

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie,
Campus Virchow-Klinikum Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Untersuchung des antiapoptotischen Effekts
von TAT-p21 bei der Doxorubicin-induzierten
Kardiomyopathie in der Maus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marek Tadeusz Nowak

aus Lubliniec (Polen)

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. C. Özcelik

2.: Prof. Dr. med. R. Willenbrock

3.: Priv.-Doz. Dr. med. T. Neumann

Datum der Promotion: 09.09.2011

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Klinischer Hintergrund	1
1.1.1. Herzinsuffizienz – die Rolle der Apoptose.	1
1.2. Apoptose	2
1.2.1. Caspasen.	3
1.2.2. Apoptotische Todessignalwege	4
1.2.3. Bcl-2-Familie	6
1.3. Zellzyklus	6
1.3.1. Zellzyklusregulation	7
1.3.2. Die Rolle von p21 in der Zellzyklusregulation	9
1.4. Zellzyklus und Apoptose	10
1.4.1. Die Rolle von p21 in der Apoptose	11
1.5. Doxorubicin und Apoptose	12
1.6. Transduktion von TAT-Fusionproteinen	14
1.7. Zielsetzung	15
2. Materialien	16
2.1. TAT-Proteine	16
2.2. Chemikalien	17
2.3. Lösungen und Puffer	18
2.4. Antikörper	20
2.5. Verwendete Geräte und Programme	21
3. Methoden	23
3.1. Übersicht der Methoden	23
3.2. Versuchsablauf	24
3.2.1. Beurteilung der Apoptose	24
3.2.2. Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie	25
3.3. Versuchstiere und Haltung	26
3.4. Herzentnahme	27
3.5. Histologische Arbeitsmethoden	27
3.5.1. Herzschnittanfertigung	27
3.5.2. Masson-Trichrom Färbung	27
3.5.3. Immunohistochemie	28
3.5.3.1. Nachweis der Apoptose mittels TUNEL-Test	28
3.5.3.1.1. Die quantitative Analyse von TUNEL-positiven Kardiomyozyten	29
3.6. Proteinbiochemische Methoden.	30
3.6.1. Protein Isolierung	30
3.6.1.1. Proteinaufreinigung mit dem Z-Puffer	31
3.6.1.2. Proteinaufreinigung mit dem hypotonischen Puffer	31
3.6.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	31
3.6.3. Westernblot-Analyse	34
3.6.4. Aktivitätsbestimmung der Caspase-3 und -7	34

Inhaltverzeichnis

3.7.	Molekularbiochemische Methoden	35
3.7.1.	RNA-Isolation	35
3.7.2.	Konzentrationsbestimmung von RNA	35
3.7.3.	DNase Behandlung	37
3.7.4.	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	37
3.7.5.	Quantitative Echtzeit-PCR	38
3.8.	Echokardiographie	
3.9.	Statistik	
4.	Ergebnisse.	39
4.1.	In vivo TAT-Protein Transduktion	39
4.2.	Apoptosedynamik von Herzmuskelzellen nach Stimulation mit Doxorubicin	40
4.3.	Wirkung verschiedener Dosen von TAT-p21 auf die Doxorubicin- induzierte Apoptose von Kardiomyozyten	42
4.4.	Beurteilung der Wirkung von TAT-p21 und TAT-p21 Δ C Fusionsproteinen auf Doxorubicin-induzierte Kardiomyozytenapoptose <i>in vivo</i>	44
4.5.	Effekt der TAT-p21 Transduktion auf Doxorubicin-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/ -7	45
4.6.	Relative Bcl-2/Bax Ratio	47
4.7.	Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie	49
4.7.1.	Gewichtsdynamik	49
4.7.2.	Herzgewicht	51
4.7.3.	Herzgewicht/Körpergewicht Ratio, Herzgewicht/Fibulalänge Ratio	52
4.7.4.	Echokardiographische Analyse	54
4.7.5.	Linksventrikuläre ANP mRNA- Expression	55
5.	Diskussion.	58
5.1.	Proteintransduktion	59
5.2.	Doxorubicin und Apoptose von Herzmuskelzellen	60
5.2.1.	Dynamik der Apoptose.	60
5.3.	Einfluss von TAT-Fusionsproteinen auf Doxorubicin-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten	63
5.3.1.	TUNEL-Analyse	63
5.3.2.	Caspasen-Aktivität	63
5.3.3.	Bcl-2/Bax Ratio	64
5.4.	Doxorubicin-induzierte Kachexie	65
5.5.	Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie	66
5.6.	Ausblick	68
6.	Zusammenfassung	69
	Literaturverzeichnis	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1. Mitochondrial- und Todesrezeptorvermittelte Todessignalwege	1
Abb. 1.2. Die Regulation des Zellzyklus	8
Abb. 1.3. Zellzyklus und Apoptose	10
Abb. 1.4. Die p53-p21 Achse	12
Abb. 1.5. Die antiapoptotische Funktion von p21	13
Abb. 2.1. Domänenstruktur von TAT-p21 und TAT-p21 Δ C	16
Abb. 3.1. Übersicht der Arbeitsmethoden	23
Abb. 3.2. Versuchsprotokoll	25
Abb. 3.3. Die Messung der mittleren Herzschnittfläche und der Anzahl von Kernen pro mm ²	30
Abb. 3.4. Echokardiographische Untersuchung	38
Abb. 4.1. Transduktion von TAT-p21 Fusionsproteinen	39
Abb. 4.2. Detektion kardiomyozytärer Apoptose nach Doxorubicin	40
Abb. 4.3. Zeitlicher Verlauf kardiomyozytärer Apoptose nach Doxorubicin	41
Abb. 4.4. Einfluss verschiedener Dosen TAT-p21 auf die Doxorubicin-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten	43
Abb. 4.5. Wirkung von TAT-p21 und TAT-p21 Δ C Fusionsproteinen auf Doxorubicin-induzierte Kardiomyozytenapoptose <i>in vivo</i>	45
Abb. 4.6. Caspase-3 /-7-Aktivitäten 24 Stunden nach Stimulation mit Doxorubicin und TAT-p21 Protein Transduktion	46
Abb. 4.7. Western Blot der Bcl-2 und Bax Regulation nach Doxorubicin Stimulation	47
Abb. 4.8. Densitometrische Auswertung der Bcl-2/Bax Ratio	48
Abb. 4.9. Gewichtsdynamik	50
Abb. 4.10. Herzgewicht	51
Abb. 4.11. Herzgewicht/Körpergewicht Ratio	52
Abb. 4.12. Echokardiographische Verkürzungsfraction (FS)	54
Abb. 4.13. Echokardiographischer linksventrikulärer enddiastolischer Diameter .	55
Abb. 4.14. Relative ANP Genexpression	56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1. Kardiovaskuläre Krankheiten, bei denen die Pathogenese der Apoptose eine wesentliche Rolle spielt	1
Tab. 3.1. Reagenzien für PCR	37
Tab. 3.2. RT-PCR-Reaktionsprogramm	37
Tab. 4.1. Gruppencharakteristik	53
Tab. 5.1. Anzahl der apoptotischen Kardiomyozytenkerne in ausgewählten Publikationen	61

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
mA	Milliampere
mm	Milimeter
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ASK1	Apoptosis Signalregulating Kinase 1 (Apoptose-stimulierende Kinase 1)
BSA	<u>B</u> ovin <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine (Rinderserumalbumin)
BCA	Bicinchonininsäure
Bcl-2	Gen bzw. Protein aus <u>B</u> - <u>c</u> ell Lymphoma
cDNA	complementary DNA
CDK	Cyclin Dependent Kinase (cyclinabhängige Kinase)
CKI	CDK-Inhibitor
DABCO	Diazabicyclo[2.2.2]octan Diethylene pyrocarbonate (Diethylpyrokarbonat)
Dnase	Deoxyribonuclease
DNA	Deoskyribonukleinsäure
Dox	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamine-N,N,N',N'-tetraacetate
FL	Fibulalänge
FS	Fractional Shortening (Verkürzungsfraction)
g	Gramm
h	Stunde (hora)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonsäure
HG	Herzgewicht
IE	Internationale Einheit
IAP	inhibitor of apoposis protein 1 (Apoptose-inhibierendes Protein 1)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactoside
KDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LVDd	linksventrikulären enddiastolischen Diameters
MAP	mitogen-activated protein (mitogenaktiviertes Protein)
Min	Minute
MHC	myosine heavy chain (schwere Myosinkette)
MHL	myosine light chain (leichte Myosinkette)
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisationssequenz)
PBS	PBS
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCNA	Proliferating Nuclear Antigen
PFA	Paraformaldehyd
PTD	protein transduction domain (Protein-Transduktions-Domäne)
rpm	rounds per minute (Umdrehung per Minute)

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung
TBST	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRITC	Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick end labeling

1. Einleitung

1.1. Klinischer Hintergrund

Herzinsuffizienz ist der häufigste Grund zur Aufnahme in stationäre Behandlung und die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Sie resultiert aus verschiedenen, z.B. ischämischen, hypertonen oder toxischen Ursachen. Doxorubicin ist ein wichtiges antineoplastisches Medikament, das durch eine sehr hohe Wirksamkeit in der Behandlung solider (z.B. Mammakarzinom, Leberkarzinom) und hämatopoetischer Tumore (z.B. akute myeloische und lymphatische Leukämie, multiples Myelom) charakterisiert ist. Seine Anwendung wird leider wegen kardiotoxischen Nebeneffekten, die sich nicht effektiv mittels pharmazeutischer Intervention vorbeugen lassen, limitiert.¹ Die kardiotoxische Wirkung von Doxorubicin ist u.a. durch die Apoptose von Kardiomyozyten gekennzeichnet.² Der Verlust von Herzmuskelzellen führt zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie mit einer verminderten Pumpfunktion.^{3,4} Durch die pharmakologische Therapie (beispielsweise mit ACE-Inhibitoren und Betablockern) könnten Mortalität und Morbidität von Patienten mit Herzinsuffizienz reduziert werden. Diese Prävalenz bleibt aber unverändert groß. Die derzeitige pharmakologische Therapie ist eher symptomatisch basiert als kausal, deshalb kann die Progression der Erkrankung nur unzureichend antagonisiert werden.

1.1.1. Herzinsuffizienz - die Rolle der Apoptose

Kardiomyozyten sind enddifferenzierte, postmitotische Zellen, die die Fähigkeit zur Teilung weitgehend verloren haben. Das adulte Myokard ist deswegen nicht in der Lage den Verlust von Herzmuskelzellen (z.B. durch Herzinfarkt) durch Proliferation zu kompensieren. Eine Leistungssteigerung des geschädigten Herzmuskels kann durch Hypertrophie der erhaltenen Kardiomyozyten erzielt werden.⁵ Eine Vielzahl von Untersuchungen der letzten Jahre haben die Bedeutung des kontrollierten Zelltodes (Apoptose) für diverse kardiovaskuläre Erkrankungen aufgezeigt (Tabelle 1.1.).

Krankheit
Dilatative Kardiomyopathie
Ischämische Kardiomyopathie
Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
Akuter Herzinfarkt
Atherosklerose
Myokarditis
Präexzitations-Syndrom

Tab. 1.1. **Kardiovaskuläre Krankheiten, bei denen die Pathogenese der Apoptose eine wesentliche Rolle spielt.** ⁶

1.2. Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde von Kerr im Jahre 1972 eingeführt. Er beschreibt einen evolutionär konservierten Prozess des programmierten Zelltodes. Die Apoptose ist ein genetisch reguliertes, energieabhängiges Zelltod-Programm, das eine einzelne Zelle betrifft.⁷ Der apoptotische Zelltod ist morphologisch durch Schrumpfen des Zytoplasmas, Kondensierung und Fragmentierung des nukleären Chromatins und nachfolgende Zellfragmentierung in membranumschlossene Abschnürungen (apoptotic bodies, apoptotische Körperchen) gekennzeichnet. Sie werden anschließend von den Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert, ohne eine inflammatorische Reaktion auszulösen.⁸

Der apoptotische Zelltod spielt eine wesentliche Rolle in fundamentalen biologischen Prozessen, wie Wachstum, Differenzierung, Inflammation und Immunabwehr. Defekte Apoptosemechanismen, die sowohl zum Anstieg als auch zur Hemmung der Apoptose führen, liegen einer Vielzahl von Erkrankungen zugrunde. Ein übermäßiger apoptotischer Zelltod ist in der Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose) sowie ischämischen Syndromen (Herzinfarkt, Schlaganfall und postischämischer Reperfusionsschaden) involviert.^{6,9,10} Andererseits kann eine ineffektive oder eine fehlende apoptotische Elimination entarteter, autoreaktiver oder infizierter Zellen zur Entstehung von Neoplasien, Autoimmunkrankheiten und persistierender Infektionen führen.

Im Gegensatz zur Apoptose steht die Nekrose. Hierbei handelt es sich um einen weitgehend passiven Prozess, der abläuft, wenn die geschädigte Zelle nicht mehr fähig ist, auf kontrollierte Weise zu sterben. Nekrotischer Zelltod ist gekennzeichnet durch rapide Zellschwellung, Membranruptur und daraus resultierende Freisetzung von lytischen Enzymen.¹¹ Beide Formen des Zelltodes bewirken im Myokard verschiedene Folgen. Die Konsequenz der Nekrose von Herzmuskelzellen ist eine entzündliche Reaktion, Proliferation von Gefäßen und Fibroblastenaktivierung. Diese Prozesse führen letztendlich zur Narbenbildung. Auf der anderen Seite verursacht die Apoptose keine Fibrosierung, die apoptotischen Körperchen werden eliminiert, ohne eine nachweisbare Änderung in der Morphologie des Herzgewebes auszulösen.¹² Die einzelnen apoptotischen Kardiomyozyten sind gleichmäßig über das Herzgewebe verteilt. Daraus resultiert die Umstrukturierung der Zellen im Ventrikel, die zur Abnahme der Wanddicke und Vergrößerung des Ventrikelvolumens (Dilatation) führt.¹³ Eine diffuse Anordnung der apoptotischen Kardiomyozyten hat einen stärkeren Einfluss auf die Hämodynamik des Herzens im Vergleich zur segmentalen Verteilung.¹⁴

1.2.1. Caspasen

Die Apoptosesignale führen unmittelbar zur Aktivierung von Caspasen (Cystein aspartic acid proteases) - den ausführenden Faktoren des programmierten Zelltodes. Diese intrazellulären Zystein-abhängigen Proteasen spalten spezifisch Proteine hinter einem Aspartatrest. Die einzelnen Caspasen sind über eine proteolytische Kaskade miteinander verbunden. Die aktivierte Protease triggert eine zur Apoptose führende Signalkette. Beim Menschen wurden mehr als 12 verschiedene Caspasen beschrieben. Die sogenannten Initiator-Caspasen, wie Caspase-2, -8, und -9 werden früh in der Signaltransduktionskette durch Dimerisation aktiviert. Die Effektor-Caspasen wie z. B. die Caspasen-3, -6 und -7 werden durch eine proteolytische Abspaltung der Pro-Domäne von einem inaktiven Pro-Enzym aktiviert. Sie spalten lebensnotwendige Substrate und führen dadurch zum zellulären Rückgang.¹¹ Die Fragmentierung der chromosomalen DNA initiiert die Aktivierung der Caspase-3-abhängigen DNase I (CAD - Caspase-activated DNase) und die Spaltung von DNA fragmentierendem Faktor (DFF – DNA Fragmentation Factor). Gleichzeitig wird die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase gespalten, und damit DNA-Reparaturmechanismen verhindert.

Zu Substraten von Caspasen im Herz gehören u.a. α -Aktin, α -Aktinin, schwere- α/β -Myosin Kette (α/β -MHC - myosin heavy chain), leichte Myosin Kette-1/2 (MLC-1/2 - myosin light chain), Tropomyosin und Troponin. Die Spaltung von Myofilamenten führt zur Dysfunktion von Kardiomyozyten und zur Verminderung der systolischen Herzfunktion selbst dann, wenn sie der Apoptose entkommen sind.¹⁵ Im Myokardinfarkt-Tiermodell reduziert die Hemmung der Caspasen-Aktivierung die Infarktgröße sowie Anzahl von apoptotischen Kardiomyozyten und geht mit der Aufrechterhaltung der hämodynamischen Herzfunktion einher.¹⁶

1.2.2. Apoptotische Todessignalwege

Die Apoptose wird über zwei Hauptsignaltransduktionswege vermittelt, über den "intrinsischen" (mitochondrialen) Weg und über den "extrinsischen" (Todesrezeptor-) Weg. Die Todessignale verursachen eine Störung der mitochondrialen Physiologie. Die Öffnung von MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) führt zur Freisetzung von Cytochrom c, AIF (Apoptosis Inducing Faktor, Apoptose induzierender Faktor), Endonuklease G (endo G), Smac (second mitochondrial activator of apoptosis) aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. Dieses Ereignis treibt die Apoptose an. Das freigesetzte Cytochrome c assoziiert mit dem zytosolischen Protein Apaf-1 (apoptotic protease-activating Faktor 1, Apoptose Aktivierungsfaktor) und bildet zusammen mit Pro-Caspase-9 das sogenannte Apoptosom. Pro-Caspase-9 wird autokatalytisch aktiviert und die Effektor-Caspase-Signalkaskade wird eingeleitet. Diese Sequenz verfügt über multiple Kontrollmechanismen, bei denen u.a. IAP-Proteine (Inhibitor of Apoptosis) und anti-apoptotische BCL-2 Familienmitglieder eine wichtige Rolle spielen.¹⁷ Dieser Weg wird hauptsächlich in Kardiomyozyten durch Stimuli wie Hypoxie, Ischämie-Reperfusion und oxidativen Stress aktiviert.¹⁸

Der extrinsische Weg läuft über membran-gebundene Todesrezeptoren [u.a. Tumornekrosefaktor-Rezeptor α (TNFR), Fas-Rezeptor (APO-1/CD95)], die durch Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne aktiviert werden. Die Aktivierung dieser Rezeptoren steuert die Rekrutierung von Adaptorproteinen wie FADD (Fas-associated death domain, Fas-assoziierte Todesdomäne). Über diese Moleküle bindet die Initiator-Caspase-8 an den Rezeptor via die intrazelluläre Todesdomäne - DD (Death Domain). Auf diesem Weg entsteht der sogenannte DISC (death-inducing signaling complex,

