negativen Regulators Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-cells Inhibitor Alpha ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) inhibiert ist, induziert TNF Apoptose.²⁵ Auf der anderen Seite wird eine TNF-abhängige Tumorrogression durch nekrotischen Zelltod hervorgerufen.²⁶ RIP1 und RIP3 spielen eine kritische Rolle bei der Nekroptose-vermittelten mitochondrialen Dysfunktion. In einigen Zelltypen führt die Ligation von Todesrezeptoren (z.B. TNFR) zur Formation einer supramolekularen Plattform aus Caspase-8, dem Adapter Protein FADD und RIP1.²⁷ Aktivierte Caspase-8 spaltet und inaktiviert RIP1. Caspase-8 initiiert die Caspasen-Kaskade, die in der Vollstreckung des extrinsischen Apoptose Signalwegs resultiert. In Zellen, die das RIP1 Homolog RIP3 exprimieren und deren Caspasen-Kaskade nicht adäquat aktiviert werden kann, führt die TNFR Ligation zur Formation eines Multiprotein Komplex aus Caspase-8, FADD, RIP1 und RIP3.²⁷ In dieser Zusammensetzung interagiert RIP3

mit verschiedenen bioenergetisch wirksamen Enzymen wie Glykogen Phosphorylase, Glutamat Ammonium Ligase und Glutamat Dehydrogenase 1, was zur Steigerung ihrer katalytischen Aktivität führt.²⁸ Die verstärkte Glykogenolyse führt zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, die wiederum die mitochondriale Membranpermeabilisierung (MMP) triggern und die TNF-induzierte programmierte Nekrose bewirken.²⁸

1.3 Pathophysiologische Bedeutung von Apoptose und Nekrose bei Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutem Leberversagen und Schlaganfall

Die koronare Herzkrankheit ist mit ihrer Akutmanifestation dem Herzinfarkt die häufigste Todesursache in den Industrienationen.²⁹ Der programmierte Zelltod spielt eine wichtige Rolle für die Pathogenese zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen.³⁰ Im Rahmen eines Myokardinfarkts kommt es beim akutem Verschluss einer Koronararterie im unterversorgten Gefäßareal zu einem massiven Absterben von Kardiomyozyten wie auch von anderen im Infarktareal vorkommenden Zellen. Dabei spielen sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse eine Rolle.³¹ *In vivo* und *in vitro*-Untersuchungen an FAS-Knockout-Mäusen, die unter Ischämiebedingungen gegenüber Kontrolltieren signifikant kleinere Infarktareale und weniger Apoptose aufweisen, belegen die Bedeutung des extrinsischen Signalwegs bei der Ischämie-bedingten myokardialen Apoptose.^{32,33} Ebenso konnte für den mitochondrial-vermittelten Apoptoseweg eine bedeutsame Rolle im Rahmen der myokardialen Ischämie nachgewiesen werden. BAX-Knockout-Mäuse zeigten gegenüber Kontrolltieren postischämisch relevant kleinere Infarktareale und eine bessere LV-Funktion.³⁴ Hierzu passend führte die Überexpression von antiapoptotisch wirkendem BCL-2 als auch die Anwendung synthetischer Caspase-Inhibitoren bei kardialer Ischämie im Tiermodell zu einer verringerten Apoptoserate und gegenüber Kontrolltieren kleineren Infarktarealen.³⁵⁻³⁷ Tierexperimentell zeigten sich auch nach Hemmung der Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP) durch Cyclosporin A (CsA) signifikant reduzierte Apoptoseraten und Infarktgrößen im Ischämie-Reperfusionsschaden. Klinische Studien im ST-Hebungsinfarkt konnten beim Menschen jedoch zusätzlich zur Koronarintervention keinen Effekt einer CsA Therapie gegenüber Placebo zeigen.^{38,39}

Die Prognose von Patienten mit Herzinsuffizienz ist aufgrund einer anhaltend hohen Morbidität und Mortalität schlecht.^{40,41} Untersuchungen humaner Herzen terminal herzinsuffizienter Patienten belegen eine niedrige aber abnormal erhöhte kardiomyozytäre Apoptoserate.^{42,43} Induzierbare Caspase-8 transgene Mäuse, die eine kardiomyozytäre Apoptoserate unterhalb der bei Patienten mit Herzinsuffizienz detektierten aufweisen, deuten auf eine kausale Genese der Apoptose in der Entstehung der Herzinsuffizienz hin.⁴⁴ So führt die induzierbare Caspase-8 Überexpression in der Maus zur Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie mit nachfolgend tödlichem Herzversagen.⁴⁴ In ähnlicher Weise führt die Inhibition kardioprotektiver antiapoptotischer Signaltransduktionswege im Myokard unter Stressbedingungen zu einer gesteigerten Kardiomyozytenapoptose und Ausbildung einer Herzinsuffizienz.⁴⁵ Die geschilderten Zusammenhänge belegen eine kausale Rolle des programmierten Zelltods in der Entstehung des Ischämie-Reperfusionsschadens sowie bei der Herzinsuffizienz. Darüber hinaus stellt die Beeinflussung apoptotischer Signaltransduktion einen vielversprechenden Ansatz in der Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen dar.

Untersuchungen sowohl im Tierexperiment als auch beim Menschen haben ergeben, dass generell der apoptotische Zelluntergang beim akuten Leberversagen unterschiedlicher Ursache - wie beispielsweise viraler Hepatitis, Paracetamolvergiftung, Knollenblätterpilzintoxikation, Morbus Wilson und dem HELLP-Syndrom – entscheidend für die Entwicklung des Leberversagens ist.⁴⁶⁻⁴⁹ Darüber hinaus kommt es stimulus-abhängig insbesondere beim Ischämie-Reperfusionsschaden zum nekrotischen Zelltod. In der Pathophysiologie verschiedener Lebererkrankungen, wie z.B. dem akuten Leberversagen spielt der todesrezeptor-vermittelte Apoptose-Signalweg eine herausragende Rolle.⁵⁰ Hierbei führt die Aktivierung verschiedener Todesrezeptoren wie FAS, TNFR1 und Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor (TRAIL-R1/2) durch Bindung ihrer entsprechenden Liganden (FASL, TNF α , TRAIL) zur Aktivierung weiterer Adaptermoleküle (FADD, TRADD) und letztlich zur Aktivierung von Caspase-8.^{51,52} Caspase-8 bewirkt eine Prozessierung von Procaspase-3 zu Caspase-3, die als Effektor-Caspase direkt und indirekt die Zellestörung vermittelt. Darüber hinaus führt aktivierte Caspase-8 in Hepatozyten zu einer Trunkierung des BCL-2 Familienmitglieds BID (tBID), was im Sinn einer Amplifikation des Todesrezeptor-Signalwegs zu einer Aktivierung der mitochondrialen

Apoptosekaskade führt. Die Bedeutung der BID-vermittelten Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs für Fas-induziertes Leberversagen wird an BID-defizienten Mäusen demonstriert, die eine weitgehende Resistenz aufweisen.⁵³ Gerken und Canbay konnten in ihren Untersuchungen zur Bedeutung des Zelltods bei Lebererkrankungen folgendes zeigen:

„Ein weiterer Pathomechanismus der akuten und chronischen Leberschädigung ist die immunvermittelte Apoptose. Diese kann in der Leber durch Expression von Fremdproteinen und körpereigenen Antigenen induziert werden. Zellschädigende T-Lymphozyten (CTL) sind für die antigengerichtete Zellelimination von größter Bedeutung.“⁵⁴

Das Concanavalin A (ConA) Modell ist ein etabliertes Modell der T-Zell-vermittelten, TNF α -abhängigen Leberschädigung.⁵⁵ *In vivo*-Mausstudien zum akuten Leberversagen, bei denen gegen FAS und Caspase-8 gerichtete siRNAs therapeutisch eingesetzt wurden, führten zu einer signifikanten Senkung der Mortalität nach Stimulation mit ConA oder agonistischem Fas Antikörper (Jo2).^{56,57} Vielversprechende Ergebnisse zeigt eine Untersuchung, die Effekt und Wirkmechanismus von Suramin im akuten Leberversagen analysierte.⁵⁸ Durch reduzierte DISC-Aktivierung und Inhibition von Initiator-Caspasen führt Suramin *in vitro* und *in vivo* zu einer Reduktion des FAS- und TNF α -vermittelten Leberschadens ohne einen Effekt auf nekrotischen Zelltod nach Lebertransplantation in der Ratte auszuüben.⁵⁸

Der Schlaganfall gehört zu den führenden Ursachen für Tod und schwere Behinderung in den Industrienationen.⁵⁹ Gegenwärtig sind die Thrombolyse und die „stroke unit“ die einzigen therapeutischen Ansätze, die zu einer Verbesserung der Prognose geführt haben.⁵⁹ Die zerebrale Ischämie initiiert eine ischämische Kaskade, die schließlich innerhalb von Minuten nach Ischämiebeginn zum Zelltod im ischämischen Kern führt. Daher zielen neuroprotektive Therapieansätze auf eine Inhibition der ischämischen Signaltransduktionskaskade zur Erhaltung viabler Neurone in der ischämischen Penumbra. Dieses Konzept beinhaltet die Inhibition pathologischer molekularer Ereignisse die zum Einstrom von Kalzium, oxidativem Stress und neuronalem Zelltod führen.⁶⁰ Trotz ermutigender Ergebnisse aus Tierstudien sind klinische Studien neuroprotektiver Therapien bislang erfolglos verlaufen. Aufgrund der geringen therapeutischen Effektivität der Hirn Protektion