Tod-induzierender Signalkomplex) - ein zytosolischer Komplex aus FADD und Caspase-8. Die Caspase-8 wird an diesem Komplex aktiviert und transloziert, dann gelangt sie ins Zytoplasma, wo sie Effektor-Caspasen durch die proteolytische Spaltung aktiviert.^{19,20} Diese Signalkaskade kann sowohl auf Ebene der Adapter, z.B. durch FLIPs (short variant of Fas-linked inhibitory protein) oder SOD-Proteine (Silencer of Death Domain) als auch auf der Caspasen-Ebene z.B. durch FLIPI (long variant of FLIP) inhibiert werden.^{21,22}

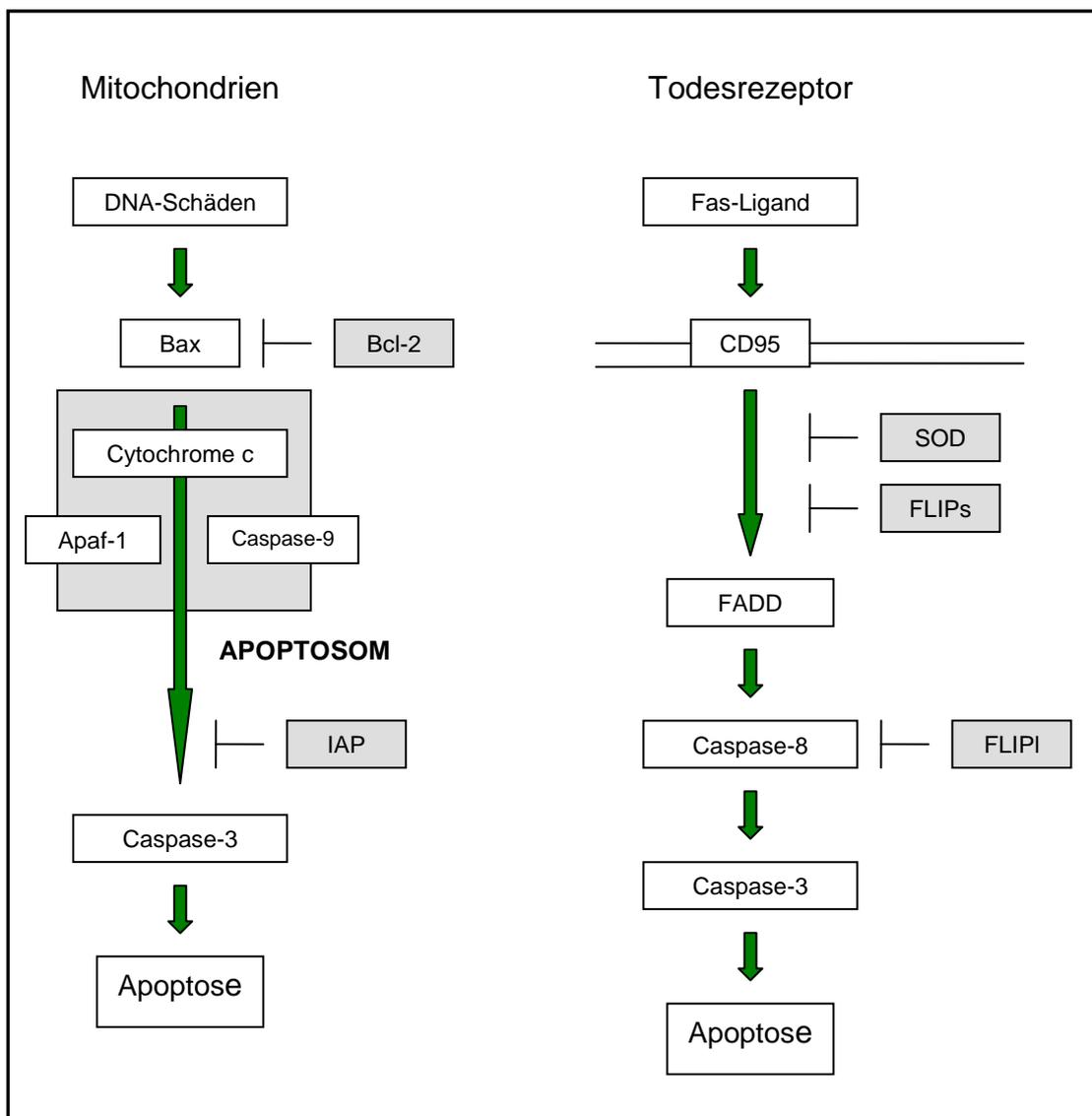


Abb. 1.1. **Mitochondrial- und Todesrezeptorvermittelte Todessignalwege (bearbeitet)**²³

Fas-Ligand wird stark in adulten Kardiomyozyten exprimiert und seine Expression steigt als Antwort auf pathologische Stimulation. In diesem Sinne zeigte sich sFas (soluble

Fas) im Serum bei Patienten mit Herzversagen deutlich erhöht (Abb. 1.1).^{24,25}

1.2.3. Bcl-2-Familie

Bcl-2 Genfamilienmitglieder (von B-cell lymphoma) fungieren als Hauptregulatoren der Apoptose. Sie bestehen aus zwei Gruppen: Apoptose-blockierende Faktoren: Bcl-2, Bcl-xL und Aktivatoren des Apoptoseprogramms: Bax und Bak. Sie sind hauptsächlich in der äußeren Mitochondrienmembran, aber auch in der Kernmembran und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Sie regulieren den mitochondrialen Signalweg durch die Kontrolle der Integrität der mitochondrialen Membran und die Freisetzung von proapoptotischen intermembranösen Proteinen. Diese Proteinfamilie enthält unterschiedliche Kombinationen konservierter BH-Domänen (Bcl-2 Homologie, BH 1-4), die Homo- und Heterodimere bilden. Die antiapoptotischen Eigenschaften von Bcl-2 beruhen auf vielen Mechanismen. Die Expression von Bcl-2 verhindert die Ausschüttung von proapoptotischen Molekülen aus Mitochondrien. Bcl-2 übt eine inhibitorische Wirkung auf proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie und AIF aus und zeigt ebenfalls eine direkte antioxidative Wirkung.²⁶⁻²⁸ Die Überexpression von Bcl-2 in Kardiomyozyten schützt die Zelle vor Apoptose und reduziert dadurch die Infarkt-Größe im Tiermodell.²⁹ Der Apoptose-aktivierende Effekt von Bax wird auf Interaktionen mit Bcl-2 und auf Porenbildung im Bereich der äußeren mitochondrialen Membran zurückgeführt, wodurch die Physiologie von Mitochondrien beeinträchtigt wird. Eine erhöhte Membrandurchlässigkeit für Wasserstoff- und Calcium-Ionen resultiert in einem Zusammenbruch des Membranpotentials und führt anschließend zur Ausschüttung von proapoptotischen Proteinen. Das Verhältnis von antiapoptotischem Bcl-2 zu proapoptotischem Bax kann entscheidend für das Zellüberleben sein.³⁰

1.3. Zellzyklus

Unter Zellzyklus versteht man die Ganzheit aller biochemischen Prozesse die während der Teilung einer Zelle stattfinden. Er ist ein exakt koordiniert komplexer Vorgang, der nach einem universalen Programm abläuft. Der somatische Zellzyklus besteht aus vier voneinander abgrenzbaren Phasen: G₁, S, G₂, M. Im Intervall zwischen Mitose und S-Phase (G₁-Phase) erhöht die Zelle die Biosyntheserate und tritt in die Vorbereitung für

die DNA-Synthese. Während der S-Phase kommt es zur exakten Replikation des Genoms. In der G₂-Phase wird der Spindelapparat aufgebaut. Anschließend während der Mitose (M-Phase) findet die Verteilung der Chromosomen und die Segregation in zwei neue Tochterzellen statt.³¹

1.3.1 Zellzyklusregulation

Die Kontrolle der Progression der Zelle durch die Zellzyklusphasen erfolgt zu bestimmten Zeitpunkten, den sogenannten Restriktionspunkten. Diese kommen an der G₁/S-Phasengrenze, in der S-Phase und während der G₂- und M-Phase vor. Diese Kontrollpunkte erlauben die Passage durch den Zellzyklus beim Vorliegen bestimmter, externer Wachstumssignale.³²

Die Zellzyklusregulation beruht auf komplexen Interaktionen zwischen verschiedenen Faktoren des Zellzyklus. Das Regulationssystem umfasst Cykline, Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK - Cyclin Dependent Kinase), CDK-Inhibitoren, die Retinoblastoma (Rb)-Genfamilie (pRb, p107 und p130) und Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Die sequentielle Aktivierung von CDKs - einer konservierten Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen und die anschließende Phosphorylierung spezifischer Substratproteine koordiniert die Progression des Zellzyklus.³³ Die enzymatische Aktivität der CDKs wird auf verschiedenen Ebenen reguliert: Synthese, subzelluläre Lokalisation und Anlagerung der Cykline, inhibitorische oder aktivierende Phosphorylierung der Untereinheiten, Assoziation mit CDK-Inhibitoren.^{32,34} Die Bindung der Cykline aktiviert CDKs. Die Konzentration der CDKs bleibt im Verlauf des Zellzyklus relativ konstant, dagegen zeigen die Cykline einen zellzyklusphasenabhängigen Expressionsspiegel. Die Akkumulation und die abrupte ubiquitin-regulierte Degradation der spezifischen Cykline sind entscheidend für das Fortschreiten der Zelle durch die Phasen des Zellzyklus. Dieser Vorgang - Aktivierung einer CDK durch ein spezifisches Cyclin - ereignet sich in allen Phasen des Zellzyklus. In der G₁-Phase sind die Cykline D1-3 und CDK4, -6 aktiv, der G₁/S-Phaseübergang wird von Cyclin A, E und CDK2 kontrolliert. Für die G₂-Phase und Mitose spielen die Cykline A, E und cdc 2 (cell division cycle 2; Zellteilung-Zyklus 2) eine zentrale Rolle.^{35,36} Die Cyclin/CDK-Komplexe werden durch zwei Inhibitor-Familien, die INK4-Familie und die CIP/KIP-Familie beeinflusst.³⁷ Beide Gruppen unterscheiden sich strukturell und interagieren mit Cyclinen und CDKs auf

verschiedene Weise. Die INK4-Proteine ($p16^{\text{INK4a}}$, $p15^{\text{INK4b}}$, $p18^{\text{INK4c}}$, $p19^{\text{INK4d}}$) wirken spezifisch inhibitorisch auf CDK4 und CDK6. Die CIP/KIP-Proteine ($p21^{\text{CIP1}}$, $p27^{\text{KIP1}}$, $p57^{\text{KIP2}}$) haben ein breiteres Wirkungsspektrum, sie binden an viele Cyklin/CDK-Komplexe, einschließlich Cyklin D/CDK4 oder Cyklin D/CDK6, Cyklin E/CDK2 während der G₁-Phase und Cyklin A/CDK2 während des G₁/S-Übergangs und während der gesamten S-Phase (Abb.1.2.).³⁸ Cyklin/CDK-Komplexe phosphorylieren hauptsächlich Pocket-Proteine der Rb-Familie (pRB, p107, p130), die als transkriptionelle Repressoren negativ den Fortschritt der G₁- und S-Phase regulieren. Ihre Aktivität wird durch den Phosphorylierungsstatus reguliert. Im hypophosphorylierten Zustand translozieren die Cyklin/CDK-Komplexe in den Zellkern und inhibieren Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie durch die reversible Bindung. Demzufolge hemmen sie spezifisch die Promotoraktivierung zellzyklus-regulierender Gene (z.B. Histone, PCNA-Proliferating Nuclear Antigen, Difolatreduktase, Ribonuklotidreduktase). Ein Übergang von der G₁- in die S-Phase ist nur bei hyperphosphorylierten Rb-Proteinen möglich, die inaktiv im Zytoplasma festgehalten werden.^{39,40}

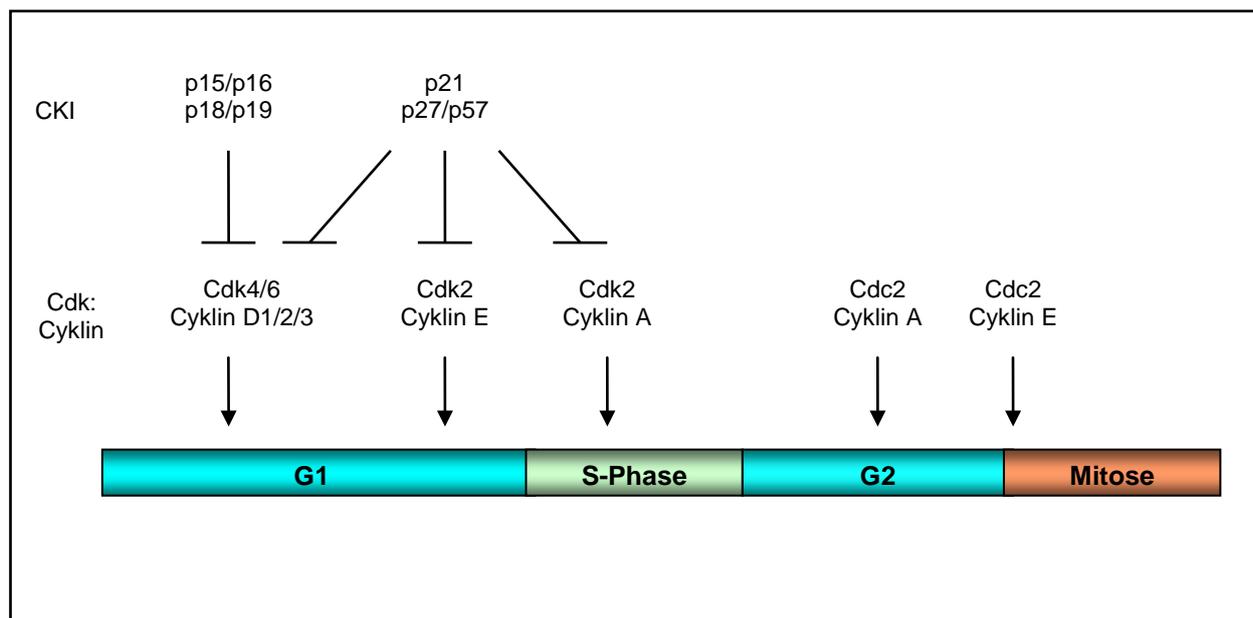


Abb. 1.2. **Die Regulation des Zellzyklus**

Das Fortschreiten durch Zellzyklusphasen wird über sequentielle Aktivierung von CDKs koordiniert. Ihre Aktivität wird u.a. durch die Synthese und Bindung von spezifischen regulatorischen Subunits (Cyklone) und CDK-Inhibitoren reguliert.⁴¹

1.3.2. Die Rolle von p21 in der Zellzyklusregulation

Die Zellen in der ruhenden G_0 -Phase sind charakterisiert durch eine niedrige p21-Expression und einen hohen p27-Spiegel, der den Eintritt in den Zellzyklus hemmt. Nach mitogener Stimulation wird der Spiegel von p27 herunterreguliert und p21 wird als negativer Feedbackmechanismus während der G_1 -Phase hochreguliert. Obwohl p21 als CDK-Inhibitor bezeichnet wird, ist seine Regulatorfunktion im Zellzyklus nicht eindeutig. Zusammen mit p27 beeinflusst es die Cyclin/CDK-Komplexe sowohl negativ als auch positiv.

Die CIP/KIP-Familie der Zellzyklusinhibitoren bindet über eine spezifische separate Domäne im N-terminalen Fragment sowohl an Cykline als auch an CDK.⁴² Die Bindung an Cykline/CDK-Komplexe ist allein nicht ausreichend um inhibitorische Aktivität auszuüben. Das Onkoprotein E7 vom Humanen Papilloma Virus 16 (HPV-16) bindet an p21 im C-terminalen Fragment. Die Assoziation mit E7 entzieht p21 die Eigenschaft die Cyclin/CDK Aktivität zu hemmen, ohne die Verknüpfung mit Cyclin/CDK-Komplexen zu stören.⁴³ Eine Punktmutation von Aminosäure 94 macht die Inhibierung von CDK durch p21 unmöglich, obwohl die Bindung an den Cyclin/CDK-Komplex unversehrt bleibt.⁴⁴ CIPs fungieren vorwiegend als CDK2-Inhibitoren. Es wurde aber auch gezeigt, dass p21 und p27 Interaktionen zwischen CDK4/6 und Cyclin D hauptsächlich durch Stabilisation des Komplexes fördern. Demzufolge werden CIP-Inhibitoren durch die Akkumulation von D-Cyklinen in der frühen G_1 -Phase sequestriert und die enzymatische CDK2/Cyclin E Aktivität wird hochreguliert. Diese Interaktionen erleichtern den G_1/S Übergang und deuten auf eine andere, nicht katalytische Funktion von CyclinD/CDK-Komplexen bei der Zellzyklusregulation hin.^{36,45,46} p21 kann Zellzyklusprogression auch über PCNA, einen Replikation- und Reparaturfaktor, regulieren. PCNA ist eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ , die die DNA-Polymerase mit der DNA verankert. Diese Verbindung ist unabdingbar für die DNA-Synthese in der S-Phase. p21 kann durch die Bindungsstelle am C-Terminus mit PCNA interagieren und die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase δ blockieren. Der Zellzyklus wird in Folge in der S-Phase arretiert.⁴⁷ Die Reparaturfunktion von PCNA wird aber nicht durch diese Interaktionen beeinträchtigt.⁴⁸

1.4. Zellzyklus und Apoptose

Das Gleichgewicht zwischen der Zellteilung und der Apoptose wird für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase streng reguliert. Zahlreiche Ähnlichkeiten zwischen dem Zellzyklus und der Apoptose deuten auf eine Verbindung der beiden Prozesse hin. Extremen Meinungen folgend ist die Apoptose sogar eine Variante des gestörten Zellzyklus. Die rapide Aktivierung von CDK2 geht in vielen experimentellen Systemen, auch in kultivierten Kardiomyozyten anfangs mit programmiertem Zelltod einher.⁴⁹ Die Zellzyklusprogression stimulierende Signale können auch Zelltodsignale aktivieren.