beim Schlaganfall sind neue Ansätze notwendig, die über einen Schutz von Neuronen zu einer Verbesserung von Infarktgröße, Mortalität und Hirnfunktion führen. Therapeutische Ansätze, die auf eine Verhinderung des neuronalen Zelltods abzielen sind aufgrund der Aktivierung multipler maladaptiver Signaltransduktionswege, verschiedener Zelltod Mechanismen und einem begrenzten therapeutischen Fenster limitiert. Geschädigte Neurone sterben häufig durch Nekrose, wohingegen apoptotischer Zelltod nach zerebraler Ischämie insbesondere bei mildem exzitotoxischem Schaden prävaliert.⁶¹ Zerebrale Ischämie triggert beide zentralen Apoptose Signaltransduktionswege, den extrinsischen Todesrezeptor-Signalweg sowie den intrinsischen, mitochondrialen Todessignalweg. Beide resultieren in der Aktivierung von Caspasen, die zur proteolytischen Destruktion der Zelle führen.⁶² Unter zerebraler Ischämie kommt es durch Glutamat-vermittelte Stimulation von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) oder D,L-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazolpropionsäure (AMPA) Rezeptoren zur Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration.⁶⁰ Erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel aktivieren Calpains und führen zu einer Trunkierung von BID, die in einer Caspase-3 Aktivierung resultiert. Tierexperimentelle Daten belegen beim Schlaganfall eine kritische Rolle für den FAS und TNFR-Signalweg.^{63,64} Stress-induzierte Signale wie DNA Schädigung initiieren eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptogenen Faktoren, die zu einer Rekrutierung und Aktivierung der Initiator-Caspase-9 führen.⁶⁰ Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK) reagieren auf extrazelluläre Stimuli mit der Regulation zahlreicher zellulärer Aktivitäten wie Genexpression, Mitose, Differenzierung und Apoptose.⁶⁵ c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) und p38 MAPK sind wichtige Glieder der MAPK Superfamilie und Schlüsselmodulatoren der Apoptose.⁶⁶ JNK ist eine wichtige stress-induzierbare Kinase, die nach fokaler und globaler Ischämie in Modellen der transienten und permanenten Ischämie aktiviert wird.^{67,68} Die JNK Familie besteht aus 3 Isoformen: JNK1, JNK2 und JNK3. JNK3 ist verantwortlich für stress-induzierte JNK Aktivität und JNK3 Defizienz oder JNK-Inhibitor Behandlung schützt Maushirne nach zerebraler Ischämie/Hypoxie.^{69,70} Darüber hinaus konnte für JNK gezeigt werden, dass es für die Induktion und Aktivierung der BH3-only-Proteine BAX und BIM bzw. von FAS verantwortlich ist.⁷¹⁻⁷³ Die Induktion von Bim und Fas bei der Hirnischämie ist in JNK3-defizienten Mäusen und nach Applikation des JNK-Inhibitors SP600125 inhibiert.⁶⁹ MKK4 ist eine proximal agierende Kinase, die JNK nach zerebraler

Ischämie aktiviert. Die Aktivierung von MKK4 wird durch Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) reguliert. Death Domain Associated Protein (DAXX) bindet und aktiviert ASK1 und Überexpression einer ASK1 Mutante inhibiert FAS- und DAXX-induzierte Apoptose und JNK Aktivierung.^{74,75} DAXX wird ubiquitär exprimiert und DAXX Translokation zwischen dem Zellkern und Zytoplasma scheint eine wichtige Rolle bei der Apoptose Regulation zu spielen.^{76,77} DAXX ist primär im Nukleus anzutreffen, wohingegen es nach ASK1 Überexpression als proapoptotischer Mediator im Zytoplasma vorgefunden wird.⁷⁸

1.4 TAT-Protein Transduktion

Die rasche Aktivierung der Apoptosemaschinerie erfordert zeitnah effiziente intrazelluläre Wirkspiegel therapeutisch-antiapoptotischer Faktoren. Virale gentherapeutische Ansätze (Adenoviren, Adeno-assoziierte-Viren) erscheinen aufgrund ihrer Expressionskinetik und immunologischen Reaktionen als klinisch eher ungeeignet. In ähnlicher Weise sind siRNA-vermittelte Ansätze nicht in der Lage bereits aktivierte proapoptotische Signalkaskaden zu inhibieren. Im Gegensatz dazu ermöglicht die TAT-Protein Transduktionsmethode bei geringem kanzerogenem und immunogenem Risiko einen umgehenden und effizienten Proteintransfer biologisch aktiver Proteine. Green und Frankel beschrieben 1988 erstmals das HIV-TAT-Protein als ein die Lipiddoppelmembran durchdringendes Protein.^{79,80} Verantwortlich für die Fähigkeit des HIV-TAT-Proteins zur Proteintransduktion ist die 11 Aminosäuren (YGRKKRRQRRR) große Protein Transduktionsdomäne (PTD).⁸¹ Ihre besondere Bedeutung hat die PTD dadurch erlangt, dass sie als Fusionsprotein anderen Proteinen eine von Rezeptoren und speziellen Transportsystemen unabhängige Membranpermabilisierung ermöglicht.⁸¹ Dabei führt die stark positive Ladung der PTD zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Phospholipidmembran, die in einer Proteinaufnahme durch Makropinozytose resultiert.^{81,82} Die PTD kann somit als Carriermolekül fungieren, um biologisch funktionale Proteine ins Zytosol von Zellen zu schleusen.⁸¹ Nach Zerfallen der instabilen Makropinosome kommt es schließlich zur Protein-Freisetzung und Wirkentfaltung.⁸¹ *In vitro*-Versuche belegen die biologische Aktivität der transduzierten Proteine innerhalb der Zelle.^{81,83} Darüber hinaus konnte nach intraperitonealer Injektion des 120 kDa großen Fusionsproteins TAT-β-Galaktosidase

(TAT-βGal) in die Maus eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke sowie eine Verteilung des Proteins im gesamten Organismus beobachtet werden.^{81,84}

1.5 Der Apoptose Repressor mit Caspasen-Rekrutierungsdomäne (ARC)

ARC ist ein Apoptose Repressor, der erstmals 1998 von Koseki et al. beschrieben wurde.⁸⁵ Das humane ARC Gen befindet sich auf Chromosom 16q21-q23 und umfasst 4 Exons und 3 kurze Introns. Humanes ARC Protein wird von Exon 2 bis 4 gebildet und besteht aus 208 Aminosäuren, was zu einer kalkulierten molekularen Masse von 22,6 kDa führt.^{86,87} Ein Vergleich der ARC Proteinsequenz zwischen verschiedenen Spezies dokumentiert ein großes Maß an Konservierung. ARC besteht aus 2 funktionalen Regionen, der Caspasen-Rekrutierungsdomäne (CARD) und der Prolin/Glutamat (P/E)-reichen Region.⁸⁵ Die CARD von ARC weist eine ausgeprägte Homologie zur CARD von Caspase-2, RAIDD und APAF-1 auf.⁸⁵ Es konnte gezeigt werden, dass ARC Procaspase-8 und zumindest in Überexpressionsszenarios Procaspase-2 CARD-abhängig bindet.^{85,88} ARC kann mit sich selbst ebenfalls CARD-abhängig Dimere bilden, was zu einer deutlichen Abnahme der antiapoptotischen ARC-Wirkung führt.⁸⁸ Die P/E-reiche Region kann beträchtliche Mengen an Kalzium binden, was die Interaktion mit Procaspase-8 negativ reguliert.⁸⁹ Darüber hinaus wird die Interaktion mit Procaspase-8 durch eine Phosphorylierung am Threonin 149 innerhalb der P/E-reichen Region moduliert.⁹⁰ Weil ARC primär in langlebigen Geweben wie Herz und Skelettmuskel exprimiert wird, wurde untersucht ob ARC zur Apoptose Resistenz postmitotischer Muskelzellen beiträgt und eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der kardio-physiologischen Funktion spielt. Die herzspezifische ARC-Überexpression führt in Mäusen zu vergrößerten Herzen mit signifikant erhöhten Kardiomyozytenzahlen und verbesserter kontraktile Erholung nach Reperfusionsschaden.⁹¹ ARC Überexpression in Kardiomyozyten führte ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz gegenüber apoptotischer Signaltransduktion durch Kalzium-Überladung oder Hypoxie in ischämie-simulierenden *in vitro*-Modellen.⁹¹ Obwohl ARC in vielen Geweben physiologisch nicht exprimiert wird, weisen zahlreiche maligne Tumoren eine hohe ARC Expression auf. In diesem Sinn findet sich eine ARC Expression beim Pankreaskarzinom, kolorektalen Karzinom, Brustkrebs, Lungenkrebs, Prostatakrebs, Glioblastom, Melanom, Lymphom und anderen. In H9c2 Zellen

reguliert p53 die ARC Expression negativ.⁹² Umgekehrt kann endogenes ARC auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 direkt inhibieren. Neben der transkriptionellen Regulation von ARC wird die Protein Konzentration auch durch Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert. Proteasomale Degradation von ARC wird durch die E3-Ubiquitin Ligase MDM2 bewirkt.⁹³ ARC Überexpression führt in verschiedenen Geweben und Zellen zu einer Inhibition der apoptotischen Signaltransduktion. Im Gegensatz dazu werden Zellen mit reduzierten ARC Spiegeln empfindlicher gegenüber Apoptose. Extrinsische Apoptose initiiert durch Todesliganden CD95L/FasL und Tumor Nekrose Faktor kann durch ARC Überexpression inhibiert werden.⁸⁵ Die Inhibition ist dabei abhängig von der Interaktion der ARC CARD mit der DED von Procaspase-8 aber nicht anderer Caspasen wie Procaspase-1, -3, oder -9.⁸⁵ Neben der direkten Interaktion mit Procaspase-8 bindet endogenes ARC Fas und FADD und inhibiert damit die DISC Formation.⁸⁸ Darüber hinaus interagiert ARC mit Procaspase-2 unter Bedingungen der ARC Überexpression.⁸⁵ Eine direkte CARD-abhängige Interaktion von endogenem ARC mit Bax und damit dem mitochondrialen intrinsischen Todesweg wurde in einer Studie an H9c2 Zellen gezeigt, bei der ARC zu einer bedeutsamen Zytoprotektion des Ischämie-Reperfusionsschadens bzw. wasserstoffperoxid-vermittelten Zelltods führte.⁹⁴ Über die P/E-reiche Region kann ARC signifikante Mengen von Ca^{2+} binden. Apoptose, die durch Ca^{2+} Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum initiiert wird, kann durch ARC inhibiert werden.⁸⁹ Ebenso reduziert ektope ARC Expression signifikant zytosolische Ca^{2+} -Gradienten nach Thapsigargin oder A23187 Stimulation.⁸⁹ Somit belegen zahlreiche Studien eine spezifische Inhibition sowohl extrinsischer todesrezeptor-vermittelter, intrinsischer mitochondrial-vermittelter und ER-vermittelter Apoptose durch ARC.

1.6 Zielsetzung

Fulminante und subakute Zelltodprozesse spielen in der Pathogenese multipler Syndrome wie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutem Leberversagen und Schlaganfall eine herausragende Rolle. Eine pharmakologische oder molekulare Intervention mit dem Ziel einer Inhibition des fulminanten Zelltods stellt einen sinnvollen therapeutischen Ansatz zur Prävention und Therapie bei Erkrankungen mit massivem und akutem Zellverlust dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die

Bedeutung des Apoptose Repressor ARC für die Entstehung und Therapie von mit signifikantem Zelltod einhergehenden Syndromen wie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutem Leberversagen und Schlaganfall untersucht. Neben der funktionellen Relevanz von ARC wurden insbesondere die zugrundeliegenden protektiven molekularen Mechanismen in den verschiedenen Organsystemen Herz, Leber und Hirn *in vivo* und *in vitro* analysiert. Darüber hinaus wurde mit der Anwendung der TAT-ARC Protein Transduktion ein Therapieverfahren etabliert, dass eine unmittelbar funktionell-wirksame und effektive Behandlung darstellt.

Im Einzelnen wurden untersucht:

- der Einfluss von endogenem ARC beim Ischämie-Reperfusionsschaden sowie nach Druckbelastung durch Aortenkonstriktion bei der Maus (Kapitel 2.1)
- der Effekt von endogenem und ektoem ARC auf Überleben und Signaltransduktion neonataler Rattenkardiomyozyten im Rahmen doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität (Kapitel 2.2)
- der therapeutische Effekt und die molekularen Mechanismen von ektoem ARC auf Fas- und TNF-vermitteltes akutes Leberversagen bei der Maus *in vivo* und *in vitro* (Kapitel 2.3)
- die therapeutische Bedeutung und Signaltransduktion von ektoem ARC auf hepatozelluläre Nekrose im Rahmen der Paracetamol-induzierten Hepatotoxizität bei der Maus (Kapitel 2.4)
- der neuroprotektive Effekt von endogenem und ektoem ARC in *in vitro* und *in vivo*-Modellen der zerebralen Ischämie bei der Maus (Kapitel 2.5)

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit ist es zu einem besseren Verständnis der zytoprotektiven Effekte und Mechanismen von ARC im Rahmen von Apoptose und Nekrose beizutragen. Dies schließt insbesondere die präventive und therapeutische Anwendung von ektoem ARC als molekulares Target zur Therapie und zur Prävention von Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutem Leberversagen und Schlaganfall mit ein.

2. Eigene Arbeiten

2.1 **Donath S**, Li P, Willenbockel C, Al-Saadi N, Gross V, Willnow T, Martin U, Bauersachs J, Wollert KC, Dietz R, von Harsdorf R. ARC is required for cardioprotection in biomechanical and ischemic stress. *Circulation* 2006;113:1203-1212.⁹⁵

2.2 An J, Li P, Li J, Dietz R, **Donath S**. ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Med* 2009;87(4):401-410.⁹⁶

2.3 An J, Harms C, Lättig-Tünnemann G, Sellge G, Mandić AD, Malato Y, Heuser A, Endres M, Trautwein C, **Donath S**. TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain protein transduction rescues mice from fulminant liver failure. *Hepatology* 2012;56:715-726.⁹⁷

2.4 An J, Mehrhof F, Harms C, Lättig-Tünnemann G, Lee SLL, Endres M, Li M, Sellge G, Mandić AD, Trautwein C, **Donath S**. ARC is a novel therapeutic approach against acetaminophen-induced hepatocellular necrosis. *J Hepatol* 2013;58:297-305.⁹⁸

2.5 **Donath S**, An J, Lee SLL, Gertz K, Datwyler AL, Harms U, Müller S, Farr TD, Fächtemeier M, Lättig-Tünnemann G, Lips J, Foddis M, Mosch L, Bernard R, Grittner U, Balkaya M, Kronenberg G, Dirnagl U, Endres M, Harms C. Interaction of ARC and DAXX: A novel endogenous target to preserve motor function and cell loss after focal brain ischemia in mice. *J Neurosci* 2016;36:8132-8148.⁹⁹

2.1 Funktionelle Bedeutung von endogenem ARC im Rahmen von biomechanischem und ischämischem Stress

Donath S, Li P, Willenbockel C, Al-Saadi N, Gross V, Willnow T, Martin U, Bauersachs J, Wollert KC, Dietz R, von Harsdorf R. ARC is required for cardioprotection in biomechanical and ischemic stress. *Circulation* 2006;113:1203-1212.⁹⁵ doi-Nummer: [10.1161/CIRCULATIONAHA.105.576785](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.576785)

Der nachfolgende Text wurde von mir zur Bewerbung auf den Oskar-Lapp-Forschungspreis verfasst und entspricht dem Abstrakt „Funktionelle Bedeutung von endogenem ARC im Rahmen von biomechanischem und ischämischem Stress“, das auf der Internetseite der Oskar-Lapp-Stiftung publiziert wurde:

„Aufgrund der eingeschränkten kardialen Regenerationsfähigkeit führt der Herzmuskelzellverlust beim Herzinfarkt und der Herzinsuffizienz zu einer Abnahme der Pumpfunktion und nachfolgendem Herzversagen. Welche Rolle die Apoptose in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt und welche kardioprotektiven Faktoren auf molekularer Ebene einer Maladaptation entgegenwirken können ist noch weitgehend unklar. ARC wird primär in terminal differenzierten Geweben wie Herz und Hirn exprimiert. ARC ist bislang einzigartig im menschlichen Organismus, da ARC spezifisch beide apoptotischen Signalwege inhibieren kann.

Wir generierten ARC-defiziente Mäuse, die sich normal entwickelten und unter basalen Bedingungen keine Veränderungen in der Herzmorphologie und -funktion aufwiesen. Unter chronischer Druckbelastung durch Aortenkonstriktion bildeten diese Mäuse eine verstärkte Kardiomyopathie aus, die durch eine schwerwiegende Abnahme der Pumpfunktion, eine progressive linksventrikuläre Dilatation und eine verstärkte myokardiale Fibrosierung gekennzeichnet war. Desweiteren führte ein Ischämie-Reperfusionsschaden bei den ARC-defizienten Mäusen verglichen mit Wildtyp Kontrollmäusen zu um 50% größeren Herzinfarkten. Ursächlich für die gesehenen Befunde zeigte sich in beiden kardialen Stressmodellen ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate in den ARC-defizienten Tieren. Dabei konnte ein Einfluß von

ARC auf klassische hypertrophie-assoziierte kardiale Wachstumskaskaden in vivo und in vitro weitgehend ausgeschlossen werden. Die klinische Relevanz der im Mausmodell erhobenen Befunde wurde durch stark reduzierte myokardiale ARC Proteinspiegel terminal herzinsuffizienter Patienten belegt.

Unsere Arbeit identifiziert demnach einen gewebespezifischen antiapoptotischen Faktor, der in der Herzinsuffizienz herunterreguliert wird und zur Kardioprotektion bei Druckbelastung und Ischämie benötigt wird. Darüber hinaus belegt das in dieser Arbeit verwendete Modellsystem eine kausale Rolle der Apoptose in der Pathogenese der Herzinsuffizienz, da wachstums-assoziierte Veränderungen weitgehend ausgeschlossen werden konnten.“¹⁰⁰

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.576785>

2.2 Funktionelle Bedeutung von endogenem und ektoem ARC bei der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität neonataler Rattenkardiomyozyten

An J, Li P, Li J, Dietz R, **Donath S.** ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Med* 2009;87(4):401-410.⁹⁶ doi-Nummer: [10.1007/s00109-008-0434-z](https://doi.org/10.1007/s00109-008-0434-z)

Aufgrund des möglichen therapeutischen Nutzens einer ARC-Überexpression im Rahmen der Entstehung einer chemotherapie-induzierten Herzinsuffizienz, untersuchten wir nachfolgend die kardioprotektiven Effekte von ARC im Rahmen des Modells der Doxorubicin-vermittelten Kardiotoxizität an neonatalen Rattenkardiomyozyten.

Der mittlere Absatz des nachfolgenden Textes entspricht einem Abschnitt des Abstrakts der Arbeit "ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity."⁹⁶ doi-Nummer: [10.1007/s00109-008-0434-z](https://doi.org/10.1007/s00109-008-0434-z)

Das Anthrazyklin Doxorubicin ist ein bei unterschiedlichsten neoplastischen Erkrankungen mit großem Erfolg eingesetztes zytostatisches Medikament. Die Anwendung von Doxorubicin ist jedoch durch das Auftreten einer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz limitiert. Als Mechanismen der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie werden ein erhöhter oxidativer Stress, kardiale Apoptose und Inflammation angenommen. Ziel dieser Studie war die Untersuchung des therapeutischen Effekts von ARC sowie der zugrundeliegenden Mechanismen auf kardiomyozytäre Apoptose am Modell der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität.

„Die einmalige Stimulation von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit Doxorubicin führte zu einer prä- als auch posttranslationalen Herunterregulation von ARC mRNA und Protein Konzentration, die mit dem Auftreten einer signifikanten kardiomyozytären Apoptose assoziiert war. Proteasomale Inhibitoren blockierten partiell sowohl die Abnahme der ARC Protein Konzentration als auch die Induktion von Apoptose. Der Knockdown von endogenem ARC machte Kardiomyozyten empfindlicher auf Doxorubicin Stimulation mit Apoptose zu reagieren. Im Gegensatz dazu führte eine

adenoviral-vermittelte ARC Überexpression zu einer ausgeprägten kardiomyozytären Resistenz gegenüber Doxorubicin-induziertem Zelltod. Doxorubicin Stimulation führte zur Translokation von BAX vom Zytosol zum Mitochondrium, wo es zu einer Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials, Cytochrome c-Freisetzung und Aktivierung der Caspasen -3 und -9 führte. ARC verhinderte die BAX Translokation zum Mitochondrium und blockierte damit die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose Signalwegs tBID und Caspase-8 unabhängig.⁹⁶ (Übersetzung durch den Autor)

Diese Studie belegt erstmals einen protektiven, antiapoptotischen Effekt von ARC im Rahmen der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität. Vor dem Hintergrund der Bedeutung der anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz bieten diese Daten einen möglichen molekularbiologischen Ansatz zur Therapie und Prävention einer Doxorubicin-induzierten Herzinsuffizienz.