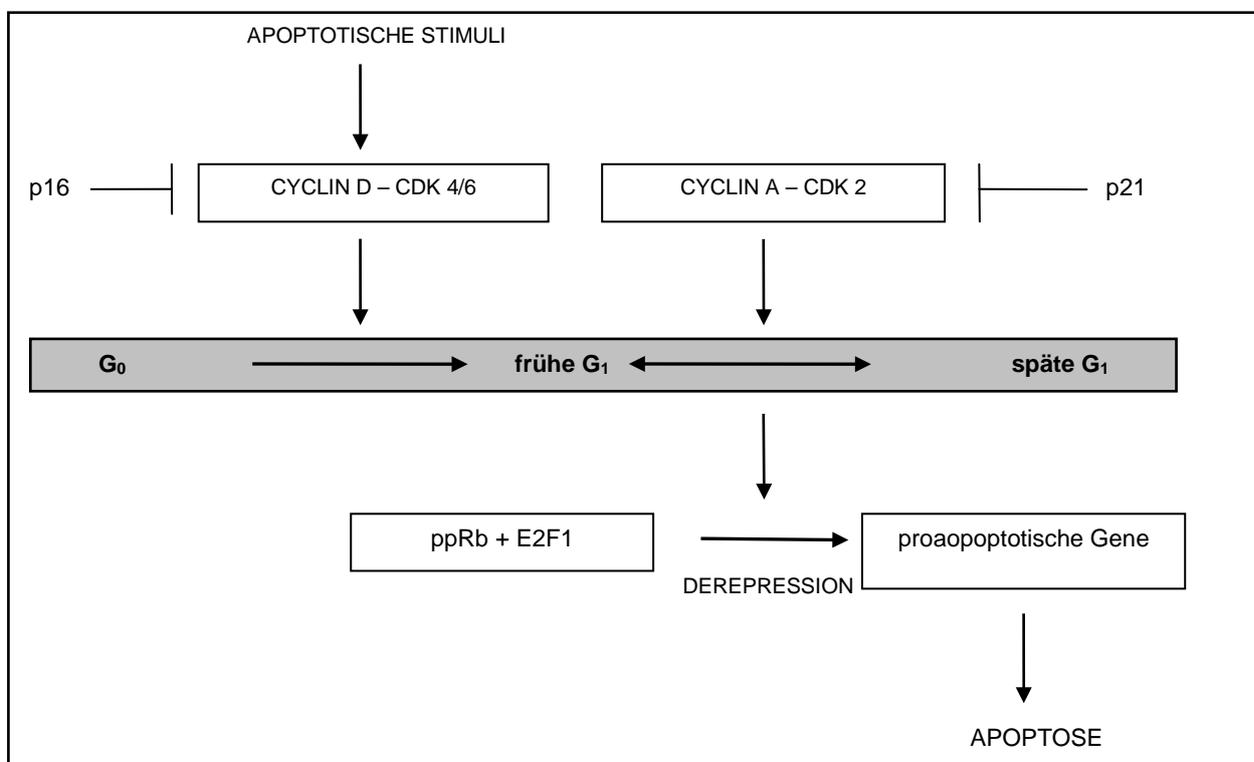


Abb. 1.3. **Zellzyklus und Apoptose**

Zellzyklusregulierende Faktoren spielen eine essentielle Rolle bei der Durchführung vom programmierten Zelltod.

Die Überexpression von positiven Zellzyklusregulatoren wie E2F-1,⁵⁰ Cyclin D1,⁵¹ Protoonkogen c-myc,⁵² cdc25-Phosphatase (cell division cycle 25)⁵³ kann auch zum programmierten Zelltod führen. Wie beim G₁/S Übergang ist die transkriptionelle Aktivität von E2F auch beim Eintritt in die Apoptose erforderlich. Falls keine

entsprechende Aktivierungsbedingungen existieren, löst E2F nicht die G₁/S-Transition, sondern Apoptose aus (Abb.1.3).⁵⁴

Die Zelle kann ausschließlich durch die Koordination von Überlebenssignalen (z.B. IGF-1 – Insulin-like growth factor 1, insulinähnlicher Wachstumsfaktor) oder wenn sie im entsprechenden Zeitpunkt des Zellzyklus arretiert wird vor Apoptose gerettet werden.^{50,55} Demgemäß fungieren die Zellzyklus-Inhibitoren, vor allem p21, ebenfalls als antiapoptotische Faktoren.

Zusammenfassend sind der programmierte Zelltod und der Zellzyklus eng verbundene Prozesse, die sich in einem fein regulierten Gleichgewicht befinden.

1.4.1. Die Rolle von p21 in der Apoptose

Die Funktion von p21 im programmierten Zelltod wurde in vielen Studien untersucht. Zellen mit herunterregulierter Expression von p21^{CIP1/WAF1} bzw. die p21^{CIP1(-/-)}-defiziente Zellen sind durch eine gesteigerte Anfälligkeit für Apoptose im Vergleich zu Wildtypzellen gekennzeichnet.⁵⁶ Die antiapoptotische Wirkung von p21^{CIP1/WAF1} ist nicht nur verbunden mit der Fähigkeit Zellzyklusarrest auszulösen, sondern auch mit Interaktionen mit vielen proapoptotischen Faktoren. Die zellzyklusinhibierende Wirkung von p21 ist abhängig von der nuklearen Lokalisation, dagegen wird die antiapoptotische Funktion auch zytoplasmatisch ausgeübt.⁵⁷

Die Expression von p21 wird unter anderem vom p53 Tumorsuppressor reguliert, einem wichtigen Regulator der Apoptose und des Zellzyklus. P53 fungiert als "Wächter des Genoms" und wird z.B. nach DNA-Schädigung aktiviert, was zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führt. Die DNA-Schäden führen zur posttranslational-regulierten Ansammlung von p53 und durch erhöhte Expression von p21 zum G₁-Arrest.⁵⁸ Dieser Vorgang kann als Feedback-Mechanismus für p53 Aktivierung und Antwort auf genotoxischen Stress angesehen werden.⁵⁹ Bei einer ungenügenden Expression von p21 schreitet der Zellzyklusarrest weiter zum apoptotischen Zelltod voran (Abb.1.4).⁶⁰

p21 kann die Zelle ebenfalls vor der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose bewahren.⁶¹ Dieser Zellzyklusregulator ist auch ein Substrat für Caspase-3, die seine Kernlokalisationssequenz abspaltet. Anschließend wird p21 ins Zytoplasma transloziert und die Aktivität von CDK2 wird infolgedessen hochreguliert.^{62,63}

Dieses Ereignis ist die Vorbedingung für Apoptose. CDK2-Aktivität kann erforderlich für

Kernchromatinkondensation, Schrumpfen der Zelle und Auflösung der Zellkontakte sein.⁶⁴ Auf der anderen Seite ist p21 fähig an die inaktive Pro-Caspase-3 im Zytoplasma zu binden und seine proteolytische Aktivierung zu hemmen.⁶⁵

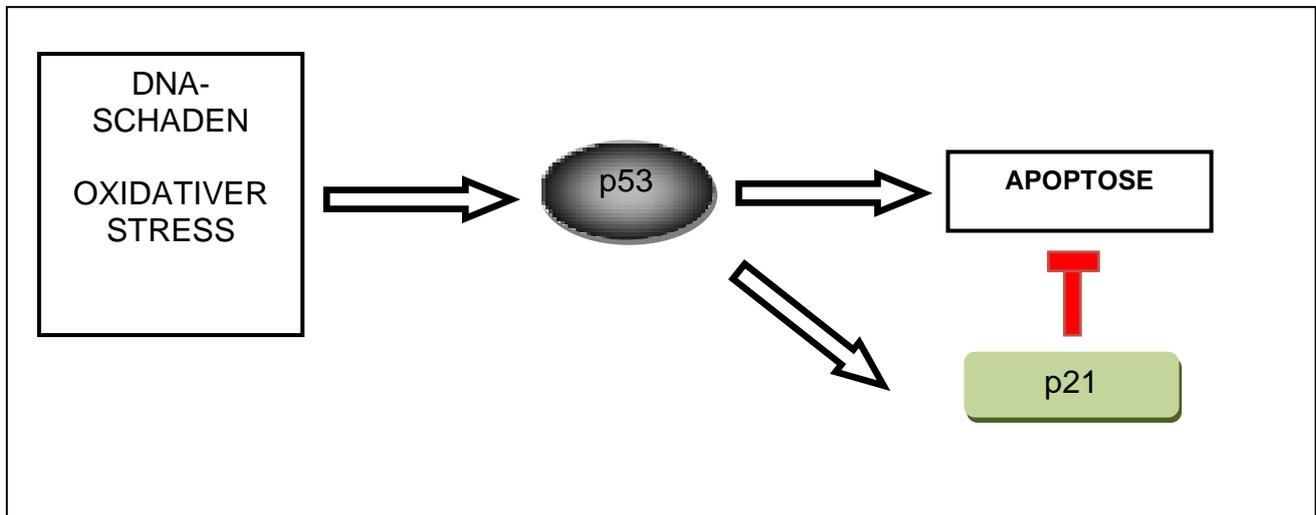


Abb. 1.4. Die p53-p21 Achse

Die p53 Aktivierung infolge von DNA-Schäden und oxidativem Stress induziert den Programmierten Zelltod. Die p53-anhängige transkriptionelle Aktivierung von p21 fungiert als Feedback-Mechanismus und führt bei genügender Expression zum Zellzyklusarrest anstatt von Apoptose.

p21 kann sowohl Caspase-8 inhibieren wie auch c-IAP1 (inhibitor of apoptosis protein 1, Apoptose-inhibierendes Protein 1), einen direkten Caspase-3-Inhibitor, stabilisieren.⁶⁶ Überdies kann der zytoplasmatische p21 Komplex an ASK1 (Apoptosis Signalregulating Kinase 1, Apoptose-stimulierende Kinase 1) binden und dadurch stressaktivierte MAP-Kinasekaskaden (mitogen-activated protein, mitogenaktivierte Protein) inhibieren (Abb.1.5).⁶⁷ Der p21-vermittelte antiapoptotische Mechanismus ist sehr vielseitig und weiterhin nicht vollständig aufgeklärt. Er ist vor allem mit einem erhöhten Expressionsniveau verbunden. P21 scheint ein kritischer Regulator sowohl für den Zellzyklus als auch für die Apoptose zu sein.

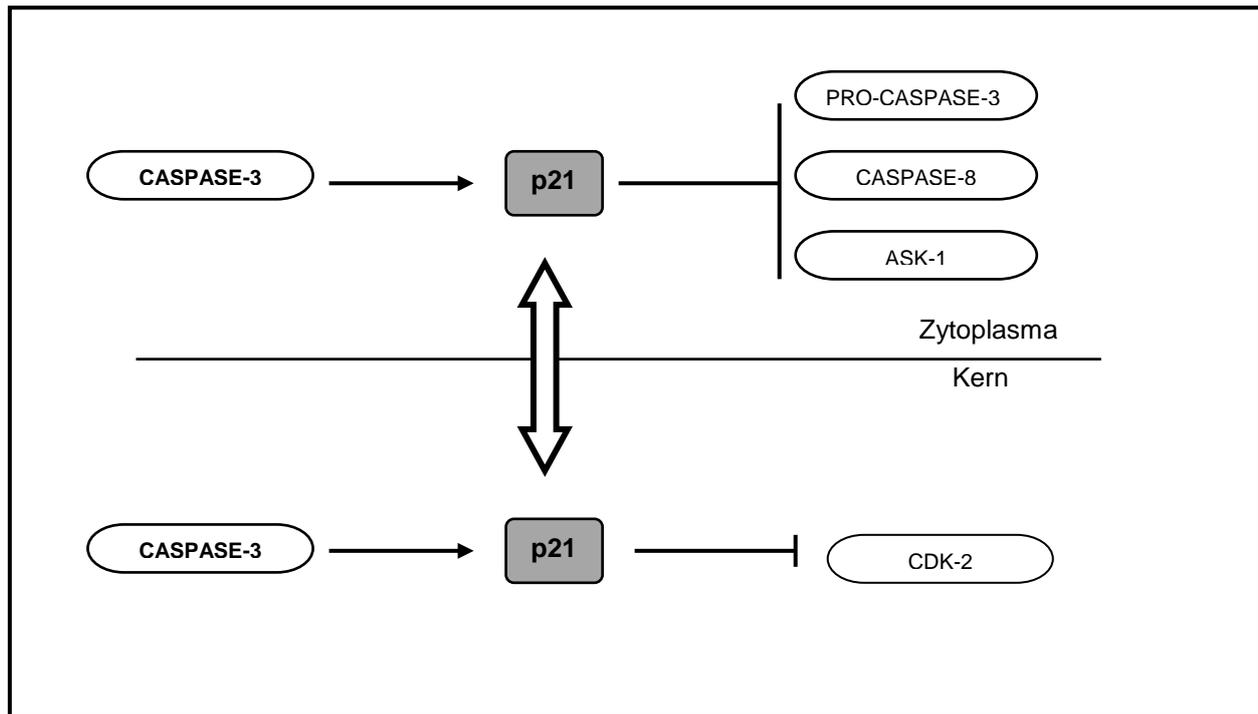


Abb. 1.5. **Die antiapoptotische Funktion von p21**

p21 interagiert mit vielen Faktoren, die im apoptotischen Prozess involviert sind. Gleichzeitig stellt p21 das Substrat für Caspase-3, einen Effektor der Apoptose dar.

1.5. Doxorubicin und Apoptose

Doxorubicin ist ein wichtiges antineoplastisches Medikament, das sich durch eine hohe Wirksamkeit bei der Behandlung solider Tumoren (z.B. Mammakarzinom, Leberkarzinom) sowie von Blutkrebs (z.B. akute myeloische und lymphatische Leukämie, multiples Myelom) auszeichnet. Seine Anwendung ist aufgrund kardiotoxischer Nebeneffekte, die sich nicht effektiv mittels Pharmakotherapie verhindern lassen, limitiert. Der kardiotoxische Effekt von Doxorubicin ist u.a. durch Apoptose von Kardiomyozyten gekennzeichnet.² Doxorubicin ist ein potenter Apoptoseinduktor, der den programmierten Zelltod durch p53-abhängige und p53-unabhängige Mechanismen induziert. Die Mitochondrien stellen das Hauptziel des Doxorubicin-induzierten Herzschadens dar. Doxorubicin triggert die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrome c, welches nachfolgend zu einer Aktivierung der Caspasenkaskade führt.^{68,69} Der Verlust von Herzmuskelzellen führt letztendlich zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie mit verminderter Pumpfunktion.

1.6. Transduktion von TAT –Fusionsproteinen

Die Zellmembran stellt für Proteine unter physiologischen Bedingungen eine impermeable Barriere dar. 1988 wurde die Eigenschaft des HIV TAT-Proteins nachgewiesen, die Zellmembran direkt zu passieren.^{70,71} Die chemische Kopplung des TAT-Proteins an heterologes Protein, wie β -Galaktosidase, ermöglicht nach Zugabe zum Zellkulturmedium einen direkten Transport vom Fusionsprotein in die Zellen.⁷² Diese Eigenschaften der TAT-Fusionsproteine wurden auch *in vivo* nach intraperitonealer Injektion in die Maus nachgewiesen.⁷³ Die histologische Analyse zeigte eine gleichmäßig verteilte β -Galaktosidase-Aktivität in allen Organen, einschließlich Myokard und Gehirn.⁷⁴ Die Untersuchungen von vielen TAT-Proteinen zeigte, dass eine basische Region zwischen Aminosäuren 47-57 für eine effektive Internalisierung ausreichend ist. Sie wird als Protein-Transduktions-Domäne (PTD, protein transduction domain) bezeichnet. Die Aufnahme von TAT-Proteinen ist zeit- und konzentrationsabhängig. Der exakte Mechanismus der Proteintransduktion ist noch nicht völlig geklärt. Die ersten Untersuchungen zeigen eine direkte, schnelle Penetration durch die Zellmembran in temperatur-, rezeptor- und energieunabhängiger Weise.⁷² Die neusten Ergebnisse von Wadia deuten auf Makropinozytose als Transduktionsmechanismus hin.⁷⁵ Die Bindung an die TAT-Sequenz macht nicht nur die Transduktion von Proteinen möglich, sondern auch Liposomen, Lambda-Phagen und Nanopartikel können auf diese Weise in die Zelle transportiert werden.^{76,77,78} Die Fähigkeit der PTD-Fusionsproteine zur Modulation der Zellbiologie wurde mit Erfolg in verschiedenen Tiermodellen getestet. So wurden u.a. TAT-p27 im Krebsmodell sowie TAT-Bcl-xL im Schlaganfallmodell getestet.^{79,80} Andere PTD liegen in Antennapedia (Antp) Protein von Drosophila und VP22 Protein von Herpes simplex Virus (HSV) vor.^{81,82}

Die Transduktion von TAT-Fusionproteinen liefert eine neue Möglichkeit für die Modifikation der Zellfunktion und könnte deswegen einen zukünftigen Zugang zur Behandlung vieler Krankheiten darstellen.

1.7. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Effekt der TAT-p21 Proteintransduktion am *in vivo* Modell der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie der Maus zu untersuchen. Darüber hinaus war es von großem Interesse, weitere Einsichten in den Prozess der Apoptose von Kardiomyozyten zu erlangen.

2. Materialien

2.1. TAT-Fusionsproteine

In den Experimenten wurden zwei TAT-p21-Fusionsproteine verwendet: TAT-Wild-Typ-p21 (TAT-p21) und als Kontroll-Protein TAT-p21 Δ C. Dem TAT-p21 Δ C-Protein wurden 64 C-terminale Aminosäuren, darunter die Bindungsstellen für PCNA und Cykline sowie die Kernlokalisationssequenz (NLS- nuclear localization signal), entfernt.

Um die CDK-Aktivität zu inhibieren, ist die Bindung von TAT-p21 sowohl an Cyklin als auch an CDK unerlässlich. Die Mutation einzelner Aminosäuren des C-Terminus kann trotz unversehrter Bindung an den CDK/Cyklin-Komplex die Inhibierung von CDK durch p21 unmöglich machen (42,44). Die Deletion der 64 C-terminalen Aminosäuren entzieht dem Mutanten seine Eigenschaft als CDK-Inhibitor (Abb.2.1).

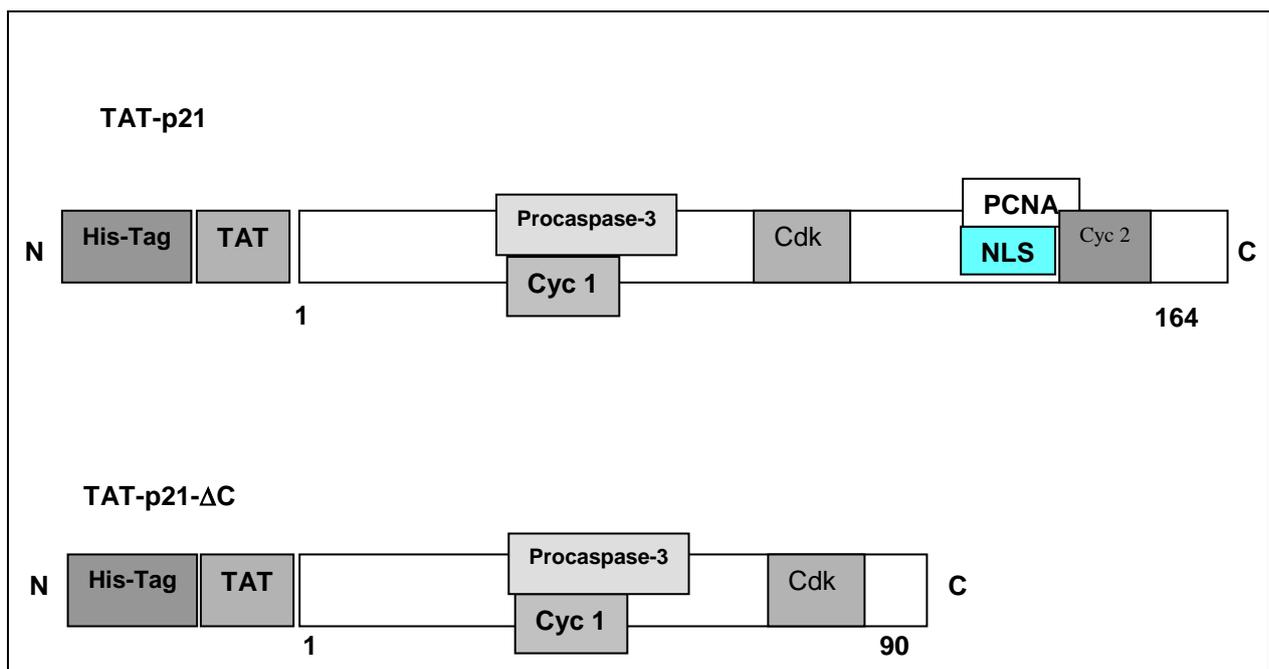


Abb. 2.1. Domänenstruktur von TAT-p21 und TAT-p21 Δ C

11 Aminosäuren der Protein-Transduktions-Domäne (PTD) sowie ein His-Tag gehen dem N-Terminus des p21 voraus. Dem Kontroll-TAT-p21 (TAT-p21 Δ C) fehlt der C-Terminus, einschließlich der Bindungsstellen für PCNA und Cyklin sowie der Kernlokalisationssequenz (NLS- nuclear localization signal).

Die TAT-p21-Fusionproteine wurden von Dr. Junfeng An und Dr. Ludger Hauck der AG von Harsdorf/Dietz (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die Klonierung der cDNA-TAT-p21 erfolgte durch Insertion von p21 open reading frame (ORF, offener Leserahmen) in das pTAT-HA-Plasmid (erhalten von S. Dowdy von Howard Hughes Medical Institute, La Jolla, California, USA). Die p21-ORF-DNA wurde in die MCS (multiple cloning site) des pTAT-HA-Vektors nach Verdau mittels *Xho*I herinkloniert. Anschließend wurden die TAT-p21 und TAT-p21 Δ C Plasmide in *E.coli* BL21(DE3) pLysS (Promega) transformiert und mittels *FPLC* Equipment (ÄKTA, Amersham) isoliert und aufgereinigt. Die erhaltenen TAT-p21-Fusionproteine wurden 1:10 mit Glycerin verdünnt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .⁸³

2.2. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid	Merck
Ammoniumpresulfat	Roth
BCA TM Protein Assay Reagent A und B	Pierce
Bromophenolblau	Sigma, Deisenhofen
<i>Caspase Glow 3/7</i> Tests	Promega
Chloroform	Merck
dNTP's	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
DNase I	Promega
DTT	GERBU
Ethanol	Merck
ETDA	Merck
Glycin	Roth
Heparin (Liquemin®)	Hoffman La Roche
HEPES	Calbiochem
Hoechst	Molecular Probes
Ketamin (10 %)	Ratiopharm
Isopropanol	Merck

Chemikalien	Hersteller
Molekulargewichtsmarker	Fermentas
N'N'-bis-methylen-acrylamid	Roth
Paraformaldehyd	Sigma
PBS (ohne Ca ⁺² und Mg ⁺²)	Dulbecco
PMSF	Sigma
Ponceau S Solution	Sigma
Proteaseinhibitoren (Complete ®)	Roche
QuantiTect SYBR Green	Qiagen
SDS	Sigma
Stripping Buffer (Restore™ Western Blot)	Pierce
Sucrose	Sigma
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen
Western-Blotting-Detektionslösung	Amersham
Tissuetek	Sakura
Triton X 100	Roth
Trizma-base	Sigma
Trizma-HCl	Sigma
TUNEL-Kit	Roche
TWEEN® 20	Roth
Urea	Calbiochem
Western-Blot-Detektionsreagenz	Cell Signaling
Xylazin (Rompun)	Bayer
Xylen	Sigma

2.3. Lösungen und Puffer

Z Puffer*	HEPES	1.428 g
	dest. Wasser	150 ml
	pH 8,0 einstellen	
	NaCl	1.755 g
	Urea	144 g
	Add. dest. Wasser bis zu 300 ml	

*Die Proteaseinhibitoren und DTT wurden kurz vor Anwendung zugegeben.

Polyacrylamidgel:		12%ig	15%ig
	dest. Wasser	33,5 ml	23,5 ml
Trenngel:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	25,0 ml	25,0 ml
	10 % SDS	1,0 ml	1,0 ml
	Acrylamid/bis-Lösung	40,0 ml	50,0 ml
	10% Ammoniumpresulfat	500 µl	500 µl
	TEMED	50 µl	50 µl
Sammelgel	dest. Wasser		12,2 ml
	0,5 M Tris-HCl, pH 8,8		5,0 ml
	10 % SDS		0,2 ml
	Acrylamid/bis-Lösung		2,6 ml
	10% Ammoniumpresulfat		100 µl
	TEMED		20 µl

Die Ammoniumpersulfat-Lösung wurde frisch angesetzt. Nach Zugabe von TEMED wurden die Gele gegossen und mit Methanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde Methanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Anschließend wurden die Kämme eingesetzt.

Hypotonischer	HEPES	24 mM
Puffer*	MgCl	5 mM
	EGTA	1 mM

* Die Proteaseinhibitoren und DTT wurden kurz vor Anwendung zugegeben.

SDS-Probenpuffer	Tris-HCl	187.5 mM
	DTT	150 mM
	SDS	6 %
	Glycerin	30 %
	Bromophenolblau	0.03 %

10 x Laufpuffer	Tris basisch	121 g
	HEPES	238 g
	SDS	10 g
Transferpuffer	Glycin	2.93 g
	TRIS-basisch	5.81 g
	SDS	0.375g
	Methanol	20 %
10 x TBS (wurde autoklaviert)	Tris basisch	24.2 g
	pH 7,6 einstellen	80 g
	NaCl	
TBS plus (100 ml)	TBS	92 ml
	10% TRITON X 100	5 ml
	Ziegenserum	3 ml
	Tween 20	0,5 ml
DABCO (10 ml)	DABCO	0,233 g
	Tris-HCl (1 M)	200 µl
	MilliQ	800 µl
	Glycerin (99 %)	9 ml

2.4. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Sarkomerische MHC (MF20)	University of Iowa, Hybridoma Bank
Aktin (sc-7210),	Santa Cruz
p21 (C-19);	Santa Cruz
Anti-His	Amersham Biosciences
sekundäre meerrettichperoxidase gekoppelte	Amersham Biosciences
Antikörper anti- Maus- IgG	

Antikörper	Hersteller
sekundäre meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper anti- Kanneinchen- IgG	Amersham Biosciences
Bcl-2 (C-2)	Santa Cruz
Bax (B-9)	Santa Cruz

2.5. Verwendete Geräte und Programme

Gerät	Hersteller
Autocade®Software	Autodesk
Autoradiographiefilm (Hyperfilm™ECL™)	Amersham Life Science,
Butterfly-Nadel	BECTON DICKINSON
Deckgläser (12mm Durchmesser)	Marienfeld GmbH & Co.KG
Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® 3 Cell)	BIO-RAD
Elektrophoresezubehör	Biometra
EndNote	Thompson Reuters
Entwicklungsgerät (CURIX 60)	AGFA
Filterpapier	Whatman
Heizblock (DRI-Block® DB2A)	Techne
Homogenisator (Ultra-Turrax® T 25 basic)	IKA® - Werke
ImageJ	Public Domain http://rsb.info.nih.gov/ij/
Inkubator	Heraeus Instruments GmbH, Wiesloch
Incubator shaker	New Brunswick scientific GmbH
Kryostat (1720)	Leica
Mikroskope	Olympus, BX 60 und IX 70
Nadeln (Sterican®)	B. Braun Meisungen AG
Objektträger (SuperFrost®Plus)	Menzel GmbH & Co KG
Operationsbesteck	NeoLab
iCycler	Biorad
PCR plates, 96-well	Abgene, Surrey, UK
Pipetten	Eppendorf AG
STATISTICA	StatSoft

Gerät	Hersteller
Sterile Filter, Cellulose Nitrat Membranen	Nalgene, Hamburg
Tischzentrifuge (0,5 bis 2 ml) (Biofuge fresco)	Heraeus Instruments GmbH
Vortex	Vortex Genie 2, Bender und Hobein AG,
Wage (Basic Typ BA 310S und BA 4100)	Sartorius
Wasserbäder	Köttermann, Germany
Zentrifugen	Super T21, RC-2B, Sorvall GmbH, Avanti J20, Beckmann Coulter GmbH, 5417C, Eppendorf AG,

3. Methoden

3.1. Übersicht der Arbeitsmethoden

Für die Beurteilung der kardiotoxischen Wirkung von Doxorubicin und Testung des Effekts der TAT-p21-Fusionsproteine TAT-p21 Wildtyp und seiner um den C-Terminus deletierten Mutante TAT-p21 Δ C wurden entsprechende Analysen durchgeführt.

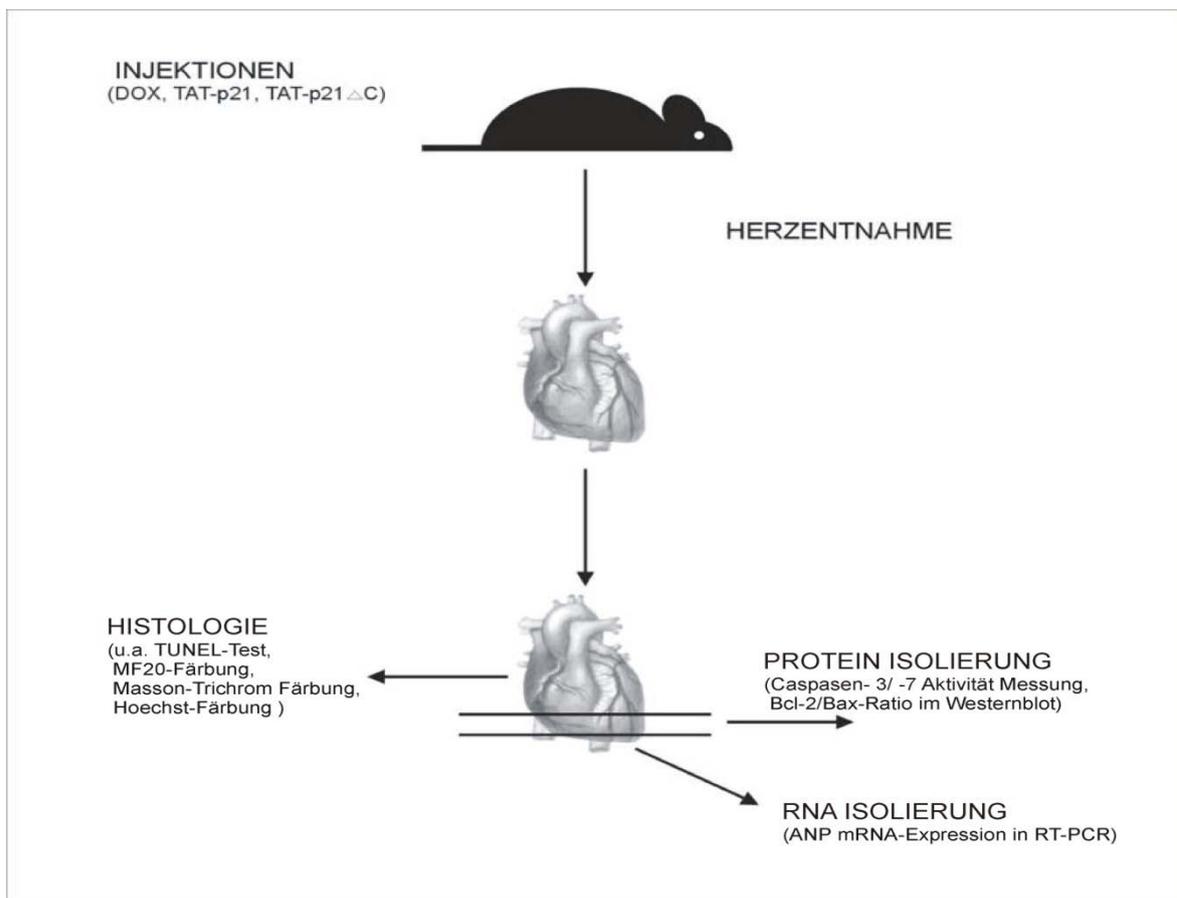


Abb. 3.1. Übersicht der Arbeitsmethoden

Die Kardiotoxische Wirkung von Doxorubicin (DOX) und die schützenden Eigenschaften der TAT-Fusionsproteine (TAT-p21, TAT-p21 Δ C) gegen den Doxorubicin-induzierten Herzschaden wurden nach einem festgelegten Schema durchgeführt. Nach dem Versuchsablauf wurden die Tiere schmerzfrei getötet und die Herzen entnommen. Die Apoptoseparameter (TUNEL-Färbung, Caspasen-3/-7 Aktivität, Bcl-2/Bax Ratio im Westernblot) und die kardiogene Genaktivierung in Form der mRNA Expression von Atriale Natriuretischen Peptid (ANP) in der Real-Time PCR wurden bestimmt.

Die Apoptose von Kardiomyozyten wurde mittels TUNEL-Assay, Bestimmung der Bcl-2/Bax Ratio im Westernblot und der Messung der Caspasen-3/-7 Aktivität beurteilt.

Das Ausmaß der induzierten Herzinsuffizienz wurde während des Experimentes durch die Echokardiographie, Bestimmung der Genaktivierung von Atriale Natriuretischen Peptid (ANP) mittels Real-Time PCR und durch die metrischen Parameter (Herzgewicht/Körpergewicht Ratio, Herzgewicht/Fibulalänge Ratio) bestimmt. Die ausführliche Darstellung der angewendeten Methoden erfolgt in den folgenden Kapiteln.

3.2. Versuchsablauf

Die Versuche wurden in 2 Phasen geteilt. Zuerst wurden die Doxorubicin-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten und die antiapoptotische Wirkung von TAT-p21-Proteinen in acht Wochen alten männlichen Mäusen (20-25g KG) untersucht. Anschließend wurde der Einfluss von TAT-Fusionprotein auf Entstehung/Verhinderung einer Herzinsuffizienz geprüft. Die Doxorubicin wurde in allen Experimenten ausschließlich einmalig intraperitoneal appliziert (20mg/kg Kg).

3.2.1. Beurteilung der Apoptose

Zuerst erfolgte die Bestimmung des zeitlichen Ablaufs der Doxorubicin induzierten Apoptose mittels TUNEL-Analyse. Doxorubicin wurde einmalig (20mg/kg KG) intraperitoneal appliziert. Zum Zeitpunkt der höchsten Apoptoserate von Herzmuskelzellen wurde im folgenden Experiment die antiapoptotische Wirksamkeit verschiedener Dosen von TAT-p21 getestet. Dieser Versuch ermöglichte die Bestimmung der Wirkungs-dosis von TAT-p21, die in den nachfolgenden Versuchen verwendet wurde. Aufbauend auf den vorgeschriebenen Experimenten wurde der Effekt von TAT-p21 hinsichtlich des Einflusses von TAT-p21 auf die durch Doxorubicin-induzierte Kardiomyozytenapoptose untersucht.

Es wurden insgesamt 5 Gruppen gebildet. Dabei wurde die Kontrollgruppe mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl/NaCl-Gruppe) behandelt, eine Gruppe mit einem gewichtsadaptierten Volumen der Kochsalzlösung und Doxorubicin (NaCl/Dox-Gruppe), eine mit Doxorubicin und TAT-p21 (TAT-p21/Dox-Gruppe) und eine weitere mit einer trunkierten, nicht-funktionellen Mutante: TAT-p21 Δ C und Doxorubicin (TAT-p21 Δ C/Dox-

Gruppe). Um den Einfluss von TAT-p21 auf die Apoptoserate bei unbehandelten Tieren zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Tieren mit TAT-p21 und mit Kochsalzlösung anstatt Doxorubicin behandelt (TAT-p21/NaCl-Gruppe).

Die erste Gabe von TAT-Fusionsproteine erfolgte in allen Experimenten ca. 15 Minuten vor der Gabe von Doxorubicin bzw. Kochsalzlösung in der Kontroll-Gruppen (NaCl/NaCl-Gruppe, TAT-p21/NaCl-Gruppe) verabreicht. Je nach Bestimmung des Zeitpunktes der höchsten Apoptoserate wurden die TAT-Fusionsproteine bzw. das gewichtsadaptierte Volumen von Kochsalzlösung in der NaCl/Dox-Gruppe und in der NaCl/NaCl-Gruppe in 24-stündigen Abständen injiziert. Die letzte Applikation erfolgt 24 Stunden vor dem geplanten Versuchsende.

Die Apoptose-Beurteilung erfolgte mittels TUNEL-Färbung, durch Bestimmung der Bcl-2/Bax Ratio im Westernblot und Aktivitätsbestimmung der Caspase-3 und -7.