<https://doi.org/10.1007/s00109-008-0434-z>

2.3 Therapeutische Bedeutung der TAT-ARC Protein Transduktion im akuten fulminanten Leberversagen

An J, Harms C, Lättig-Tünnemann G, Sellge G, Mandić AD, Malato Y, Heuser A, Endres M, Trautwein C, **Donath S**. TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain protein transduction rescues mice from fulminant liver failure. *Hepatology* 2012;56:715-726.⁹⁷ doi-Nummer: [10.1002/hep.25697](https://doi.org/10.1002/hep.25697)

Da ARC sowohl Todesrezeptor- als auch mitochondrial-vermittelte Apoptose inhibieren kann und diese beim fulminanten Leberversagen eine herausragende Rolle spielen, untersuchten wir im folgenden die therapeutische Bedeutung von ektopem ARC im fulminanten Leberversagen.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit „TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain protein transduction rescues mice from fulminant liver failure“⁹⁷ doi-Nummer: [10.1002/hep.25697](https://doi.org/10.1002/hep.25697)

„Akutes Leberversagen ist mit massivem hepatozellulärem Zelltod und einer hohen Sterblichkeit assoziiert. Therapeutische Ansätze, die beim akuten Leberversagen auf eine Protektion von Hepatozyten abzielen, sind aufgrund der Aktivierung verschiedener, stimulus-abhängiger Signalkaskaden, unterschiedlicher Zelltod-Mechanismen und eines begrenzten therapeutischen Zeitfensters in ihrer Effektivität limitiert. ARC ist ein Zelltod Repressor, der sowohl den Todesrezeptor-Signalweg als auch mitochondrial-vermittelte Apoptose spezifisch inhibiert.

In dieser Arbeit untersuchten wir die in vivo-Effekte der TAT-ARC Protein Transduktion auf FAS- und TNF-vermittelte Mausmodelle des fulminanten Leberversagens. Eine Vorbehandlung mit ektopem ARC Protein führte bei allen Versuchstieren zu einem Überleben des ansonsten tödlichen Leberversagens durch Stimulation mit FAS-agonistischem Antikörper (Jo2), Concanavalin A (ConA) oder D-Galaktosamin/Lipopolysaccharid (GalN/LPS). Bedeutsamerweise, konnten auch alle Versuchstiere noch gerettet werden, wenn die TAT-ARC Therapie erst im Anschluss an eine Induktion des

Leberversagens mittels Jo2, ConA oder GalN/LPS initiiert wurde. ARC inhibierte FAS-vermittelte Apoptose durch direkte Interaktion mit DISC-Komponenten. TNF-vermittelter Zelltod wurde von ARC durch 2 unabhängige Mechanismen inhibiert. Ektopes ARC verhinderte TNF-abhängige Hepatozyten Apoptose sowohl durch eine Inhibition der Jun Kinase (JNK)-abhängigen TNF α Expression als auch durch eine Inhibition des Todesrezeptor- und mitochondrialen Apoptose Signalwegs. Wir identifizierten JNK als neues Target von ARC. Dabei führt die CARD-abhängige, direkte Interaktion von ARC mit JNK1 und JNK2 zu einer Inhibition der JNK Aktivierung und JNK-abhängigen TNF α Produktion.

Unsere Arbeit zeigt erstmals, dass ARC, sowohl auf Hepatozyten-Ebene als auch oberhalb davon auf Ebene der nicht-parenchymatösen Zellen, hepatoprotektiv wirkt. Die Effektivität der TAT-ARC Protein Transduktion in multiplen FAS- und TNF-abhängigen Mausmodellen des akuten Leberversagens demonstriert das therapeutische Potential einer ARC-basierten Therapie beim akuten Leberversagen.“ (Übersetzung durch den Autor)

<https://doi.org/10.1002/hep.25697>

2.4 Therapeutische Bedeutung von ektope ARC bei Paracetamol-induzierter hepatozellulärer Nekrose

An J, Mehrhof F, Harms C, Lättig-Tünnemann G, Lee SLL, Endres M, Li M, Sellge G, Mandić AD, Trautwein C, **Donath S**. ARC is a novel therapeutic approach against acetaminophen-induced hepatocellular necrosis. J Hepatol 2013;58:297-305.⁹⁸ doi-Nummer: [10.1016/j.jhep.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.002)

Aufgrund der ausgeprägten zytoprotektiven Effekte von ektope ARC im Rahmen verschiedener Modelle akuten Leberversagens, untersuchten wir nachfolgend den Effekt von ARC auf Paracetamol-vermittelte hepatozelluläre Nekrose.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit „ARC is a novel therapeutic approach against acetaminophen-induced hepatocellular necrosis“⁹⁸ doi-Nummer: [10.1016/j.jhep.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.002)

„Paracetamol Überdosierung ist die häufigste Ursache des medikamenten-induzierten Leberversagens. JNK spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Paracetamol-vermittelten hepatozellulären Nekrose. ARC ist ein Apoptose Repressor, der den Todesrezeptor-Signalweg als auch mitochondrial-vermittelte Apoptose durch multiple Interaktionen spezifisch inhibiert. Eine spezifische Inhibition primär nekrotischen Zelltods durch ARC ist bisher nicht bekannt. In dieser Studie untersuchten wir den therapeutischen Effekt sowie die molekularen Mechanismen von ektope ARC auf hepatozelluläre Nekrose. Hierzu testeten wir in vivo und in vitro die therapeutischen Effekte des TAT-Fusionsproteins TAT-ARC auf Paracetamol-induzierte Hepatotoxizität bei der Maus.

Behandlung von C57BL/6 Mäusen mit TAT-ARC Fusionsprotein führte bei Paracetamol-induzierter Hepatotoxizität zu einer Inhibition von ansonsten letal verlaufendem Leberversagen. Paracetamol Überdosierung induzierte eine caspasen-unabhängige hepatozelluläre Nekrose, die sich anhand von Leber Histologie, erhöhten Serumtransaminasen und HMGB1 Sekretion darstellte und durch ektope ARC verhindert werden konnte. Dabei war die ARC-

vermittelte Hepatoprotektion nicht auf eine Veränderung des Paracetamol Metabolismus zurückzuführen, sondern resultierte in signifikant reduziertem oxidativem Stress. Eine anhaltende JNK-Aktivierung spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Paracetamol-induzierten Hepatotoxizität. Ektopes ARC führte zu einer Inhibition der JNK-Aktivierung, die sich in einer Hemmung der JNK Phosphorylierung und mitochondrialen Translokation, durch spezifische Interaktionen zwischen ARC und endogenem JNK1 und JNK2, widerspiegelte. Bedeutsamerweise war das Überleben Paracetamol-intoxizierter Mäuse weiterhin erhalten, wenn eine ARC Behandlung zeitlich verzögert nach Paracetamol Gabe begonnen wurde.

In dieser Studie identifizieren wir die ARC-JNK Bindung mit nachfolgender JNK-Inhibition erstmals als ARC spezifischen Mechanismus Paracetamol-vermittelte hepatozelluläre Nekrose zu inhibieren. Die Effektivität der TAT-ARC Protein Transduktion im Rahmen der paracetamol-induzierten Hepatotoxizität bei der Maus weist auf einen möglichen therapeutischen Nutzen der Behandlung bei Paracetamol-vermittelter Hepatotoxizität auch beim Menschen hin.“ (Übersetzung durch den Autor)

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.002>

2.5 Pathophysiologische und therapeutische Bedeutung von endogenem und ektope ARC beim Schlaganfall der Maus

Donath S, An J, Lee SLL, Gertz K, Datwyler AL, Harms U, Müller S, Farr TD, Fächtemeier M, Lättig-Tünnemann G, Lips J, Foddis M, Mosch L, Bernard R, Grüttner U, Balkaya M, Kronenberg G, Dirnagl U, Endres M, Harms C. Interaction of ARC and DAXX: A novel endogenous target to preserve motor function and cell loss after focal brain ischemia in mice. *J Neurosci* 2016;36:8132-8148.⁹⁹ doi-Nummer: [10.1523/JNEUROSCI.4428-15.2016](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4428-15.2016)

Aufgrund der ausgeprägten endogenen Expression von ARC im Hirn sowie der Bedeutung zytoprotektiver Behandlungsansätze beim Schlaganfall, untersuchten wir im folgenden die Bedeutung von endogenem und insbesondere ektope ARC beim Schlaganfall der Maus.

Beim Schlaganfall unterliegen viele Neuronen in der ischämischen Penumbra einem apoptotischen Zelltod. ARC ist ein Zelltod Repressor, der sowohl den Todesrezeptor-Signalweg als auch den mitochondrialen Signalweg inhibiert. In dieser Studie untersuchten wir ARC's neuroprotektive Effekte in primären Neuronenkulturen und *in vivo* am experimentellen Schlaganfallsmodell der Maus.

Sauerstoff-Glukose-Deprivation (OGD) reduzierte die endogene ARC Protein Konzentration in primären Neuronenkulturen und resultierte ebenso nach ARC-Knockdown durch RNA Interferenz gegenüber Kontrollen in einer erhöhten Zelltodrate. Im Gegensatz dazu führt die TAT-ARC Protein Transduktion zu einem signifikanten neuronalen Überlebensvorteil nach OGD. Mit TAT-ARC zum Zeitpunkt der Gefäßokklusion behandelte Mäuse zeigten 72 h nach 60 minütigem Verschluss der Arteria cerebri media (MCAo) in der Kernspintomographie signifikant reduzierte Hirninfarktgrößen und signifikant weniger Verhaltensauffälligkeiten gegenüber TAT-βGal behandelten Kontrollen. Bedeutsamerweise führte auch eine TAT-ARC Applikation 3 h nach Infarktinitiierung zu signifikant größenreduzierten Hirninfarkten und signifikant verbesserter Motorfunktion gegenüber den Kontrolltieren. Im Gegensatz zu TAT-βGal behandelten Kontrollen wiesen TAT-ARC transduzierte

Hirne nach MCAo in Immunoblot Analysen eine Inhibition des DAXX-ASK1-JNK Signalwegs auf. Co-Immunopräzipitationsexperimente belegen, dass ARC CARD-abhängig DAXX bindet und dadurch zu einer Inhibition der anhaltenden ASK1-JNK Aktivierung nach MCAo führt.