3.2.2 Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie

Aufbauend auf den Vorversuchen wurde der Effekt von TAT-p21 hinsichtlich der Entstehung/Verhinderung einer Herzinsuffizienz untersucht. Die Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie ist ein gut etabliertes Tiermodell. Innerhalb der ersten 4-6 Tage kommt es bei den mit Doxorubicin (20mg/kg KG) einmalig behandelten Tieren zur Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie mit einer verminderten Pumpfunktion.^{84, 85}

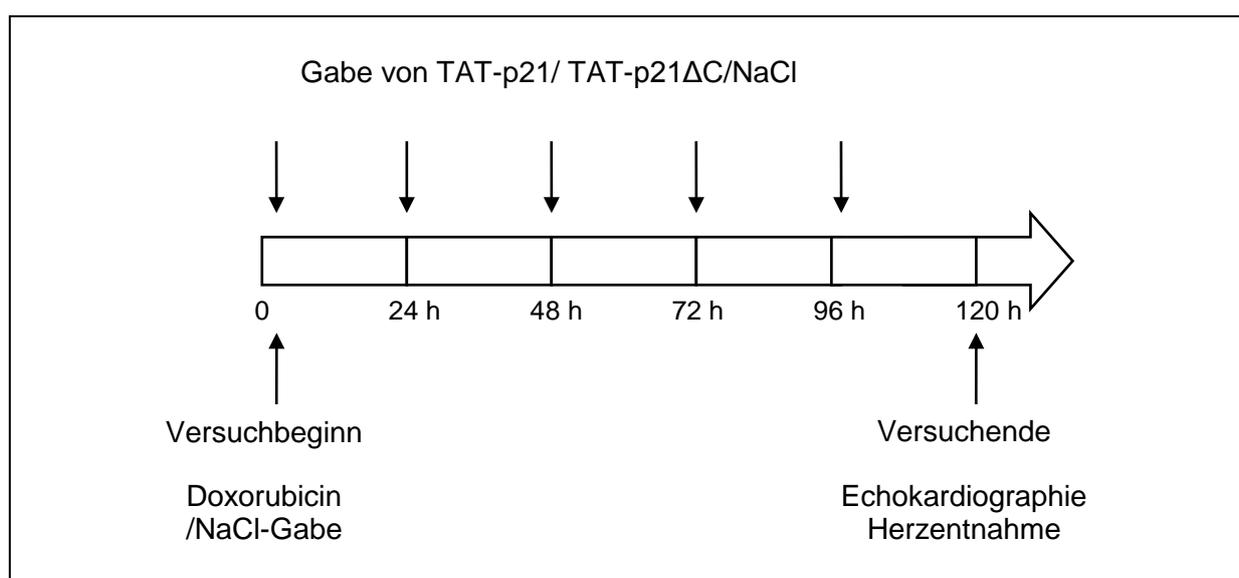


Abb. 3.2. **Versuchsprotokoll**

Die TAT-p21 Fusionsproteine bzw. Kochsalzlösung (gleiches Volumen) wurden einmal täglich intraperitoneal verabreicht. Es wurden insgesamt 5 Gruppen zusammengesetzt. Dabei wurde die Kontrollgruppe mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl/NaCl-Gruppe) behandelt, eine Gruppe mit 0,9% NaCl und Doxorubicin (NaCl/Dox-Gruppe), eine mit TAT-p21 und Doxorubicin (TAT-p21/Dox-Gruppe), sowie einer genspezifischen Kontrolle für TAT-p21 mit einer nicht-funktionellen Mutante (TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe). Um den Einfluss von TAT-p21 auf die unbehandelten Tiere zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Tieren mit TAT-p21 und mit Kochsalzlösung anstatt Doxorubicin behandelt (TAT-p21/NaCl-Gruppe). Der Grad der induzierten Herzinsuffizienz wurde während des Experimentes durch die Echokardiographie, durch die Bestimmung des Quotienten aus Herzgewicht und Gesamtkörpergewicht sowie Herzgewicht und Fibulalänge des Tieres bestimmt. Zusätzlich wurde die kardiale ANP-Genaktivierung (Real-Time PCR) bestimmt.

Die erste Gabe von TAT-Fusionsproteine erfolgte in allen Experimenten ca. 15 Minuten vor der Gabe von Doxorubicin bzw. Kochsalzlösung in der Kontroll-Gruppen (NaCl/NaCl-Gruppe, TAT-p21/NaCl-Gruppe) verabreicht. Weiter Applikationen von TAT-Fusionsproteine bzw. einem gewichtsadaptierten Volumen von Kochsalzlösung in der NaCl/Dox-Gruppe und in der NaCl/NaCl-Gruppe wurden in 24-stündigen Abständen durchgeführt. Die letzte Applikation erfolgte nach 96 Stunden des Versuches, 24 Stunden vor der Experimentende (Abb.3.2).

3.3. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten männliche Inzuchtmäuse des C57Bl/6NCrI Stammes mit einem mittleren Gewicht von 20-25 g KG, die von der Fa. Charles River Deutschland GmbH bezogen wurden (TVA: G0202/04). Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Versuchstiere in Gruppen von jeweils vier bis sechs Mäusen pro Käfig in einem normal klimatisierten Tierstall gehalten. Es herrschte ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus. Als Nahrung diente pelletierte Fertignahrung. Die Trinkwasserzufuhr erfolgte ad libidum.

3.4. Herzentnahme

Vor Entnahme der Herzen wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Applikation von Ketamin/NaCl (50mg/kg KG), Xylazin/NaCl (10mg/kg KG) analgosediert. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurden 500 IE/kg KG Heparin intraperitoneal injiziert. Die Mäuse wurden mit einem Bauchdeckenschnitt eröffnet, um dann mit einem fortlaufenden Schnitt durch das Zwerchfell über das Sternum den Brustkorb zu öffnen. Die Rippenbögen wurden mit Nadeln zur Seite gesteckt. Die Perfundierung des Herzens erfolgte mit PBS über eine Schmetterlingskanüle in den linken Herzventrikel. Das Ausfließen des venösen Blutes und der Perfusionslösung erfolgte über einen kleinen Schnitt in den rechten Herzvorhof. Im Anschluss an die Perfusion erfolgte Herzentnahme und Teilung in drei Stücke. Der für RNA-Analysen bestimmte Herzapex und der für die Protein-Isolierung bestimmte Teil wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Der für die Histologie bestimmte Rest des Herzens wurde in Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4%) überführt und für 2 Tage bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde das Gewebe zur Zytoprotektion in 30%ige Succrose-Lösung überführt.

3.5. Histologische Arbeitsmethoden

3.5.1. Herzschnittanfertigung

Die Herstellung von Kryoschnitten erfolgte am Kryostat 1720 von der Firma Leitz. Die Temperatur des Gefriertraumes, des Messers und des Gewebehalters betragen von -20°C bis -25°C. Um ein Schneiden des Herzens im Kryostat zu ermöglichen, wurde das Gewebe mit Tissue Tec® eingehüllt und im Kryostat gefroren. Das Herz wurde mit einer Schnittdicken von 3 µm für die Immunohistochemie und 7 µm für die Masson -Trichrom die Färbungen geschnitten.

3.5.2. Masson-Trichrom Färbung

Für die Darstellung des Bindegewebes führten wir eine Masson-Trichrom Färbung durch. Die Färbung erfolgte mit einem Kit (Masson Accustain®, Sigma) nach einem

modifizierten Produzentprotokoll. 7 µm dicke Gefrierschnitte wurden erst 5 Minuten an der Luft aufgetaut und in entionisiertem Wasser gespült. Danach wurden sie in der Biebrich-Scharlach-Säurefuchsin-Lösung 3 Minuten gefärbt und anschließend kurz in entionisiertem Wasser gespült. Die Objektträger wurden 5 Minuten in der Phosphowolframsäure/Phosphomolybdänsäure-Arbeitslösung und dann kurz in der Anilinblau-Lösung inkubiert. Die 2-minütige Differenzierung in der 1%igen Essigsäure ermöglichte eine deutliche und transparente Abstufung der Farben. Die Schnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe gespült und mindestens 10 Minuten in Xylol geklärt. Abschließend wurden die Schnitte in Eukitt quick fixiert und mit Glasplättchen eingedeckelt.

3.5.3. Immunohistochemie

3.5.3.1. Nachweis der Apoptose mittels TUNEL-Test

Zum Nachweis einzelner apoptotischer Zellen wurde die TUNEL-Methode (terminal desoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick end labeling) nach Herstellerangaben angewandt. Hierzu verwendeten wir das Kit *In Situ* Cell Death Detection Kit der Firma Roche. Mit Hilfe dieser Technik werden während der Apoptose entstehende DNA-Strangbrüche dargestellt. Die in großer Zahl entstehenden freien DNA-3'-OH Enden werden mit einem Fluoreszein-markierten dUTP gekennzeichnet, welches die Identifizierung apoptotischer Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht. Im Anschluss an den TUNEL-Test wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Kardiomyozyten-spezifischen primären Antikörper (gegen sarkomerische Myosin schwere-Kette, β -MHC) durchgeführt, um die apoptotischen Kardiomyozyten identifizieren zu können. Die genomische DNA wurde mit Hoechst dargestellt. Drei diagonale Herzschnitte wurden für jedes Tier unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und als digitale Bilder abgespeichert (Openlab).

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Färbeprotokolls beschrieben. Nach dem Auftauen wurden zuerst die Schnittpräparate 5 Minuten in TBS gewaschen und dann für 40 min in TBS plus blockiert. Die Arbeitslösung für den TUNEL-Test wurde entsprechend der Herstelleranweisungen vorbereitet. Nach einem kurzen Trocknen wurden die Herzen mit der Arbeitslösung versetzt. Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei

37°C in einer feuchten Kammer wurden sie 5 Minuten in TBS gewaschen und getrocknet. Danach wurden die Schnitte mit dem monoklonalen anti-β-MHC-Antikörper (MF20) in Verdünnung F200 in TBS plus über Nacht bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Dem fünfminütigen Waschen mit TBS folgte das Blocken mit TBS plus für 40 Minuten. Die Herzschnitte wurden für 4 Stunden in Dunkelheit bei der Raumtemperatur mit einem 2. TRITC-gekoppelten Antikörper in Verdünnung (F200) in TBS plus versetzt. Die Schnittpräparate wurden sechsmal 5 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 Minuten mit Hoechst (F200) inkubiert und zweimal mit Aqua dest. abgespült. Zunächst wurden die Schnitte mit DABCO anti fade Reagenz versetzt und dann mit einem Deckglas bedeckt und am Rand mit Hilfe von Nagellack abgedichtet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.5.3.1.1. Die quantitative Analyse von TUNEL-positiven Kardiomyozytenkernen

Für jeden Schnitt wurde die Anzahl von TUNEL-positiven Herzmuskelzellkernen ermittelt. Die Anzahl der TUNEL-positiven Kardiomyozytenkerne pro Schnitt wurde in Zahl pro 100 000 Kerne umgerechnet. Dafür wurde zuerst die mittlere Herzschnittfläche (n=7) mittels Autocad® ausgemessen und die Anzahl von Kernen im mm² des Schnittes mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Aus diesen Daten wurde die durchschnittliche Anzahl von Kernen pro Schnitt berechnet. Die Apoptoserate eines jeden Tieres wurde stets aus 3 Schnitten gemittelt (Abb.3.3). Um die Wirkung von TAT-p21-Proteinen auf Doxorubicin-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten zu beurteilen, wurde die Reduktion der Apoptoserate errechnet. Sie wurde nach folgender Gleichung errechnet.

$$X = \frac{(MW_{\text{PROBE}} - MW_{\text{NaCl/NaCl}}) \times 100\%}{MW_{\text{Dox/NaCl}} - MW_{\text{NaCl/NaCl}}}$$

X – Reduktion in %

MW – Mittelwert der Probe (Anzahl der apoptotischen Kardiomyozytenkerne)

MW – Mittelwert der apoptotischen Kardiomyozyten in bestimmten Gruppe

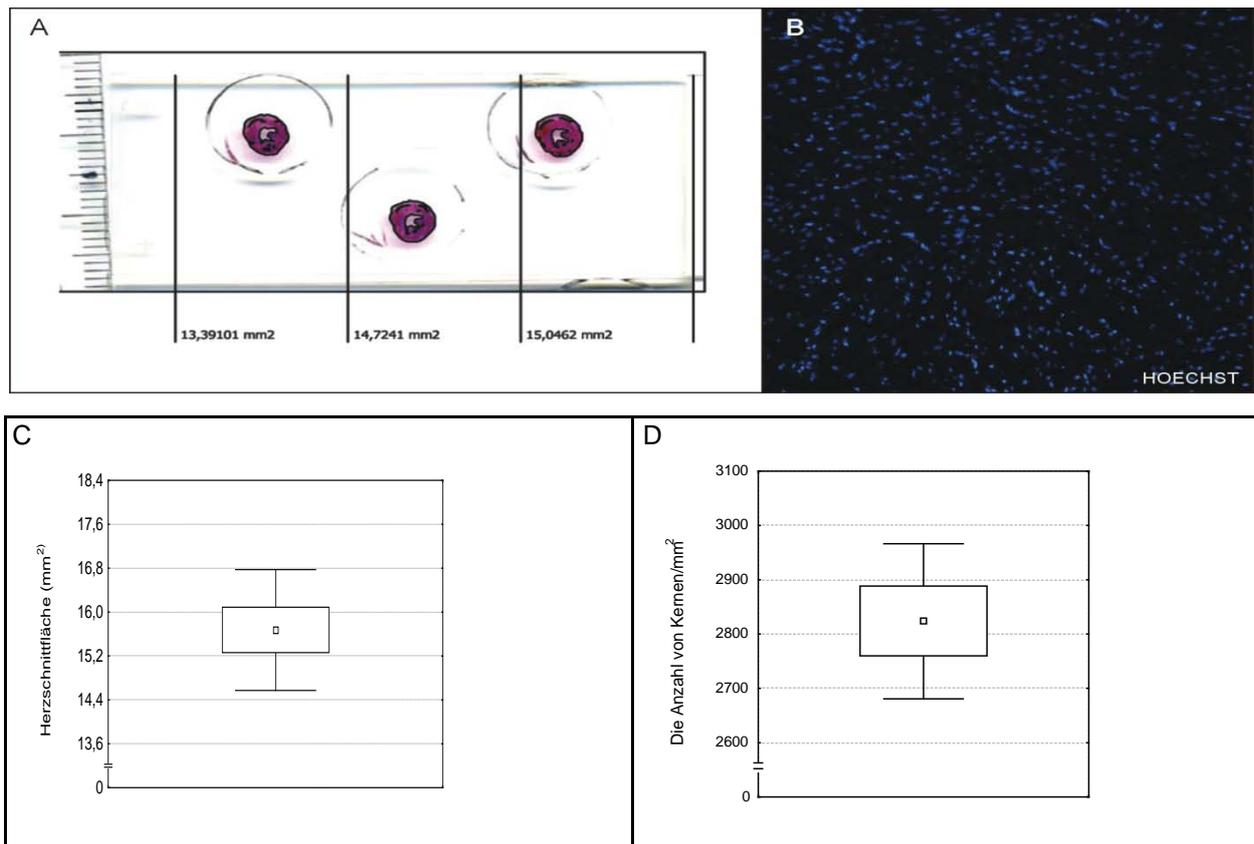


Abb. 3.3. **Die Messung der mittleren Herzschnittfläche und der Anzahl von Kernen pro mm²**

Drei Schnittflächen von einem Herz (n=7) wurden mittels Autocad ausgemessen (A) und die Durchschnitts-Schnittfläche wurde bestimmt (C). Anschließend wurde die durchschnittliche Anzahl von Kernen pro mm² mittels eines Objektivs mit Gitter errechnet (B). Fünf verschiedene Bereiche von jedem Schnitt (n=5) wurden ausgewertet (D). Auf der Basis von den erreichten Resultaten wurde die Anzahl von TUNEL-positiven Herzmuskelskernen pro Schnitt in eine Zahl pro 100 000 Kerne umgerechnet.

3.6. Proteinbiochemische Methoden

3.6.1. Protein Isolierung

Für die Protein Isolierung wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Für die Westenblot Analyse wurden die Proben mit Z-Puffer behandelt. Für die Messung der Caspasen Aktivität wurden die Proben zum Erhalt der Enzymaktivität mit mildem hypotonischen Puffer behandelt. Die verwendeten Puffer enthielten Proteaseinhibitoren

(Complete EDTA free tablets, Roche).

3.6.1.1. Proteinaufreinigung mit dem Z-Puffer

Die bei -80°C gelagerten Herzproben wurden zerhackt und zu 500-1000 μl Z-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde mit einem Teflon-Glas Homogenisator zerkleinert und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Die Homogenisate wurden alle 10 Minuten gevortext und danach sonifiziert. Nach der anschließenden Zentrifugation (15 Minuten, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und in 50 μl Volumina aliquotiert.

3.6.1.2. Proteinaufreinigung mit dem hypotonischen Puffer

Die tiefgekühlten Herzproben wurden im gefrorenen Zustand mit dem Mörser und Stößel im flüssigen Stickstoff zerrieben. Das Gewebepulver wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 800 μl eines hypotonen Puffers mit Proteaseninhibitoren wurden die Proben 5 Sekunden gevortext und anschließend mittels Dounce Homogenisator homogenisiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat 15 Minuten bei 4°C und 10000 rpm abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und für die Experimente eingesetzt.

3.6.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinextrakten wurde mittels des Bicinchonininsäure (BCA) Testverfahrens entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Proteine bilden mit Cu^{+2} Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (so genannte Biuret-Reaktion). Die Cu^{+2} Ionen des Komplexes werden zu Cu^{+} Ionen reduziert, die mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden. Die Konzentration dieses Farbkomplexes kann spektrometrisch bei 560 nm gemessen werden und verhält sich proportional zur Anzahl der Kupferionen und somit zur Proteinmenge.

Die Protein- sowie Standardbestimmung wurde jeweils dreifach durchgeführt. Zu 10 μl Probe wurden pro Reaktionsgefäß 200 μl BCA-Reagenz zugefügt. Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden sie für 20 Sekunden in einem

automatisierten Mikrotiterplatten-Lesegerät geschüttelt und die Absorption bei 560 nm gemessen.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte, die für die Beurteilung der Caspasen-Aktivität vorgesehen waren, wurde eine schnellere Methode angewandt. Mittels NanoDrop™-ND-1000-Spectrophotometer wurde die Absorptionsfähigkeit der Extrakte mit der Protein A280 Methode bei einem UV-Bereich von 280 nm nach Hersteller-Angaben bestimmt.

Die Korrelation zwischen Absorption und Konzentration wurden automatisch durch die Computersoftware unter Bezugnahme auf die Beer-Lambert Gleichung berechnet:

$$A = E * b * c$$

A- Absorptionsfähigkeit

E- Extinktionskoeffizient

b- Wellenlänge in Zentimeter

c- Konzentration

3.6.3. Westernblot-Analyse

3.6.3.1 Probenvorbereitungen

Die bei -80°C gelagerten Proben wurden auf Eis aufgetaut. 30-50 μg Protein wurden mit 3xSDS-Probenpuffer versetzt und für 6 Minuten auf 100°C erhitzt. Die denaturierten Proben wurden abgekühlt und in die Auftragstaschen der Gele pipettiert.