Wir zeigen erstmals, dass ARC durch Interaktion mit DAXX die ASK1-JNK Aktivierung spezifisch inhibiert und dadurch neuronalen Zelltod gezielt verhindert. TAT-ARC-vermittelte Protein Transduktion führt bei der Maus zu einer Prognose Verbesserung nach zerebraler Ischämie und könnte somit auch beim Menschen einen erfolgsversprechenden Ansatz für eine molekulare adjuvante Schlaganfalltherapie darstellen.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4428-15.2016>

3. Diskussion

Kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall stellen in der westlichen Welt führende Todesursachen dar.²⁹ Die Inzidenz von akutem Leberversagen ist deutlich seltener, der Verlauf jedoch oft tödlich.¹⁰¹ Zelltodformen wie Apoptose und Nekrose spielen auf zellulärer Ebene eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion dieser mit fulminantem Zellverlust einhergehenden Syndrome.^{30,102} Darüber hinaus spielt der apoptotische Zelltod von Herzmuskelzellen eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Herzinsuffizienz und myokardialen Dysfunktion.^{30,42-44} Vor dem Hintergrund der zentralen Rolle apoptotischer und nekrotischer Zelltodprozesse im Rahmen von Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Leberversagen und Schlaganfall wurden in der vorliegenden Habilitationsschrift die Effekte und Wirkmechanismen von ARC auf diese Syndrome untersucht. Basierend auf einer Reihe von Studien, die gezeigt haben, dass sowohl Todesrezeptor-Signaltransduktion als auch eine Aktivierung des mitochondrialen Apoptose Signalwegs einen bedeutsamen Einfluss auf die Myokardinfarktgröße ausüben,³²⁻³⁴ untersuchten wir *in vivo* die Wirkung von endogenem ARC im Ischämie-Reperfusionsschaden des Herzens an der ARC Knockout Maus.⁹⁵ Zudem analysierten wir an ARC defizienten Mäusen den Effekt einer chronischen Druckbelastung durch Aortenkonstriktion auf myokardiales Remodelling, linksventrikuläre Funktion und Fibroseentstehung.⁹⁵ Nachfolgend wurde der therapeutische Effekt einer ARC-Überexpression auf Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität an neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht.⁹⁶ Aufgrund von ARCs zytoprotektivem Wirkprofil, setzte sich die Folgearbeit mit dem therapeutischen Effekt einer TAT-ARC Protein Transduktion im FAS und TNF-vermittelten fulminanten Leberversagen bei der Maus auseinander.⁹⁷ Im Anschluss daran analysierten wir die therapeutische Rolle von ektopem ARC beim Paracetamol-induzierten Leberversagen bei der Maus, das primär durch hepatozelluläre Nekrose vermittelt wird.⁹⁸ Die letzte hier vorgestellte Eigenarbeit untersuchte den Effekt einer TAT-ARC Protein Transduktion und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen auf die Ausbildung des Hirninfarkts bei der Maus *in vivo* und *in vitro*.⁹⁹

Die koronare Herzerkrankung und Herzinsuffizienz sind mit einem Verlust von Kardiomyozyten durch Apoptose assoziiert.³⁰ Ob kardiomyozytäre Apoptose bei der Herzinsuffizienz Entstehung eine kausale Rolle spielt ist unklar. Vorarbeiten demonstrierten, dass ARCs antiapoptotischer Effekt von einer Phosphorylierung am

Threonin 149 durch die konstitutiv-aktive Proteinkinase CK2 abhängt.⁹⁰ Daraus erwuchs die Hypothese, dass funktionelles antiapoptotisches ARC zur Aufrechterhaltung des kardialen Phänotyps von Bedeutung sein könnte. Diese Hypothese überprüften wir anhand eines ARC Knockout-Modells. Aufgrund der relativ spezifischen Expression in langlebigen Geweben wie Herz, Hirn und Skelettmuskel generierten wir einen nicht-konditionalen ARC Knockout in der Maus.⁹⁵ Die bei ARC Knockout Mäusen gegenüber Wildtyp Kontrollen um 50% vergrößerten Myokardinfarktarnen nach Ischämie-Reperfusion und die Entstehung einer akzelerierten Kardiomyopathie mit Abnahme der linksventrikulären Pumpfunktion, linksventrikulärer Dilatation und progressiver Fibrosierung deuten auf eine kausale Rolle der Apoptose hin.⁹⁵ Dazu passend finden sich ursächlich für die gesehenen Phänotypen in beiden Modellen erhöhte Apoptoseraten bei den ARC Knockout Mäusen. Die pathophysiologische Relevanz supprimierter ARC Spiegel konnte an humanen Myokardproben terminal insuffizienter Explantatherzen demonstriert werden, die gegenüber Kontrollen eine signifikante Abnahme der ARC Protein Expression aufweisen.⁹⁵

Anthrazykline spielen aufgrund ihrer Effektivität und ihres breiten Wirkungsspektrums seit Jahrzehnten eine wichtige Rolle in der Therapie zahlreicher Krebserkrankungen. Doxorubicin ist ein Anthrazyklin, das in der Krebstherapie zu den meist verwendeten Chemotherapeutika zählt.¹⁰³ Die therapeutische Anwendung von Doxorubicin ist aufgrund einer kumulativen, dosisabhängigen Kardiotoxizität eingeschränkt, die durch eine weitgehend irreversible dilatative Kardiomyopathie und kongestive Herzinsuffizienz charakterisiert ist.¹⁰⁴ Zahlreiche molekulare Mechanismen sind bereits identifiziert worden, die zu einem irreversiblen myokardialen Schaden führen. Hierzu zählen die Bildung von ROS, Lipid Peroxidation, mitochondriale Schädigung, Veränderungen des Calcium Stoffwechsels und direkte Suppression muskelspezifischer Genexpression.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Die meisten dieser Mechanismen führen schließlich zur Aktivierung apoptotischer Signaltransduktionskaskaden mit der Ausbildung einer kontraktiven Insuffizienz.⁴⁴ Berücksichtigt man die eingeschränkte regenerative Kapazität des Herzens, so ist ein Verständnis der zugrundeliegenden Signaltransduktion Voraussetzung um gezielt neue Therapien zu entwickeln, die dem Zellverlust bei der doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität entgegenwirken. Da endogenes ARC im Herzen kardioprotektiv wirkt,⁹⁵ untersuchten wir am Modell der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität den Effekt einer ARC Überexpression auf

kardiomyozytäre Apoptose bei der Ratte. In Übereinstimmung mit Überexpressionsstudien antiapoptotisch wirkender BCL-2 Familienmitglieder sahen wir nach adenoviraler ARC Überexpression eine signifikante Inhibition Doxorubicin-induzierter Apoptose neonataler Rattenkardiomyozyten.⁹⁶ Hierbei scheint insbesondere die Hemmung des mitochondrialen Apoptose Signalwegs eine wichtige Rolle zu spielen. Ob die protektiven Effekte einer ARC Überexpression primär auf einer Inhibition apoptotischer Signaltransduktionskaskaden beruhen oder ursächlich auch direkte antioxidative Effekte eine Rolle spielen bleibt unklar.

Derzeit gibt es noch keine kausale medizinische Therapie um gerichtet in die molekularen Ursachen des akuten Leberversagens einzugreifen.¹⁰⁸ Die klinische Therapie ist weitgehend supportiv und symptomatisch.¹⁰⁸ Während des akuten Leberversagens kommt es infolge verschiedener Stimuli zu massivem apoptotischem Zelluntergang und somit zur ausgeprägten Leberschädigung mit fataler Leberfunktionseinschränkung.^{47,53} Die Folge ist eine hohe Sterblichkeit und vielfach die Notwendigkeit eines Ersatzverfahrens wie extrakorporale Entgiftung oder Lebertransplantation.¹⁰⁸ Trotz immenser neuer Erkenntnisse über die Bedeutung der Apoptose in der Entstehung des akuten Leberversagens, hat bislang kein molekularbiologischer Ansatz zu einer klinisch relevanten Therapie geführt. Dies beruht einerseits auf der Tatsache, dass bisherige molekulare Therapieansätze in ihrer spezifischen Inhibition auf einzelne Signaltransduktionswege (FAS; TNF α ; p53; zytokin-vermittelter Leberschaden (NF κ B, Stat-3, IL-6)) oder post-mitochondriales antiapoptotisches Signalling (Caspase-Inhibitoren) beschränkt waren. Daher ist die Identifizierung neuer Überlebensfaktoren von herausragender Bedeutung, die durch spezifische Interaktionen, unabhängig vom Auslöser des akuten Leberversagens, diverse proapoptotische Signaltransduktionswege inhibieren. Unsere Ergebnisse in verschiedenen *in vivo*-Modellen des akuten Leberversagens belegen erstmals, dass ARC neben FAS- auch TNF-vermitteltes Leberversagen inhibieren kann.¹⁰⁸ Verglichen mit anderen Geweben und Zellen sind Hepatozyten sehr empfindlich gegenüber Fas-induzierter Apoptose, was auch auf die Abwesenheit von ARC zurückzuführen sein kann.⁵⁰ Vorausgegangene *in vivo*-Studien an Mäusen mit FAS-induzierter Hepatitis demonstrieren eine erfolgreiche hepatische Applikation von gegen FAS und Caspase-8 gerichteter siRNA.^{56,57} Die Relevanz siRNA-vermittelter therapeutischer Ansätze ist jedoch aufgrund der verspätet einsetzenden Wirkung und der geringen Applikationseffizienz in Hepatozyten limitiert.^{56,109} Im Gegensatz dazu