3.6.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Elektrophorese wurde in einem vertikalen System der Firma Pharmacia durchgeführt. Als Trennmedien wurden in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins homogene 12% bzw. 15% Polyacrylamidgele (Mini-Protean II System, Biorad) verwendet. Die Elektrophorese wurde im Laufpuffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Zuerst erfolgte

die Konzentration der Proteine im 4%igen Sammelgel für 20 Minuten bei 30 mA und danach die Separierung bei 60 mA, bis das im SDS-Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Das Molekulargewicht des Proteins wurde durch den Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker bestimmt.

3.6.3.3 Westernblot-Verfahren

Für die Westernblot-Analysen wurden die über eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurden das Gel und die Membran für 10 Minuten im Transferpuffer inkubiert und zwischen vier mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman 3MM) gelegt. Der gesamte Blot-Stapel wurde in die Blot-Kammer eingesetzt. Der Transfer dauerte 1 Stunde bei 70 mA je Membran. Die Kontrolle des gleichmäßigen Proteintransfers auf die Membran erfolgte durch Färbung mit 3%iger Ponceau S-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde danach mit TBST vollständig entfärbt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die proteinfreien Stellen der Membran zu verhindern, wurde sie mit 5% Milchpulver/TBST für 1 Stunde auf einem Rüttler bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde dann dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und im Anschluss mit einem primären Antikörper (Verdünnung nach Herstellerangaben 1:500 bis 1:2000) in 5% Milchpulver/TBST bzw. 5% BSA in TBST über Nacht bei 4°C unter langsamem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die Membran dreimal gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde auf einem Rüttler bei Raumtemperatur mit einem Sekundärantikörper (1:2000 verdünnt in Blockierungslösung) inkubiert. Ein zweiter, mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelter Antikörper erkannte spezifisch Maus- oder Ratten-IgG. Zur Detektion spezifischer Proteine auf der Nitrocellulose-Membran wurde das Chemolumineszenz-Verfahren angewandt. Nach einem erneuten Waschen (3 x TBST, 1 x TBS für 5 Minuten) wurde die Membran mit Western-Blotting-Detektionslösung für 60 Sekunden (ECL-Plus System, Amersham) inkubiert. Danach wurde die Membran in eine Klarsichtfolie eingeschlagen. Die durch enzymatische Reaktion emittierte Chemolumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm detektiert. Anschließend erfolgte die Entwicklung des Films in einem automatischen Entwicklungsgerät. Anhand eines gefärbten Molekulargewichtsmarkers konnte das Signal dem detektierten Protein

zugeordnet werden. Um eine bereits detektierte Westernblotmembran nochmals mit den gleichen oder anderen Antikörpern zu detektieren, wurden der Erst- und Zweitantikörper mit einem Strippingpuffer entfernt. Sowohl vor der fünfminütigen Inkubation in 20 ml Strippingpuffer als auch danach wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen.

3.6.4. Aktivitätsbestimmung der Caspase-3 und -7

Die Caspase-Aktivität wurde mittels des *Caspase Glow 3/7* Tests (Promega) nach der Herstelleranleitung bestimmt. Die Grundlage der Messung basiert auf der Eigenschaft von Caspasen, bestimmte Peptidsequenzen zu erkennen und dieser C-Terminal zu spalten. Durch proteolytische Spaltung der Tetrapeptidsequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) des Aminoluziferin wird dieses als Substrat für die Luciferase zugänglich. Anhand des Umsatzes dieses lumineszierenden Substrates wird die Aktivität der Caspasen-3 und -7 ermittelt. Das emittierte Lumineszenzsignal ist proportional zur Aktivität der Caspasen-3/-7. Für die Versuche wurden Zelllysate aus tiefgekühlten Herzproben verwendet. Unmittelbar nach der Proteinaufreinigung mit dem hypotonischen Puffer (Kap. 3.6.1.2.) wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die Lysate wurden anschließend auf eine Proteinkonzentration von 100 µg/ml eingestellt. Zur Bestimmung der Caspasen-Aktivität wurden die Proben (50 µl) mit 50 µl Substratlösung versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Luciferasemessung im Luminometer (Multilable Reader Victor²).

3.7. Molekularbiochemische Methoden

3.7.1. RNA-Isolation

Die tiefgefrorenen Proben wurden zu Trizol Lösung (1ml, Invitrogen) dazugegeben und 30 Sekunden lang mittels Ultraturax homogenisiert (24000/min). Nach Zugabe von Chloroform (0,2 ml), Durchmischung und anschließender Zentrifugation (30 Minuten, 10 000 U; 4°C) ergab sich eine Phasentrennung. Die farblose Oberphase enthält die RNA und wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Hinzufügen von 0.5 ml Isopropanol wurden die Proben geschüttelt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert

und dann zentrifugiert (15 Minuten; 12000 U; 4°C). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (8 Minuten, 7500 U, 4°C). Nach Entfernung des Überstands folgte eine 15-minütige Trocknung. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl DEPC (Diethylpyrokarbonat)-Wasser 10 Minuten lang bei 55°C gelöst, und die RNA-Konzentration bestimmt. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert. Die isolierte RNA diente als Matrize für cDNA, die für die quantitative Realtime-PCR (s.u.) eingesetzt wurde.

3.7.2. Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der RNA-Proben wurde spektrophotometrisch über die Absorption bei der Wellenlänge 260 nm gemessen. Der benutzte NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer wurde durch eine spezielle Software kontrolliert und die Daten wurden auf dem Rechner gespeichert. Für eine Messung genügten 2 µl einer Lösung. Als Maß für die Reinheit der Proben wurde das Verhältnis Absorption 260 nm/ Absorption 280 nm bestimmt, welches für RNA ca. bei 2 liegen sollte.

3.7.3. DNase Behandlung

Um eine Amplifikation genomischer Sequenzen zu vermeiden, wurde der DNA-Verdau durchgeführt. Die RNA-Proben wurden mit einer Lösung aus DNase I und Reaktionspuffer versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zugabe von EDTA (25 mM) folgte eine 10-minütige Inkubation bei 65°C im Thermocycler. Nach DNase Behandlung wurde die RNA-Konzentration erneut bestimmt.

3.7.4. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Mit Hilfe der "Murinen Reversen Transkriptase" wurde die mit DNase behandelte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben, die später als Template für die Amplifizierung eingesetzt wurde. Das Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll. Die RNA wurde mit einer Lösung aus den Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP) von Adenin (dATP), Guanin (dGTP), Cytosin (dCTP) und Thymin (dTTP) und oligo dT12 pr versetzt, 5 Minuten bei 65°C

inkubiert und danach für eine Minute auf Eis gestellt. Die Arbeitslösung aus PCR Puffer, DTT und DEPC-Wasser wurde hinzugefügt und 2 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von Muriner Reversen Transkriptase (SuperScript™ III Reverse Transcriptase) fand erst die 60-minütige Inkubation bei 50°C und danach eine 15-minütige Inaktivierung der Reaktion bei 70°C statt. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.7.5. Quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Bestimmung der Genexpression (ANP, Gapdh) wurde die *real-time quantitative* PCR-Methode verwendet. Eine Amplifikation und eine gleichzeitige Detektion von PCR-Produkten mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I) ermöglichen PCR-Produkte in Echtzeit zu detektieren. Das zur Einlagerung in die Doppelhelix befähigte SYBR Green I emittiert während der Bindung Fluoreszenz. Das Signal wird am Ende der Elongationsphase vermessen, wenn in jedem PCR-Zyklus die maximale amplifizierte Menge an PCR-Produkt vorliegt. Die Zunahme der Fluoreszenzdetektion ist proportional zur Menge des Amplikons. Die Denaturierung führt wieder zur Ablösung des Fluoreszenzfarbstoffs von der doppelstrangigen DNA. Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf der Kinetik der PCR-Reaktion, wobei es in der exponentiellen Phase in jedem Zyklus unter optimalen Bedingungen zu einer konstanten Verdopplung der Ausgangsmenge kommt. Für die Auswertung wird der PCR-Zyklus, bei dem die erste signifikante Fluoreszenzsignalzunahme erfolgt, der Schwellenwertzyklus, (treshold cycle, CT) verwendet. Hierzu wurde ein QuantiTect SYBR Green-System (Qiagen) und ein iCycler (Biorad) eingesetzt (Tab.3.1 und Tab.3.2).

Alle Proben wurden dreifach bestimmt und dann auf die Expression eines konstant exprimierten Gens (Gapdh) bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschieds (Ratio) erfolgte über die sogenannte $\Delta\Delta$ CT Methode.

Reagenzien		Volumen (μl)
1. Wasser, PCR-grade		8
2. Primer Mix	Vorwärts Primer	0,75
	Rückwärts Primer	0,75
3. Celldyl (250 nM)		1
4. QuantiTect™SYBR® Green I		12,5
5. Template cDNA		2
Gesamtvolumen		25

Tab. 3.1. Reagenzien für PCR

Zellzykluszahl (Schritte 2-4) 40		
1.	Heißstart	95°C, 15 min
2.	Denaturierung	95°C, 15 sec
3.	Primerbindung	60°C 30 sec
4.	DNA-Synthese	72°C, 20 sec
5.	Schmelzkurve	55°C – 95 °C, in 0,5°C-Schritten, jeweils 10 sec

Tab. 3.2. RT-PCR-Reaktionsprogramm

3.8. Echokardiographie

Die Echokardiographie ist eine nichtinvasive Untersuchung des Herzens mittels Ultraschall. Es können damit u.a. Ausmaße der Wände und der Lumina sowie Parameter der Herzfunktion bestimmt werden. Die Mäuse wurden mit einem Accuson Sequoia Echogerät und einem 13-Megahertz-Schallkopf untersucht. Für die Durchführung der Ultraschalluntersuchung wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. Danach wurden sie in Rückenlage gebracht, der ventrale Thoraxbereich rasiert und mit Ultraschallgel benetzt. Es wurden 3 Messungen pro Maus im M-Mode in der parasternalen Achse durch einen erfahrenen Untersucher durchgeführt (Abb.3.4).

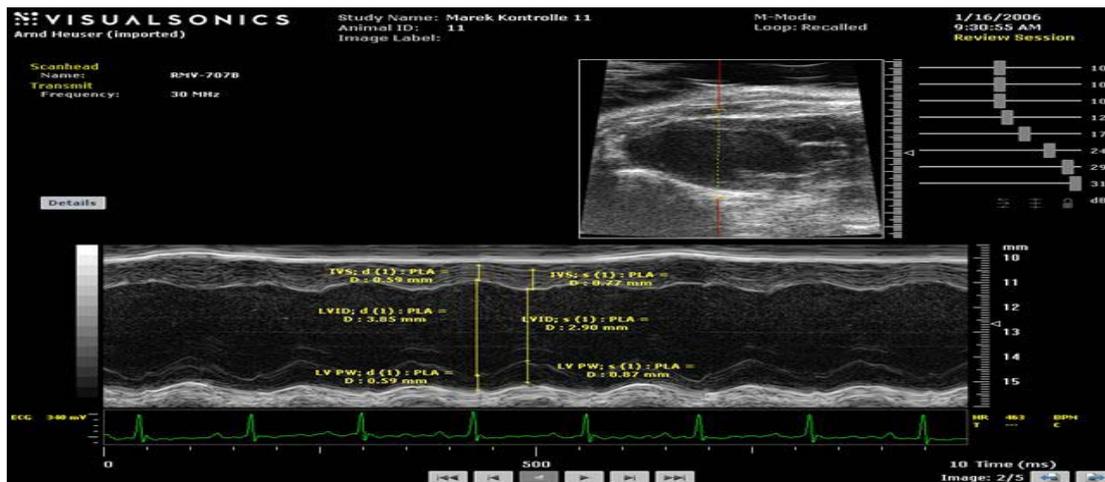


Abb. 3.4. Echokardiographische Untersuchung

M-Mode in der parasternalen langen Achse durch den linken Ventrikel.

3.9. Statistik

Zur statistischen Berechnung wurden die Werte der Einzeltiere in obig genannte Gruppen eingeteilt, die jeweiligen Mittelwerte (MW) und deren mittlere Standardfehler (SEM) berechnet. Unter Zuhilfenahme des Computerprogramms Statistika® wurden mittels Student'schem T-Test bzw. nichtparametrischem Mann-Whitney U Test Signifikanzen ermittelt. Signifikant waren Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. *In vivo* TAT-Protein Transduktion

Unsere Vorarbeiten zeigten die stärkste Protein Transduktion in das murine Herz innerhalb der ersten 2-4 Stunden nach einer intraperitonealen Gabe von TAT-Fusionsprotein. Um die Durchführbarkeit der TAT-p21 Protein Transduktion *in vivo* zu untersuchen, injizierten wir adulten Wildtyp Mäusen intraperitoneal TAT-p21, TAT-p21 Δ C (10 mg/kg KG) oder Kochsalzlösung. Drei Stunden später wurden die Tiere geopfert und die Herzen entnommen.

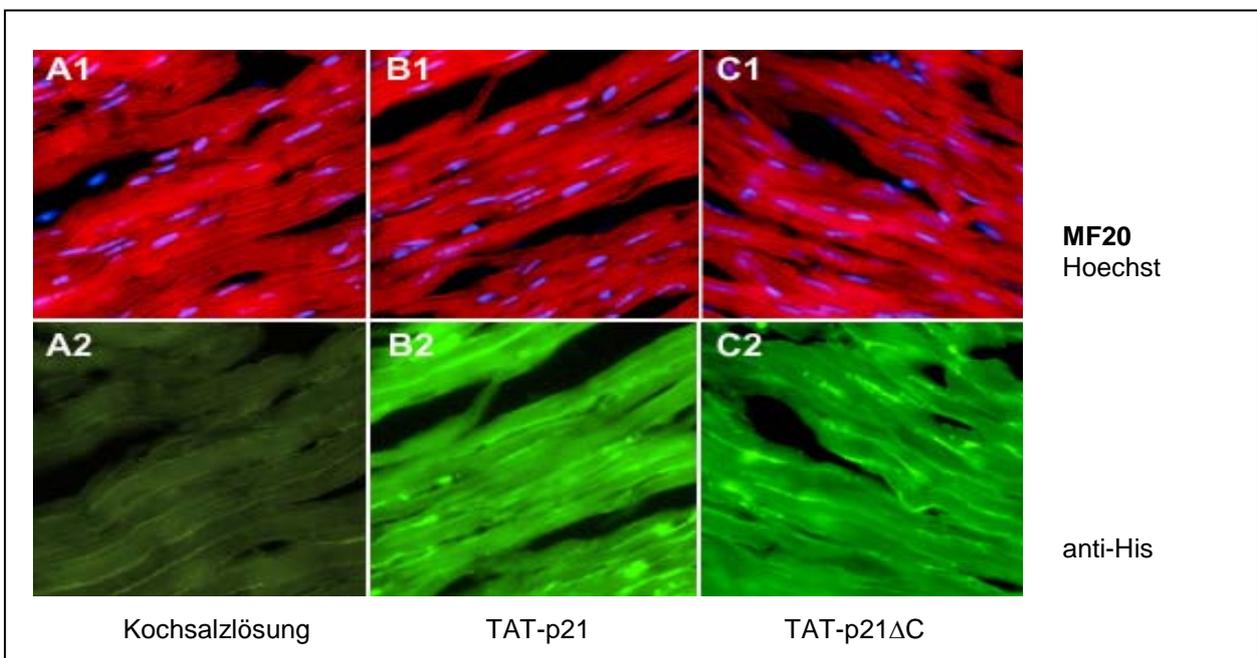


Abb. 4.1. Transduktion von TAT-p21 Fusionsproteinen

3 Stunden nach TAT-p21-Applikation wurden die Herzen entnommen und Herzschnitte angefertigt. Um Kardiomyozyten darzustellen wurde eine Färbung der schweren β -Myosin Kette (MF-20) und eine Hoechstfärbung der Kerne (A1, B1 und C1) durchgeführt. Zum Nachweis des His-Tag des TAT-Proteins wurde ein anti-His-Antikörper (FITC, grün) verwendet (A2, B2 und C2). Anschließend wurden die Schnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Der Nachweis einer intrazellulären Lokalisation der Fusionsproteine in Kardiomyozyten erfolgte mittels anti-His-Antikörper und wurde durch einen kardiomyozyten-spezifischen Antikörper (anti- β -MHC, MF20) bestätigt. Die Herzschnitte der behandelten Mäuse

zeigten eine starke Fluoreszenzintensität im gesamten Myokard (Abb. 4.1.).

4.2. Apoptosedynamik von Herzmuskelzellen nach Stimulation mit Doxorubicin

Um die zeitliche Dynamik der Kardiomyozytenapoptose nach Doxorubicinbehandlung quantitativ zu bestimmen, wurde adulten Mäusen Doxorubicin (20mg/kg KG intraperitoneal) als Einzeldosis verabreicht. Im Anschluss daran wurden die Herzen (n=4/Tag) am Tag 1-5 nach Doxorubicin Applikation mittels transkardialer Perfusion mit PBS entnommen.

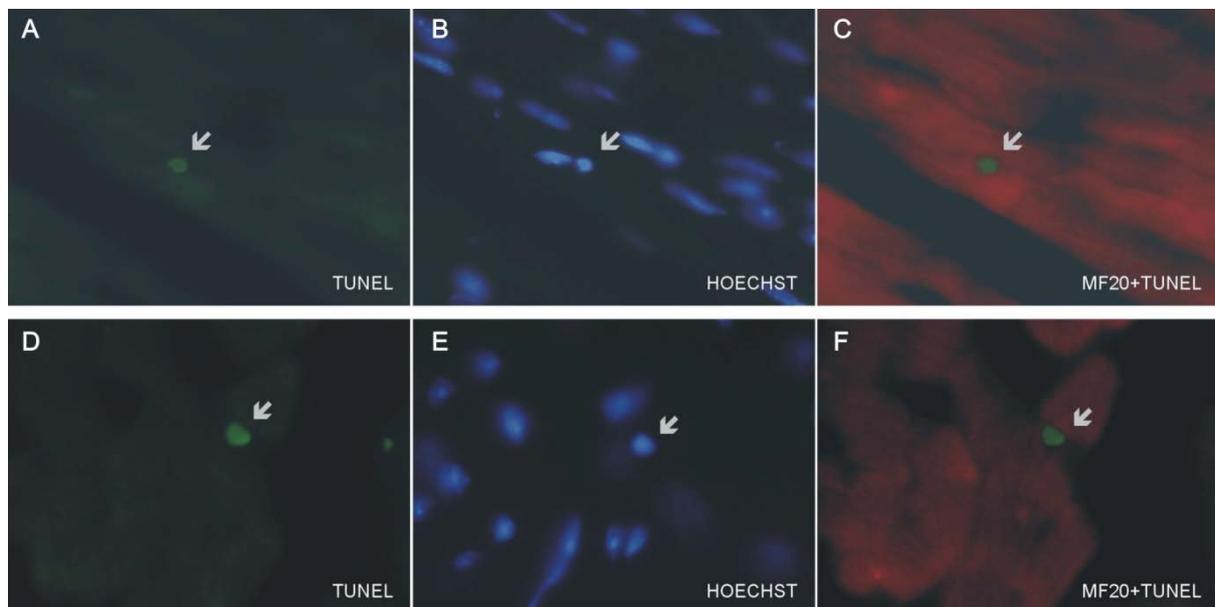


Abb. 4.2. Detektion kardiomyozytärer Apoptose nach Doxorubicin

24 Stunden nach Gabe von Doxorubicin (20mg/kg KG intraperitoneal) wurden die Herzen entnommen und Herzschnitte angefertigt. Zum Nachweis von apoptotischen DNA-Strangbrüchen wurde die TUNEL-Färbung (FITC, grün) verwendet (A,D). Anschließend wurden eine Färbung für schwere β -Myosin Kette (MF20) und eine Hoechstfärbung der Kerne (B,E) durchgeführt. Um spezifisch apoptotische Kerne von Herzmuskelzellen nachweisen zu können, wurden die korrespondierenden TUNEL und MF20 (TRITC, rot) Bilder fusioniert. Repräsentative Fotografien eines TUNEL-positiven Kardiomyozyten (A-C) und TUNEL-positiven nicht-Kardiomyozyten (D-F) .

Die Apoptose von Kardiomyozyten wurde mittels TUNEL-Färbung detektiert. Da das Herz nicht ausschließlich aus Kardiomyozyten besteht, wurden die Schnitte gegen schwere β -Myosin Kette gefärbt, um apoptotische Kerne spezifisch Herzmuskelzellen zuordnen zu können. Darauf basierend, wurden nur die eindeutig in Kardiomyozyten lokalisierten apoptotischen Kerne quantifiziert. Die Kontrollgruppe bestand aus nicht mit Doxorubicin behandelten Mäusen (Abb. 4.2.).

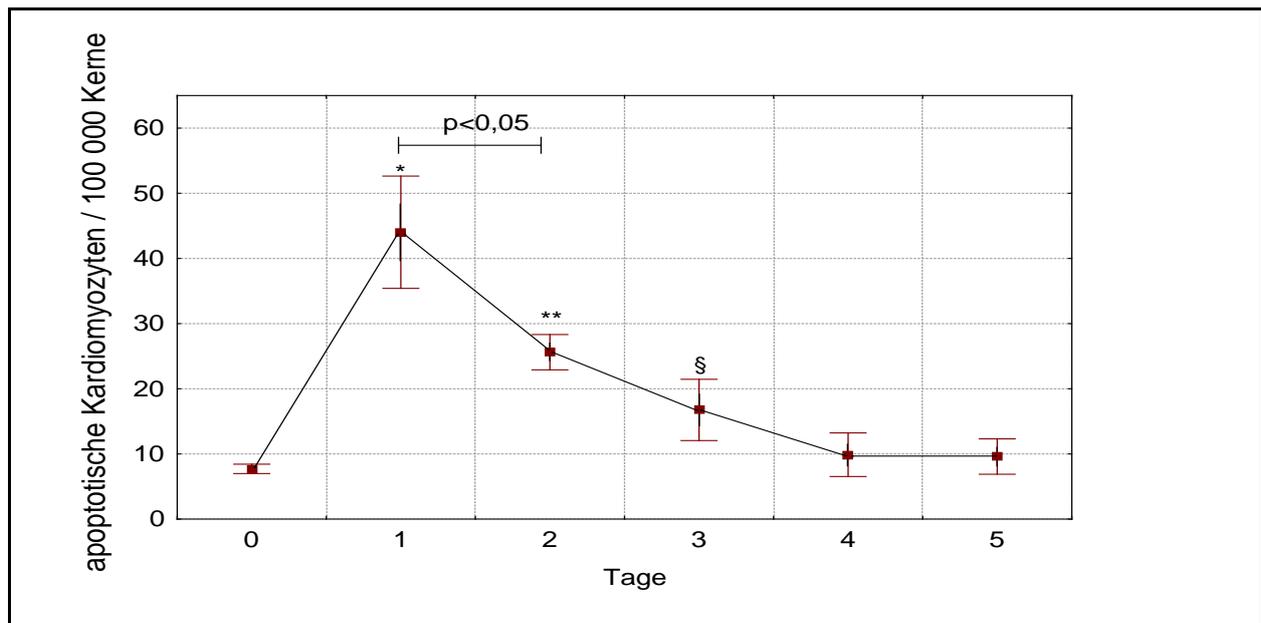


Abb. 4.3. Zeitlicher Verlauf kardiomyozytärer Apoptose nach Doxorubicin

Quantifizierung TUNEL-positiver Kardiomyozyten in Herzkryoschnitten nach Behandlung mit einer Einzeldosis von Doxorubicin (20mg/kg KG). Alle Werte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Tieren (n=4) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

* $p < 0,0005$ vs. Zeitpunkt 0, ** $p < 0,0001$ vs. Zeitpunkt 0, § $p < 0,01$ vs. Zeitpunkt 0.

Die mikroskopische Untersuchung von TUNEL-gefärbten Herzschnitten zeigte einzelne zerstreute TUNEL-positive Kardiomyozytenkerne in der Kontrollgruppe ($7,72 \pm 0,72$). Die Behandlung mit Doxorubicin induzierte die Apoptose von Herzmuskelzellen. Die Rate der TUNEL-positiven Kardiomyozytenkerne erreichte die höchsten Werte ($44,03 \pm 8,62$) 24 Stunden nach einmaliger Applikation von Doxorubicin und war statistisch relevant ($p < 0,0005$). Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm die Apoptoserate wieder ab. Der Apoptose-Index am 2. Tag ($26,62 \pm 2,71$) war weiter signifikant erhöht ($p < 0,0001$), aber merklich reduziert im Vergleich zum 1. Tag ($p < 0,05$). Am 3. Tag nach Behandlung

nahm die Apoptoserate weiter ab, blieb jedoch signifikant erhöht ($16,76 \pm 4,70$; $p < 0,01$). An den nachfolgenden Tagen fiel die Anzahl der apoptotischen Kardiomyozytenkerne bis annähernd auf Ausgangswerte ab (Abb. 4.3.).

4.3. Wirkung verschiedener Dosen TAT-p21 auf die Doxorubicin-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten

Da eine inadäquate Medikamentendosis sowohl die Wirksamkeit einer Behandlung erheblich limitieren als auch eventuelle Nebenwirkungen potenzieren kann, führten wir eine Untersuchung zur kleinst möglichen therapeutischen Wirkungs-dosis von TAT-p21 Fusionsprotein durch. Im Vorversuch wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Apoptoserate von Kardiomyozyten nach Behandlung mit Doxorubicin (20mg/kg KG) die höchsten Werte erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde die antiapoptotische Wirksamkeit verschiedener Dosen von TAT-p21 getestet.

Neben den Vehikel-behandelten Kontrollgruppen, die physiologische Kochsalzlösung ($0,9\% \text{ NaCl}$) intraperitoneal erhielten, wurde jede TAT-p21 behandelte Gruppe mit verschiedenen Dosen ($5, 10, 20, 30 \text{ mg/kg KG}$) Fusionsprotein behandelt. Die Gabe von TAT-Protein bzw. Kochsalzlösung in der Kontroll-Gruppe (NaCl/NaCl-Gruppe) erfolgte 15 Minuten vor der intraperitonealen Doxorubicin Injektion. Die Wahl der Dosierungen orientierte sich dabei sowohl an Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten als auch vorausgegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe.^{78,79}

Das Injektionsvolumen wurde gewichtsadaptiert festgelegt und durch isotone Kochsalzlösung aufgefüllt. Die Beurteilung der antiapoptotischen Wirksamkeit der TAT-Fusionsproteine wurde anhand einer TUNEL-Analyse durchgeführt.

In Übereinstimmung zu den Ergebnissen des Vorversuchs (Abb. 4.3.) führte die Doxorubicinbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem 5-fachen Anstieg von TUNEL-positiven Kardiomyozytenkernen ($8,66 \pm 1,30$ vs. $42,50 \pm 7,99$; $p < 0,0001$; Abb. 4.4.). In allen mit TAT-p21 Fusionsprotein behandelten Gruppen fand sich eine statistisch relevante Reduktion der Apoptoserate. Die niedrigste TAT-p21 Dosis (5mg/kg KG) reduzierte die Anzahl der apoptotischen Kardiomyozytenkerne um 54% ($24,09 \pm 2,57$; $p < 0,005$). Die größte Wirksamkeit zeigten die Dosen 10 und 20mg/kg KG . Hier betrug die Reduktion der Apoptoserate 82% ($14,5 \pm 2,91$ $p < 0,001$) bei 10mg/kg KG und 87% ($13,05 \pm 1,51$; $p < 0,001$) bei 20mg/kg KG TAT-p21 Fusionsprotein. Die

kardiomyozytäre Apoptoserate unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen ($p > 0,05$) war jedoch gegenüber der nicht stimulierten Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe) signifikant erhöht (jeweils $p < 0,01$). Die höchste Dosis von TAT-p21 Fusionsprotein (30mg/kg KG) zeigte eine geringer ausgeprägt antiapoptotische Wirkung. Diese unterschied sich jedoch nicht signifikant vom antiapoptotischen Effekt mittlerer Dosen TAT-p21 Fusionsproteins (10 und 20mg/kg KG). Die Reduktion der Apoptoserate nach Applikation von 30mg/kg KG TAT-p21 Fusionsprotein betrug 73% ($17,70 \pm 3,35$). In Analogie zu den Vorgruppen war auch in dieser Gruppe der Apoptoseindex gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,005$).

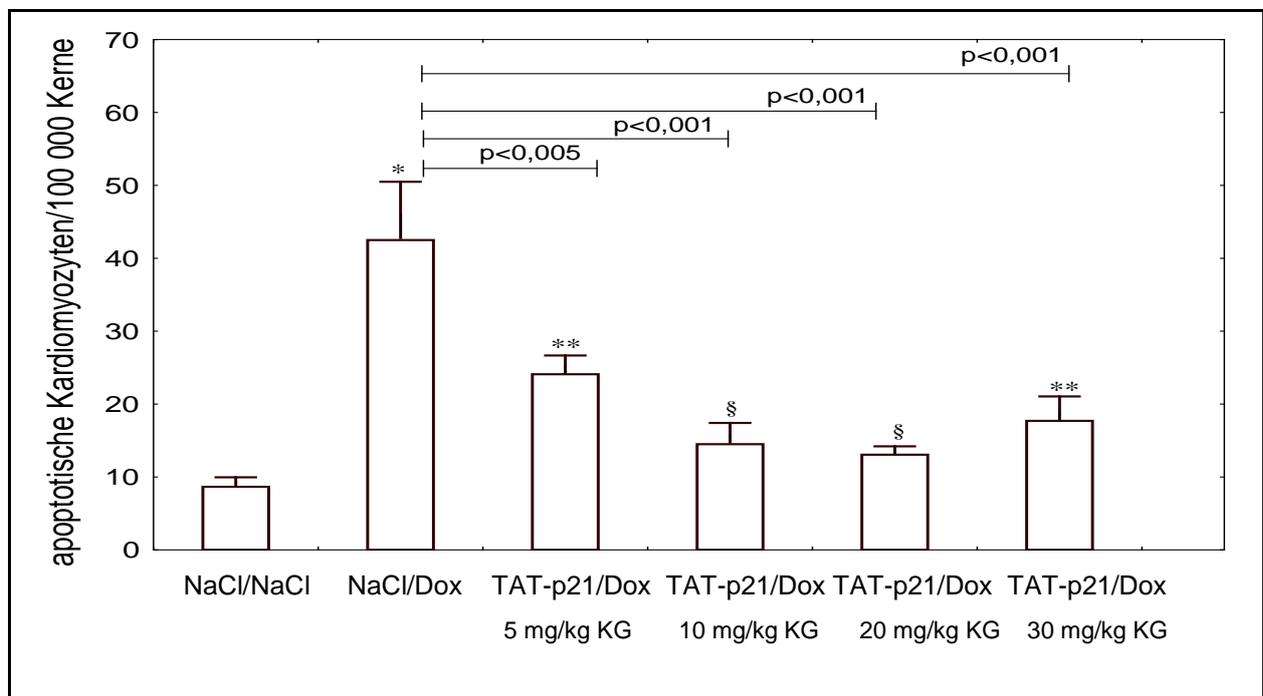


Abb. 4.4. Einfluss verschiedener Dosen TAT-p21 auf die Doxorubicin-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten

Die Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten wurde mittels TUNEL-Analyse 24 Stunden nach Doxorubicin Stimulation bestimmt. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Tieren ($n=5$) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

* $p < 0,0001$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), ** $p < 0,001$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), § $p < 0,01$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe).

Als Hinweis auf einen toxischen Effekt wurde bei 2 Mäusen dieser Gruppe bei der Herzentnahme Aszites beobachtet.

4.4. Beurteilung der Wirkung von TAT-p21 und TAT-p21ΔC Fusionsproteinen auf Doxorubicin-induzierte Kardiomyozytenapoptose *in vivo*

Aufbauend auf den Vorversuchen wurde der Effekt von TAT-p21 hinsichtlich des Einflusses von p21 auf die Kardiomyozytenapoptose untersucht. Als genspezifische Kontrolle für TAT-p21 setzten wir dabei eine trunkierte Mutante ein, bei der der C-Terminus von p21 deletiert wurde (TAT-p21ΔC). Auf dieser Weise wurde dem Mutanten seine Eigenschaft der CDK-Inhibition entzogen (siehe Kapitel 2.1.).

Aufgrund der nur unwesentlich verbesserten Überlebensrate von Herzmuskellzellen nach Applikation von 20 gegenüber 10mg/kg KG TAT-p21 Fusionsprotein im Vorversuch entschlossen wir uns zur Applikation von 10mg/kg KG TAT-p21 Fusionsprotein in dieser Versuchsreihe.

Entsprechend der Vorversuche erfolgte die Organentnahme 24 Stunden nach intraperitonealer Doxorubicin-Injektion (20mg/kg KG). Der Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe) wurde das entsprechende Volumen von Kochsalzlösung injiziert. Um den Einfluss von TAT-p21 auf unbehandelte Tiere zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Tieren mit TAT-p21 und mit Kochsalzlösung statt Doxorubicin behandelt (TAT-p21/NaCl-Gruppe). Die intraperitoneale Injektion von TAT-p21-Protein (TAT-p21/Dox-Gruppe, TAT-p21ΔC/Dox-Gruppe, TAT-p21/NaCl-Gruppe) und dem entsprechendem Volumen von Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe) und Doxorubicin-Gruppe (NaCl/Dox-Gruppe) erfolgte ca. 15 Minuten vor Doxorubicin Stimulation (NaCl/Dox-Gruppe) bzw. der gewichtsadaptierten Kochsalzgabe bei den Kontrollgruppen (NaCl/NaCl-Gruppe und TAT-p21/NaCl-Gruppe). Die Behandlung mit Doxorubicin induzierte, ähnlich zu den vorausgegangenen Versuchen, einen über 5-fachen Anstieg apoptotischer Kardiomyozytenkerne (NaCl/Dox-Gruppe: $41,75 \pm 4,75$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe: $8,33 \pm 0,88$; $p < 0,00001$). Die Behandlung mit TAT-Fusionsproteinen reduzierte signifikant die Apoptoserate. Die Wirkung von beiden Fusionsproteinen unterschied sich erheblich. TAT-p21 reduzierte den Apoptose-Index gegenüber der mit Doxorubicin-stimulierten Kontrollgruppe um 82% (TAT-p21/Dox-Gruppe: $14,46 \pm 2,90$; $p < 0,00001$ vs. NaCl/Dox-Gruppe). Das TAT-p21ΔC Protein reduzierte die Zunahme der kardiomyozytären Apoptose um 32% (TAT-p21ΔC/Dox-Gruppe: $31,03 \pm 3,0$; $p < 0,005$ vs. NaCl/Dox-Gruppe). Der Unterschied

zwischen beiden TAT-Proteinen zeigte sich statistisch signifikant (TAT-p21/Dox-Gruppe vs. TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe, $p < 0,0001$). Interessanterweise führte eine Applikation von TAT-p21 ohne Doxorubicin Stimulierung zu einer minimalen aber statistisch relevanten Reduktion der basalen Apoptoserate (NaCl/TAT-p21-Gruppe: $6,47 \pm 0,86$; $p < 0,01$) (Abb. 4.5.).

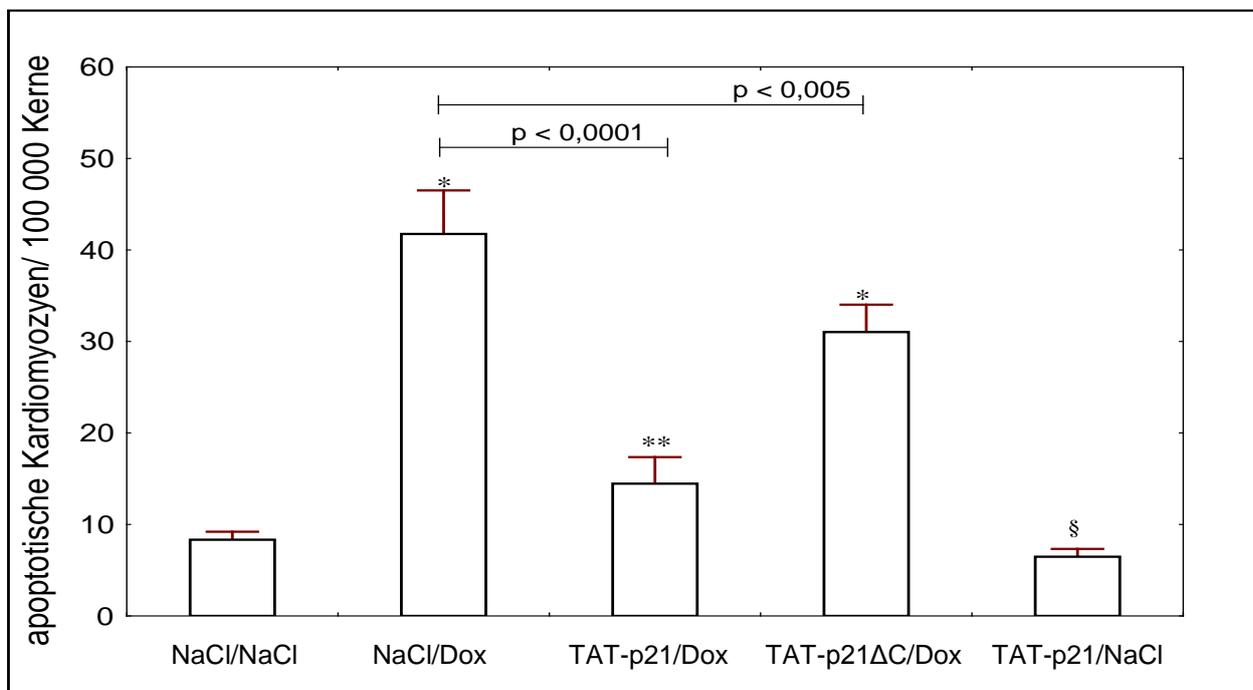


Abb. 4.5. Wirkung von TAT-p21 und TAT-p21 Δ C Fusionsproteinen auf Doxorubicin-induzierte Kardiomyozytenapoptose *in vivo*

Die Anzahl von apoptotischen Kardiomyozyten wurde mittels TUNEL-Analyse bestimmt. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Tieren ($n=5$) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

* $p < 0,00001$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), ** $p < 0,005$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), § $p < 0,01$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe).