überkommt TAT-ARC diese Limitationen.⁹⁷ ARC inhibiert Caspase-8-abhängigen Zelltod durch direkte Bindung verschiedener DISC-Bestandteile wie FAS, FADD und Procaspase-8. Zahlreiche Studien belegen eine kritische Rolle von JNK bei der ConA und GalN/LPS-induzierten hepatozytären Apoptose.¹¹⁰⁻¹¹³ Aufgrund dieser Beobachtungen stellt JNK eine therapeutische Zielstruktur dar, die zur Entwicklung JNK-spezifischer Inhibitoren geführt hat. Unsere Daten belegen erstmals *in vitro* und *in vivo*, dass ektopes ARC endogenes JNK1 und JNK2 direkt, CARD-abhängig bindet und dadurch JNK Aktivierung verhindert.⁹⁷ Die genauen Bindungsdomänen der ARC-JNK Interaktion sind aktuell noch unklar. Darüber hinaus belegen unsere Ergebnisse, dass ektopes ARC zu einer deutlichen Abnahme der TNF α Serum Konzentration bei ConA- und GalN/LPS-induzierter Hepatitis führt.⁹⁷ Die Beobachtung das ARC JNK Aktivierung inhibiert weist darauf hin, dass die supprimierte TNF α Serum Konzentration auf ARCs JNK-inhibitorischer Wirkung beruht. Multiple Interaktionen von ARC mit kritischen prämitochondrial agierenden Mediatoren des Todesrezeptor und mitochondrialen Signalwegs führen zu einer starken Inhibition des apoptischen Zelltods. Redundante zelltod-reprimierende Interaktionen von ektopem ARC Protein mit kritischen Mediatoren beider Apoptose Signalwege führen zu einer Inhibition apoptotischer Signaltransduktion an verschiedenen Stellen der Signaltransduktionskaskade. Darüber hinaus scheint ARC apoptotische Signaltransduktion sowohl auf hepatozytärer Ebene als auch proximal davon im Kompartiment residenter Leberimmunzellen zu inhibieren. Diese multiplen Interaktionen von ARC lassen vermuten, dass es in der Behandlung des akuten Leberversagens verglichen mit Caspase- und JNK-Inhibitoren, die nur einen Signalweg inhibieren, potenter sein könnte. Basierend auf der Relevanz von Fas- und TNF-vermitteltem Leberzellschaden im Rahmen von toxischen und immunvermittelten Lebererkrankungen können TAT-ARC Protein Transduktion oder ARC-basierte Moleküle in der Prävention und Therapie akuter und chronischer Lebererkrankungen von Bedeutung sein.^{97,114,115}

Paracetamol-induzierte Hepatotoxizität ist die häufigste Ursache von fulminantem medikamenten-induziertem Leberversagen.^{101,116,117} Trotz großer Bemühungen in der Vergangenheit sind die Mechanismen des Paracetamol-induzierten Leberversagens nur unvollständig verstanden. Gegenwärtig ist die Gabe von N-Acetylcystein (ACC) die einzige kausale Therapie, aber ihre Wirksamkeit beschränkt sich auf die Frühphasen der Paracetamol Intoxikation.^{101,108,118,119} Bei der

Paracetamol Intoxikation kommt es zu einer metabolischen Aktivierung der Substanz zum reaktiven Metaboliten N-Acetyl-p-Benzoquinone Imine (NAPQI), der zum Verbrauch von Gluthation (GSH) führt und Protein Addukte bildet, die zur Initiierung von mitochondrialem oxidativem Stress und Einschränkung der respiratorischen Funktion führen.^{120,121} Diese mitochondrialen Effekte führen zu einer Aktivierung verschiedener Mediatoren wie JNK, was in einer erhöhten mitochondrialen Permeabilität mit Translokation mitochondrialer Proteine und nekrotischem Zelltod bei Nagern und Menschen resultiert.^{116,117} Wir zeigen erstmals, den protektiven Effekt von ektopem ARC auf nekrotischen, caspase-unabhängigen Zelltod am Modell des Paracetamol-induzierten Leberversagens.⁹⁸ Die 30 Minuten nach Paracetamol Applikation beobachtete Induktion des RIP-Signaltransduktionswegs sowie deren Inhibierung und das Überleben der Versuchstiere nach Nec-1 Behandlung deuten dabei erstmals auf eine kritische Rolle der Nekroptose in der Pathogenese der Paracetamol Intoxikation hin.⁹⁸ Eine andere Studie zeigt, dass die von uns gesehene RIP3 Induktion ein kritischer Schalter von apoptotischem zu nekrotischem Zelltod ist.¹²² Dennoch zeigen unsere Daten, dass ektopes ARC Paracetamol-induzierte Nekrose RIP-unabhängig durch direkte Interaktion mit JNK1/2 und Inhibierung der JNK Aktivierung und Translokation verhindert. Somit belegen unsere Ergebnisse erstmals, dass ARC durch spezifische Interaktion mit JNK1 und JNK2 programmierte Nekrose inhibiert.⁹⁸ Die ARC-vermittelte Inhibition von Fas- und TNF-vermittelter Apoptose, JNK-abhängiger Nekrose sowie die Effektivität der TAT-ARC Protein Transduktion auch im Rettungsversuch nach Induktion der Hepatotoxizität deuten auf ein relevantes therapeutisches Potential von ARC auch beim akuten Leberversagen des Menschen hin.

Aufgrund der ausgeprägten zytoprotektiven Effekte von ARC in Herz und Leber untersuchten wir den neuroprotektiven Effekt von ARC im Hirn. Bei neuronalen Hirnzellen handelt es sich weitgehend um postmitotisches Gewebe, dass im adulten Alter über wenig regeneratives Potential verfügt, so dass therapeutische Ansätze zum gegenwärtigen Zeitpunkt insbesondere auf eine Zytoprotektion abzielen.¹⁰² Im Schlaganfallsmodell der Maus führt die Anwendung von TAT-ARC Fusionsprotein zu signifikant kleineren Hirninfarkten nach MCAo.⁹⁹ Einhergehend mit der Infarktgrößenreduktion zeigen TAT-ARC vorbehandelte Mäuse 72 Stunden nach Ischämie-Reperfusion gegenüber Kontrolltieren eine signifikant bessere Motorfunktion, so dass die ARC-basierte Therapie prognostisch wirksam ist.⁹⁹ Diese

Ergebnisse bestätigen sich auch, wenn die Therapie mit TAT-ARC 3 Stunden nach Infarktinitiierung eingeleitet wird.⁹⁹ Wie bei den Modellen des JNK-abhängigen Leberversagens führt die ARC-vermittelte Neuroprotektion zu einer Inhibierung der JNK Aktivierung. Im Gegensatz zu den untersuchten Modellen des Leberversagens beruht die ARC-vermittelte Inhibition der JNK Aktivierung im Hirn jedoch nicht auf einer CARD-abhängigen ARC-JNK1/2 Interaktion sondern auf einer direkten, CARD-abhängigen ARC-DAXX Bindung.⁹⁹ Nachfolgend kommt es zu einer Inhibition des DAXX-ASK1-MKK-JNK-Signalwegs.⁹⁹ Ob die Inhibition des DAXX-ASK1-MKK-JNK-Signalwegs durch ARC neuronenspezifisch ist oder auch in anderen Organen bzw. Zelltypen von Bedeutung ist bleibt gegenwärtig unklar. Aufgrund der multiplen Interaktionen von ARC und daraus resultierenden Inhibition zahlreicher proapoptotischer Signalwege bleibt es unklar welche ARC-vermittelten Effekte letztlich entscheidend für die gesehene Neuroprotektion sind. Ebenso bleibt unklar warum die ARC-JNK1/2 Interaktion zelltyp-abhängig ist.

Die Ergebnisse, der hier zusammengefassten Arbeit belegen in verschiedenen Zell- und Organsystemen, dass ARC aufgrund seiner multiplen spezifischen Interaktionen mit kritischen Mediatoren der Todes-Signaltransduktion ein potenter Zelltodrepressor ist. In diesem Sinn, belegen die hier vorgestellten Versuchsergebnisse, dass therapeutische Potenzial einer ARC-basierten Therapie im Herzinfarkt, beim Leberversagen und beim Schlaganfall.

4. Zusammenfassung

Fulminante und subakute Zelltodprozesse spielen in der Pathogenese multipler Syndrome wie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutem Leberversagen und Schlaganfall eine herausragende Rolle und sind mit einer hohen Mortalität und Morbidität assoziiert. Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass Apoptose und Nekrose eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutem Leberversagen und Schlaganfall spielen. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen ist die Voraussetzung zur Entwicklung neuer pharmakologischer bzw. molekularer Strategien zur Prävention und Therapie dieser mit massivem Zellverlust einhergehenden Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurden neben der pathophysiologischen und therapeutischen Bedeutung des Apoptose Repressor ARC auf Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutes Leberversagen und Schlaganfall die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen untersucht.

An Herzen ARC-defizienter Mäuse konnte gezeigt werden, dass endogenes ARC bei chronischer Druckbelastung durch Aortenkonstriktion und beim Ischämie-Reperfusionsschaden kardioprotektiv wirkt.^{95,100} Eine chronische Nachlasterhöhung durch Aortenkonstriktion führte bei ARC-defizienten Mäusen zur Ausbildung einer akzelerierten Kardiomyopathie, die durch eine schwerwiegende Abnahme der Pumpfunktion, eine progressive linksventrikuläre Dilatation und eine verstärkte myokardiale Fibrosierung gekennzeichnet war.¹⁰⁰ Verglichen mit Wildtyp Kontrollen führte ein Ischämie-Reperfusionsschaden bei ARC-defizienten Mäusen zu um 50% größeren Herzinfarkten.¹⁰⁰ Ursächlich für die gesehenen Befunde zeigte sich in beiden kardialen Stressmodellen ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate in den ARC-defizienten Tieren.¹⁰⁰ Stark reduzierte myokardiale ARC Proteinspiegel terminal herzinsuffizienter Patienten deuten auf eine klinische Relevanz der im Mausmodell erhobenen Befunde hin.^{95,100}

Der Effekt von endogenem und ektope ARC auf Überleben und Signaltransduktion neonataler Rattenkardiomyozyten im Rahmen Doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität wurde nachfolgend untersucht.⁹⁶ Dabei zeigte sich, dass die einmalige Stimulation neonataler Rattenkardiomyozyten mit Doxorubicin zu einer prä- als auch posttranslationalen Herunterregulation der ARC mRNA und Protein Konzentration führt, die mit dem Auftreten einer signifikanten Kardiomyozyten Apoptose assoziiert

ist und durch proteasomale Inhibitoren partiell blockiert werden kann. Der Knockdown von endogenem ARC machte Kardiomyozyten empfindlicher gegenüber Doxorubicin-induzierter Apoptose. Im Gegensatz dazu führte eine adenoviral-vermittelte Überexpression von ARC zu einer ausgeprägten kardiomyozytären Resistenz gegenüber Doxorubicin-induziertem Zelltod, was auf eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials und eine Inhibierung der Cytochrom c-Freisetzung zurückzuführen war.⁹⁶

In der Folgearbeit konnte gezeigt werden, dass ektoptes ARC FAS- und TNF-vermitteltes caspase-abhängiges fulminantes Leberversagen bei der Maus *in vivo* und *in vitro* inhibiert.⁹⁷ Bedeutsamerweise, konnten auch alle Versuchstiere noch gerettet werden, wenn die TAT-ARC Therapie erst im Anschluss an die Induktion des Leberversagens mittels Jo2, ConA oder GalN/LPS Stimulation begonnen wurde. FAS-vermittelte Apoptose wurde durch eine direkte Interaktion von ARC mit DISC-Komponenten inhibiert. TNF-vermittelter Zelltod wurde sowohl durch eine Inhibition der JNK-abhängigen TNF α Expression als auch durch eine Inhibition des Todesrezeptor- und mitochondrialen Apoptose Signalwegs verhindert. Wir identifizierten JNK als neues Target von ARC. Dabei führt die CARD-abhängige, direkte Interaktion von ARC mit JNK1 und JNK2 zu einer Inhibition der JNK Aktivierung und JNK-abhängigen TNF α Produktion.

Daraufhin untersuchten wir die therapeutische Bedeutung von ektoptem ARC auf Paracetamol-induzierte hepatozelluläre Nekrose bei der Maus.⁹⁸ Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Behandlung von C57BL/6 Mäusen mit TAT-ARC Fusionsprotein bei Paracetamol-induzierter Hepatotoxizität zu einer Inhibition von ansonsten letal verlaufendem nekrotischen Leberversagen führt. Paracetamol Überdosierung führte zur Induktion der RIP-Signaltransduktionskaskade mit nachfolgender JNK Aktivierung und Nekrose Entstehung, die durch ektoptes ARC verhindert werden konnte. Ektoptes ARC führte zu einer Inhibition der JNK Aktivierung, die sich in einer Hemmung der JNK Phosphorylierung und mitochondrialen Translokation durch spezifische Interaktionen zwischen ARC und endogenem JNK1 und JNK2 widerspiegelte. Die ARC-vermittelte Hepatoprotektion nach Paracetamol war nicht auf eine Veränderung des Metabolismus zurückzuführen, resultierte aber in signifikant reduziertem oxidativen Stress.

Abschließend untersuchten wir die pathophysiologische und therapeutische Bedeutung von endogenem und ektoem ARC beim Hirninfarkt der Maus.⁹⁹ Dabei führte die TAT-ARC Protein Transduktion bei der Maus *in vivo* zu signifikant kleineren Hirninfarkten und signifikant weniger Verhaltensauffälligkeiten 72 Stunden nach zerebraler Ischämie. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde eine direkte, CARD-abhängige Interaktion von ARC mit DAXX identifiziert, die zu einer Hemmung der ASK1-JNK-Aktivierung und nachfolgender Inhibierung neuronaler Apoptose führte. Bedeutsamerweise führte eine TAT-ARC Protein Transduktion auch 3h nach Schlaganfall-Induktion gegenüber Kontrollen noch zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion, die mit einer verbesserten Motorfunktion 28 Tage nach dem Schlaganfallereignis assoziiert war.

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit neben der pathophysiologischen Relevanz von ARC im Rahmen von Herz- und Hirninfarkt ARCs therapeutisches Potential im Rahmen von Syndromen mit fulminanten und subakuten Zelltodprozessen wie bei Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, akutem Leberversagen und Schlaganfall.

5. Literaturangaben

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
2. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
3. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45:528-537.
4. Leist M, Jäätelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:589-598.
5. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;15:2922-2933.
6. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol.* 2009;10:348-355.
7. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87:99-163.
8. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997;139:1281-1292.
9. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911.
10. Basañez G, Sharpe JC, Galanis J, Brandt TB, Hardwick JM, Zimmerberg J. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 2002;277:49360-49365.
11. Bröker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005;11:3155-3162.
12. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95-99.
13. Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* 2001;276:48404-48409.
14. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.
15. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.
16. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-1042.
17. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
18. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
19. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
20. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005 ;17:525-535.
21. Moquin D, Chan FK. The molecular regulation of programmed necrotic cell

- injury. *Trends Biochem Sci* 2010;35:434-441.
22. Galluzzi L, Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Buettner S, Eisenberg T, Vandenabeele P, Madeo F, Kroemer G. Programmed necrosis from molecules to health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011;289:1-35.
 23. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 2008;135:1161-1163.
 24. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:700-714.
 25. Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* 2004;117:5197-208.
 26. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:3666-70.
 27. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol* 2009;1:8-10.
 28. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, and Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009;325, 332–336.
 29. Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, Greenland P, Van Horn L, Tracy RP, Lloyd-Jones DM. Lifetime risks of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2012;366(4):321-9.
 30. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010 ;72:19-44.
 31. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74:86-107.
 32. Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, Habazettl H, Schenkel J, Boekstegers P, Debatin KM. Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation* 2000;102:915-920.
 33. Lee P, Sata M, Lefer DJ, Factor SM, Walsh K, Kitsis RN. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H456-463.
 34. Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, Pannet H, Shneyvays V, Shainberg A, Goldshtaub V, Tobar A, Vidne BA. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H2351-H2359.
 35. Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2313-2320.
 36. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998;97:276-281.
 37. Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, Cryns VL. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1709-1715.
 38. Ottani F, Latini R, Staszewsky L, La Vecchia L, Locuratolo N, Sicuro M, Masson S, Barlera S, Milani V, Lombardi M, Costalunga A, Mollicelli N, Santarelli A, De Cesare N, Sganzerla P, Boi A, Maggioni AP, Limbruno U. Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label

- CYCLE Trial. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:365–374.
39. Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P, Vanzetto G, Metge M, Aupetit JF, Jouve B, Motreff P, Tron C, Labeque JN, Steg PG, Cottin Y, Range G, Clerc J, Claeys MJ, Coussement P, Prunier F, Moulin F, Roth O, Belle L, Dubois P, Barragan P, Gilard M, Piot C, Colin P, De Poli F, Morice MC, Ider O, Dubois-Randé JL, Untersee T, Le Breton H, Béard T, Blanchard D, Grollier G, Malquarti V, Staat P, Sudre A, Elmer E, Hansson MJ, Bergerot C, Boussaha I, Jossan C, Derumeaux G, Mewton N, Ovize M. Cyclosporine before PCI in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2015;373:1021–1031.
 40. Christ M, Störk S, Dörr M, Heppner HJ, Müller C, Wachter R, Riemer U. Heart Failure epidemiology 2000–2013: insights from the Trend HF Germany Project. *Eur J Heart Fail* 2016;18:1009-1018.
 41. Maggioni AP, Dahlström U, Filippatos G, Chioncel O, Crespo Leiro M, Drozdz J, Fruhwald F, Gullestad L, Logeart D, Fabbri G, Urso R, Metra M, Parissis J, Persson H, Ponikowski P, Rauchhaus M, Voors AA, Nielsen OW, Zannad F, Tavazzi L. On behalf of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology (HFA). EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur J Heart Fail* 2013;15: 808–817.
 42. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-1141.
 43. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkilä P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvonen M, Voipio-Pulkki LM. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 1999 ;29:380-386.
 44. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003;111:1497-1504.
 45. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J Jr, Müller W, Chien KR. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999;97:189-198.
 46. Nakae H, Narita K, Endo S. Soluble Fas and soluble Fas ligand levels in patients with acute hepatic failure. *Journal of Critical Care* 2001;16:59-63.
 47. Rutherford AE, Hynan LS, Borges CB, Forcione DG, Blackard JT, Lin W, Gorman AR, Shaikh OS, Reuben A, Harrison E, Reddy KR, Le WM, Chung RT, ALF Study Group. Serum apoptosis markers in acute liver failure: a pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:1477-83.
 48. Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, Wesch H, Mariani SM, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nature Med* 1998;5:588–593.
 49. Strand S, Strand D, Seufert R, Mann A, Lotz J, Blessing M, Lahn M, Wunsch A, Broering DC, Hahn U, Grischke EM, Rogiers X, Otto G, Gores GJ, Galle PR. Placenta-derived CD95 ligand causes liver damage in hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome, in *Gastroenterology* 2004;126:849-58.
 50. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993;364:806

51. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, and Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803–815.
52. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, and Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505–512.
53. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 1999;400:886-891.
54. Gerken G, Canbay A. Sterbende Leberzellen. Die Bedeutung des Zelltodes bei Lebererkrankungen. *Essener Unikate* 2006;27:86.
55. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, and Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *PNAS* 2000;97:5499-5503.
56. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Liebermann J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine* 2003;3:347-351.
57. Zender L, Hütker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gösling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kühnel F, Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *PNAS* 2003;13:7797-7802.
58. Eichhorst ST, Krueger A, Muerköster S, Fas SC, Golks A, Gruetzner U, Schubert L, Opelz C, Bilzer M, Gerbes KL, Krammer PH. Suramin inhibits death receptor-induced apoptosis in vitro and fulminant apoptotic liver damage in mice. *Nature Med.* 2004;10:602-609.
59. Jeffrey L. Saver, Jeffrey Gornbein, James Grotta, David Liebeskind, Helmi Lutsep, Lee Schwamm, Phillip Scott, and Sidney Starkman. Number Needed to Treat to Benefit and to Harm for Intravenous Tissue Plasminogen Activator Therapy in the 3- to 4.5-Hour Window: Joint Outcome Table Analysis of the ECASS 3 Trial. *Stroke.* 2009;40:2433-2437.
60. Brad R.S. Broughton, David C. Reutens and Christopher G. Sobey. Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke* 2009;40:e331-e339.
61. Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Brück W, Dirnagl U, VEH RW, Endres M. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol.* 2003;13:452-464.
62. Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998;15;18(10):3659-68.
63. Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 1999;19:3809-3817.
64. Rosenbaum DM, Gupta G, D'Amore J, Singh M, Weidenheim K, Zhang H, Kessler JA. Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2000;61:686-692.
65. Kuida K, Boucher DM. Functions of MAP kinases: insights from gene-targeting studies. *J Biochem* 2004;135(6):653-6.
66. Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem* 2004;136(2):123-6.
67. Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:631-647.

68. Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogouslavsky J, Bonny C. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 2003;9:1180-1186.
69. Gao Y, Signore AP, Yin W, Cao G, Yin XM, Sun F, Luo Y, Graham SH, Chen J. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:694-712.
70. Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15184-15189.
71. Okuno S, Saito A, Hayashi T, Chan PH. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 2004;24:7879-7887.
72. Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, Johnson EM Jr. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 2003;38:899-914.
73. Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M. Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 1998;18:5124-5135.
74. Wang XS, Diener K, Jannuzzi D, Jannuzzi D, Trollinger D, Tan TH, Lichenstein H, Zukowski M, Yao Z. Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1996;271:31607-11.
75. Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 1998;281: 1860-3.
76. Kiriakidou M, Driscoll DA, Lopez-Guisa JM, Strauss JF, 3rd. Cloning and expression of primate Daxx cDNAs and mapping of the human gene to chromosome 6p21.3 in the MHC region. *DNA Cell Biol* 1997;16:1289-98.
77. Salomoni P, Khelifi AF. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* 2006;16:97-104.
78. Ko YG, Kang YS, Park H, Seol W, Kim J, Kim T, Park HS, Choi EJ, Kim S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm. *J Biol Chem* 2001;276:39103-6.
79. Green M & Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus TAT trans-activator protein. *Cell* 1988;55: 1179-1188.
80. Frankel AD & Pabo CO. Cellular uptake of the TAT protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988;55:1189-1193.
81. Kronenberg Katharina. Vakzinierung gegen die murine kutane Leishmaniose mit TAT-Lack transduzierten dendritischen Zellen. Dissertation Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg-Universität Mainz 2006
82. Wadia JS, Stan RV, & Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med* 2004;10:310-315.
83. Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, & Dowdy SF. Transduction of full-length TAT

- fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat.Med* 1998;4:1449-1452.
84. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, & Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999;285:1569-1572.
 85. Koseki T, Inohara N, Chen S, and Nunez G. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;103:645-654.
 86. Stoss O, Schwaiger FW, Cooper TA, Stamm S. Alternative splicing determines the intracellular localization of the novel nuclear protein Nop30 and its interaction with the splicing factor SRp30c. *J Biol Chem* 1999;274:10951-62.
 87. Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 2004;304: 843-6.
 88. Nam YJ, Mani K, Ashton AW, Peng CF, Krishnamurthy B, Hayakawa Y, Lee P, Korsmeyer SJ, Kitsis RN. Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions. *Mol Cell* 2004 ;15: 901-912.
 89. Jo DG, Jun JI, Chang JW, Hong YM, Song S, Cho DH, Shim SM, Lee HJ, Cho C, Kim DH, Jung YK. Calcium binding of ARC mediates regulation of caspase 8 and cell death. *Mol Cell Biol* 2004;24:9763-70.
 90. Li PF, Li J, Muller EC, Otto A, Dietz R, von Harsdorf R. Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol Cell* 2002 ;10:247-258.
 91. Pyo JO, Nah J, Kim HJ, Chang JW, Song YW, Yang DK, Jo DG, Kim HR, Chae HJ, Chae SW, Hwang SY, Kim SJ, Kim HJ, Cho C, Oh CG, Park WJ, Jung YK. Protection of cardiomyocytes from ischemic/hypoxic cell death via Drbp1 and pMe2GlyDH in cardio-specific ARC transgenic mice. *J Biol Chem* 2008 ;283 :30707-14.
 92. Li YZ, Lu DY, Tan WQ, Wang JX, Li PF. p53 initiates apoptosis by transcriptionally targeting the antiapoptotic protein ARC. *Mol Cell Biol* 2008;28:564-74.
 93. Foo RS, Chan LK, Kitsis RN, Bennett MR. Ubiquitination and degradation of the antiapoptotic protein ARC by MDM2. *J Biol Chem* 2007;282:5529-35.
 94. Gustafsson AB, Tsai JG, Logue SE, Crow MT, Gottlieb RA. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem* 2004;279:21233-8.
 95. Donath S, Li P, Willenbockel C, Al-Saadi N, Gross V, Willnow T, Martin U, Bauersachs J, Wollert KC, Dietz R, von Harsdorf R. ARC is required for cardioprotection in biomechanical and ischemic stress. *Circulation* 2006;113:1203-1212.
 96. An J, Li P, Li J, Dietz R, Donath S. ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Med* 2009;87(4):401-410.
 97. An J, Harms C, Lättig-Tünnemann G, Sellge G, Mandić AD, Malato Y, Heuser A, Endres M, Trautwein C, Donath S. TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain protein transduction rescues mice from fulminant liver failure. *Hepatology* 2012;56:715-726.
 98. An J, Mehrhof F, Harms C, Lättig-Tünnemann G, Lee SLL, Endres M, Li M, Sellge G, Mandić AD, Trautwein C, Donath S. ARC is a novel therapeutic approach against acetaminophen-induced hepatocellular necrosis. *J Hepatol* 2013;58:297-305.
 99. Donath S, An J, Lee SLL, Gertz K, Datwyler AL, Harms U, Müller S, Farr TD,

- Füchtemeier M, Lättig-Tünnemann G, Lips J, Foddiss M, Mosch L, Bernard R, Grittner U, Balkaya M, Kronenberg G, Dirnagl U, Endres M, Harms C. Interaction of ARC and Daxx: A novel endogenous target to preserve motor function and cell loss after focal brain ischemia in mice. *J Neurosci* 2016;36:8132-8148.
100. www.oskar-lapp-stiftung.de/index.php?id=630096; Datum des Aufrufs 16.12.2017
 101. Suk KT, Kim DJ. Drug-induced liver injury: present and future. *Clin Mol Hepatol* 2012;18(3):249-57.
 102. Ribe EM, Serrano-Saiz E, Akpan N, Troy CM. Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem J* 2008;415:165-182.
 103. Nadas J, Sun D. Anthracyclines as effective anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov* 2006;1(6):549-68.
 104. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;339:900-905.
 105. Fujimura L, Matsudo Y, Kang M, Takamori Y, Tokuhisa T, Hatano M. The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res* 2006;69:186-97.
 106. Kunisada K, Tone E, Negoro S, Nakaoka Y, Oshima Y, Osugi T, Funamoto M, Izumi M, Fujio Y, Hirota H, Yamauchi-Takahara K. Bclxl reduces doxorubicin-induced myocardial damage but fails to control cardiac gene downregulation. *Cardiovasc Res* 2002;53:936-43.
 107. Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn WP, Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 2003; 92:715-724.
 108. Lee WM. Acute liver failure. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33:36-45.
 109. Ni H, Chen X, Ding WX, Schuchmann M, Yin XM. Differential roles of JNK in ConA/GalN and ConA-induced liver injury in mice. *Am J Pathol* 2008;173:962-972.
 110. Maeda S, Chang L, Li ZW, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKK beta is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNF-alpha. *Immunity* 2003;19:725-737.
 111. Das M, Sabio G, Jiang F, Rincon M, Flavell RA, Davis RJ. Induction of hepatitis by JNK-mediated expression of TNF-alpha. *Cell* 2009;136:249-260.
 112. Wang Y, Singh R, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Czaja MJ. Tumor necrosis factor-induced toxic liver injury results from JNK2-dependent activation of caspase-8 and the mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 2006;281:15258-15267.
 113. Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T, Aoyagi Y. An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. *Life Sci* 2007;80:1335-1344.
 114. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000;108:567-574.
 115. Siegel RM, Fleisher TA. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:729-738.
 116. Fontana RJ, Quallich LG. Acute liver failure. *Curr Opin Gastroenterol* 2001;17:291-298.
 117. Moffit JS, Aleksunes LM, Kardas MJ, Slitt AL, Klaassen CD, Manautou JE. Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in clofibrate-mediated hepatoprotection from acetaminophen. *Toxicology* 2007;230:197-206.
 118. Donahower B, McCullough S, Hennings L, Simpson PM, Stowe CD, Saad AG,

- et al. Human recombinant Vascular Endothelial Growth Factor (hrVEGF) Reduces Necrosis and Enhances Hepatocyte Regeneration in a Mouse Model of Acetaminophen Toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334:33-43.
119. Gotthardt D, Riediger C, Weiss KH, Encke J, Schemmer P, Schmidt J, Sauer P. Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(Suppl 8):viii5-viii8.
 120. Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK Translocation to Mitochondria Leading to Inhibition of Mitochondria Bioenergetics in Acetaminophen-induced Liver Injury. *J Biol Chem* 2008;283:13565–13577.
 121. Gunawan BK, Liu ZX, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N. c-Jun Nterminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2006;131:165–178.
 122. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009;325:332-336.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Burkert Pieske für die Überlassung des Themas und Unterstützung meines Habilitationsvorhabens. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. Rainer Dietz für die außerordentliche wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Arbeit an der Charité, am Helios-Klinikum Berlin-Buch und am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin.

Meinen Mentoren Professor Dr. Rüdiger von Harsdorf und Dr. Peifeng Li bin ich zu großem Dank verpflichtet, da sie meine wissenschaftliche Arbeit weit über unsere gemeinsame Zeit am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin hinaus geprägt haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Junfeng An für sein Engagement in der Durchführung unserer Experimente sowie für sein Vertrauen in unsere Zusammenarbeit. Darüber hinaus danke ich ihm wie Professor Dr. Christoph Harms und Dr. Gernot Sellge für zahlreiche fruchtbare und inspirierende wissenschaftliche Diskussionen und die gute Kooperation.

Ganz herzlich möchte ich mich noch bei Professor Dr. Matthias Endres, Professor Dr. Christian Trautwein, Professor Dr. Kai Wollert und Professor Dr. Johann Bauersachs für die Durchführung gemeinsamer Projekte, viele hilfreiche Anregungen und wissenschaftliche Diskussionen bedanken.

Meinen technischen Mitarbeiterinnen Frau Marlies Grieben, Janet Lips, Katarzyna Pogodzinski und Daniela Krauthals danke ich für Ihr großes Engagement bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten. Mein herzlicher Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Ludwig Thierfelder, insbesondere Professor Dr. Brenda Gerull, Dr. Arnd Heuser und Dr. Jörg Drenckhahn für die außergewöhnlich freundschaftliche Atmosphäre und das inspirierende wissenschaftliche Arbeitsumfeld.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Frau Katharina und unseren Kindern Amélie, Linnéa, Jakob, Elijah, Madeleine und Noah für ihre liebevolle Unterstützung und ihr Verständnis für meine wissenschaftliche Tätigkeit und teilweise physikalische oder mentale Abwesenheit.

An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ganz herzlich bei meinen Eltern Marianne und Hans Werner Donath bedanken, die mich immer unterstützt und in vielerlei Hinsicht die frühen Voraussetzungen für diese wissenschaftliche Tätigkeit gelegt haben.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Datum

Unterschrift