4.5. Effekt der TAT-p21 Protein Transduktion auf Doxorubicin-induzierte Aktivierung der Caspasen-3 /-7

Als weiteres Meßsystem für die Beurteilung der Apoptose von Herzmuskelzellen wurde die Caspase-Aktivität der Caspasen-3 und -7 untersucht. Entsprechend der Vorversuche wurde die Messung 24-Stunden nach Doxorubicin Gabe, zum Zeitpunkt

der größten TUNEL-Positivität von Kardiomyozyten, durchgeführt. Die Induktion der Herzmuskelzell-Apoptose mittels Doxorubicin ging mit einem signifikanten Anstieg der Caspase-3/-7-Aktivität einher.

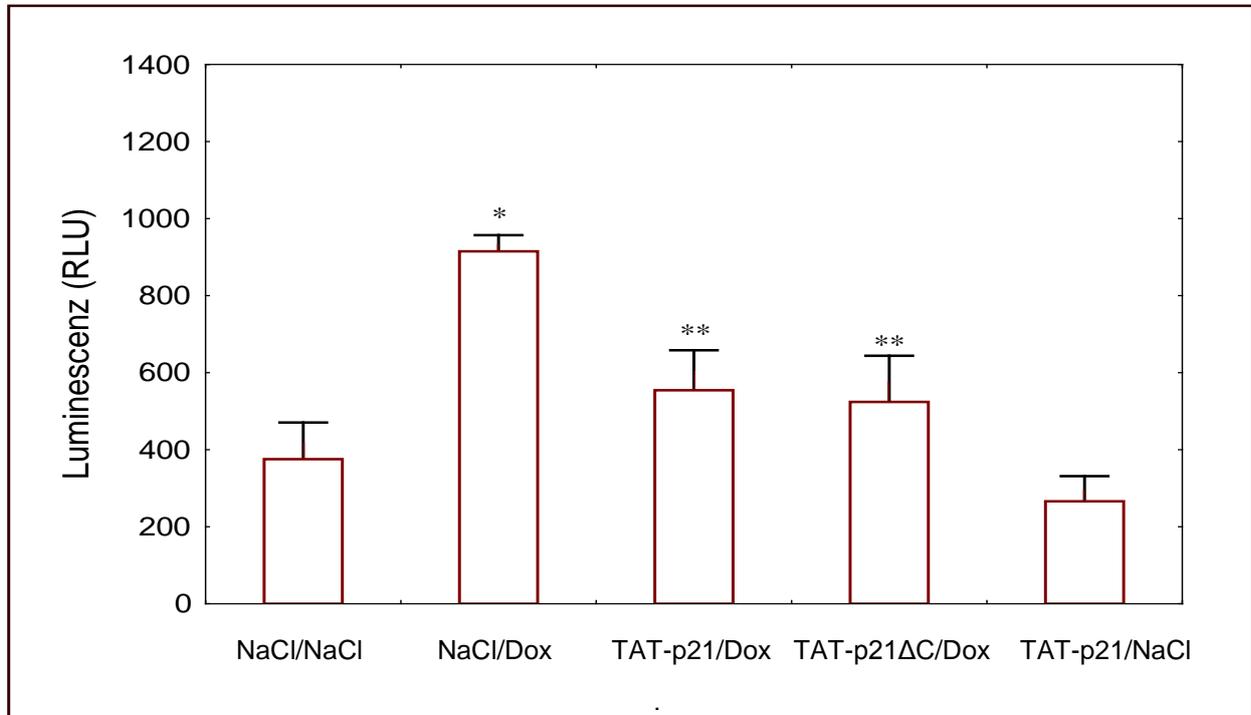


Abb. 4.6. Caspase-3 /-7-Aktivitäten 24 Stunden nach Stimulation mit Doxorubicin und TAT-p21 Protein Transduktion

Die Caspase-Aktivitäten wurden 24 Stunden nach Stimulation mit Doxorubicin und vorausgegangener Behandlung mit Kochsalz oder TAT-Fusionsprotein bestimmt. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Tieren (n=4) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

* $p < 0,0001$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), ** $p < 0,001$ vs. Doxorubicin-Gruppe (NaCl/Dox-Gruppe).

Die Caspase-Aktivität stieg nach Doxorubicin Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr als zweifach an (Dox/NaCl-Gruppe: $914,95 \pm 42,02$ RLU; NaCl/NaCl-Gruppe: $375,50 \pm 95,07$ RLU, $p < 0,0001$). Die Applikation sowohl von TAT-p21 als auch TAT-p21ΔC reduzierte signifikant die Zunahme der Aktivität beider Caspasen nach Doxorubicin-Gabe (TAT-p21/Dox-Gruppe: $554,43 \pm 103,84$ RLU, TAT-p21ΔC/Dox-Gruppe: $524,02 \pm 119,87$ RLU; jeweils $p < 0,001$). Es zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den beiden TAT-Gruppen ($p > 0,05$). In

beiden Fällen wurde die Steigerung der Caspase-Aktivität nicht völlig aufgehoben. Der Unterschied zur Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe) zeigte sich nicht signifikant (jeweils $p > 0,05$). Die alleinige Gabe von TAT-p21 ohne nachfolgende Apoptose-Induktion mit Doxorubicin verursachte keine signifikante Veränderung der Caspase-3 /-7-Aktivitäten (TAT-p21/NaCl-Gruppe: $266,07 \pm 65,39$ RLU; NaCl/NaCl-Gruppe: $375,50 \pm 95,07$ RLU; $p > 0,05$) (Abb. 4.6.).

4.6. Relative Bcl-2/Bax Ratio

Die Bcl-2-Familie besteht aus anti- und proapoptotischen Mitgliedern. Das Verhältnis der antiapoptotischen Familienmitglieder, wie z.B. Bcl-2, zu den pro-apoptotischen, wie z.B. Bax, determiniert das Überleben der Zelle. Um die Regulation der Bcl-2 Familienmitglieder Bcl-2 und Bax im Rahmen TAT-p21-vermittelter Apoptoseinhibition nach Doxorubicin Stimulation genauer zu analysieren, wurden diese mittels Westernblot detektiert.

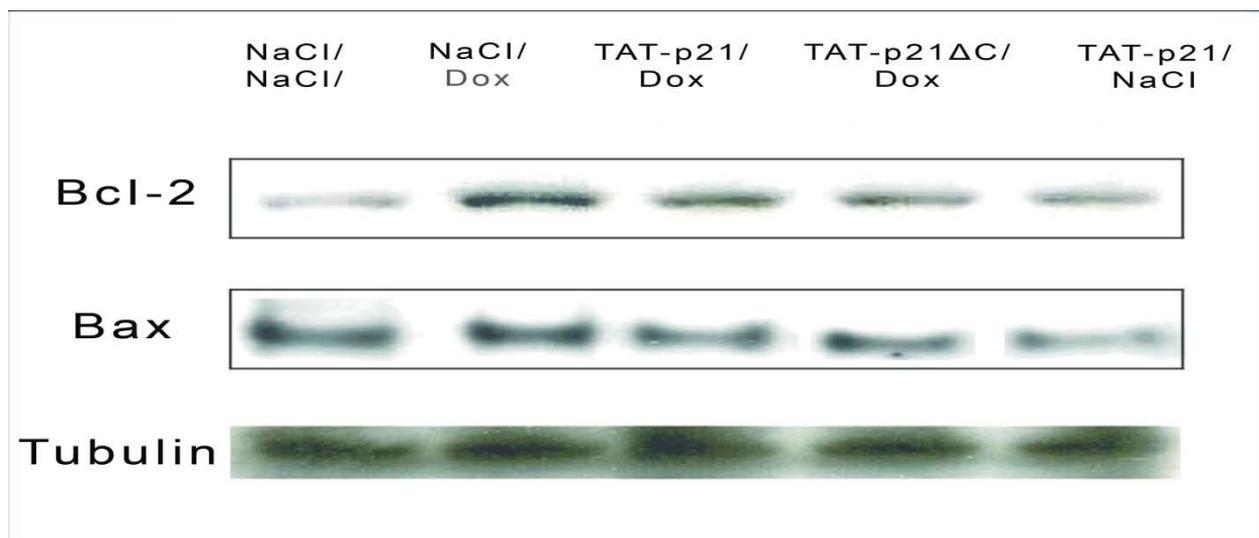


Abb. 4.7. Western Blot der Bcl-2 und Bax Regulation nach Doxorubicin Stimulation.

Die Herzen wurden lysiert und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Zellulosemembran transferiert. Als 1. Antikörper wurden anti-Bcl-2, anti-Bax und als Ladungskontrolle ein anti-Tubulin Antikörper verwendet. Repräsentativer Westernblot von insgesamt 4 Blots.

Für die Detektion beider Proteine wurde die gleiche Westernblot-Membran verwendet. Nach der Bcl-2 Detektion erfolgte das Stripping der Membran und der Nachweis von Bax (Abb. 4.7.). Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurden die Banden densitometrisch mittels ImageJ-Programm ausgewertet und aus den Ergebnissen die Bcl-2/Bax Ratio errechnet.

Die Doxorubicin Behandlung führte bei allen Gruppen zu einer statistisch signifikanten Veränderung der relativen Bcl-2/Bax Ratio. Das Verhältnis stieg nach Doxorubicin Stimulation beinahe zweifach an [$0,323 \pm 0,051$ in der Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe); $0,602 \pm 0,215$ in der Doxorubicin-Gruppe (Dox/NaCl-Gruppe); $p < 0,05$].

Das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax stieg gleichermaßen in den Gruppen an, die sowohl mit TAT-Fusionproteinen als auch mit Doxorubicin behandelt wurden. Die Bcl-2/Bax Ratio betrug $0,611 \pm 0,223$ in der TAT-p21-Gruppe (TAT/Dox-p21-Gruppe) und $0,661 \pm 0,170$ in der TAT-p21 Δ C-Gruppe (TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe). Die alleinige Applikation von TAT-p21 (TAT-p21/NaCl-Gruppe) führte ebenfalls zu einem relevanten Anstieg des Bcl-2/Bax Verhältnisses ($0,536 \pm 0,129$; $p < 0,05$ vs. NaCl/NaCl-Gruppe) (Abb. 4.8.).

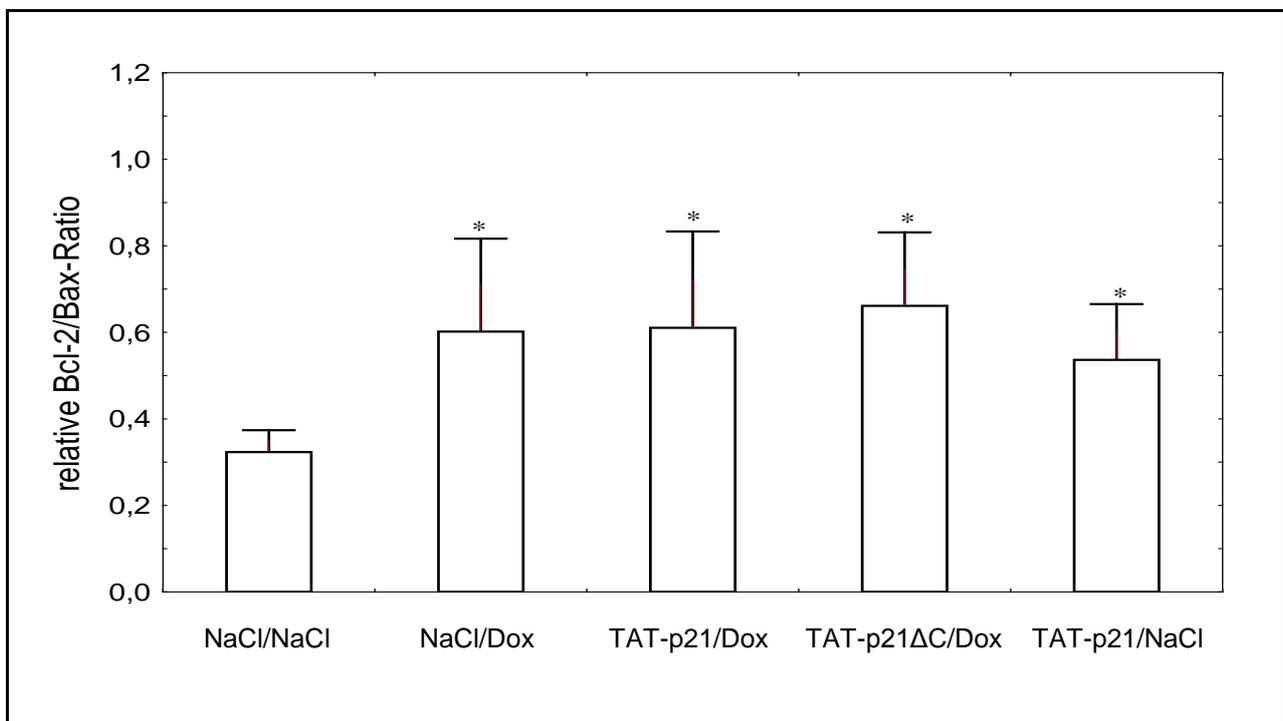


Abb. 4.8. Densitometrische Auswertung der Bcl-2/Bax Ratio

Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von $n=4$ verschiedenen Blots dargestellt.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe).

4.7. Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie

Bei der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie handelt es sich um ein gut etabliertes Tiermodell. Nach einmaliger intraperitonealer Gabe von Doxorubicin (20 mg/kg KG) ist in der Literatur die Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie mit eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion innerhalb von 4-6 Tagen beschrieben.

Um den Doxorubicin-induzierten Herzschäden und eine eventuell protektive Wirkung von TAT-p21 genauer zu analysieren, wurden 5 Versuchsgruppen gebildet. Dabei wurde die Kontrollgruppe mit Kochsalzlösung (NaCl/NaCl-Gruppe) behandelt, eine Gruppe mit Kochsalzlösung und Doxorubicin (NaCl/Dox-Gruppe), eine mit TAT-p21 und Doxorubicin (TAT-p21/Dox-Gruppe) und eine weitere mit TAT-p21 Δ C und Doxorubicin und (TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe). Um den Einfluss von TAT-p21 auf die unbehandelten Tiere zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Tieren mit TAT-p21 und mit Kochsalzlösung statt Doxorubicin behandelt (TAT-p21/NaCl-Gruppe).

Zu Anfang des Experimentes (Zeitpunkt: 0 h) wurden die TAT-Fusionproteine oder Kochsalzlösung in der NaCl/NaCl-Gruppe und NaCl/Dox-Gruppe intraperitoneal appliziert. Nach 15 Minuten erfolgte einmalig die Doxorubicin- oder Kochsalzgabe in den Kontrollgruppen (NaCl/NaCl-Gruppe; TAT-p21/NaCl-Gruppe). In 24-Stunden Abständen wurden TAT-Fusionproteine oder Kochsalzlösung in der Doxorubicin-Gruppe (NaCl/Dox-Gruppe) verabreicht. 24 Stunden nach der letzten Gabe von TAT-p21-Fusionprotein (Zeitpunkt: 96 h) oder Kochsalzlösung in der NaCl/NaCl-Gruppe und NaCl/Dox-Gruppe wurden die echokardiographische Analyse, Gewichtskontrollen, Herzentnahme mit Gewichtsbestimmung sowie die Messung der Fibulalänge durchgeführt. Des Weiteren wurde der Apex des Herzens für die Bestimmung der linksventrikulären ANP mRNA-Expression abgenommen.

4.7.1. Gewichtsdynamik

In allen 5 Versuchsgruppen wurden die Tiere täglich gewogen. Zu Beginn des Versuchs war das Körpergewicht in allen 5 Gruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich (jeweils $p > 0,05$) und betrug von $21,84 \pm 1,83$ g in der TAT-p21/NaCl-Gruppe bis $22,90 \pm 1,83$ g in der NaCl/NaCl-Gruppe. In der Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe) zeigte sich am 5. Tag eine nicht signifikante Gewichtszunahme (NaCl/NaCl-Gruppe: $23,18 \pm 1,76$ g

am 5. Tag; $p > 0,05$) (Abb. 4.9; Tab. 4.1.).

In allen mit Doxorubicin (20mg/kg KG) behandelten Gruppen kam es zu einem deutlich signifikanten Gewichtsverlust, der durchschnittlich ca. 15% des Ausgangsgewichtes betrug. Unter den Gruppen, die mit Doxorubicin behandelt wurden, zeigten sich keine signifikanten Körpergewichtsunterschiede am letzten Tag des Experiments (NaCl/Dox-Gruppe: $18,82 \pm 0,84$ g; TAT-p21/Dox-Gruppe: $19,46 \pm 1,05$ g; TAT-p21 Δ C/Dox: $19,20 \pm 0,51$ g; p jeweils $> 0,05$) (Abb. 4.9.; Tab. 4.1.).

Die ausschließlich mit TAT-p21 behandelte Mäuse (TAT-p21/NaCl-Gruppe) zeigten ebenfalls eine signifikante Gewichtsreduktion am letzten Versuchstag ($21,84 \pm 1,83$ g am 0.Tag vs. $21,04 \pm 1,49$ g am 5.Tag; $p < 0,05$). Das Gewicht in dieser Gruppe war am Ende des Versuches signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$) (Abb. 4.9.; Tab. 4.1.).

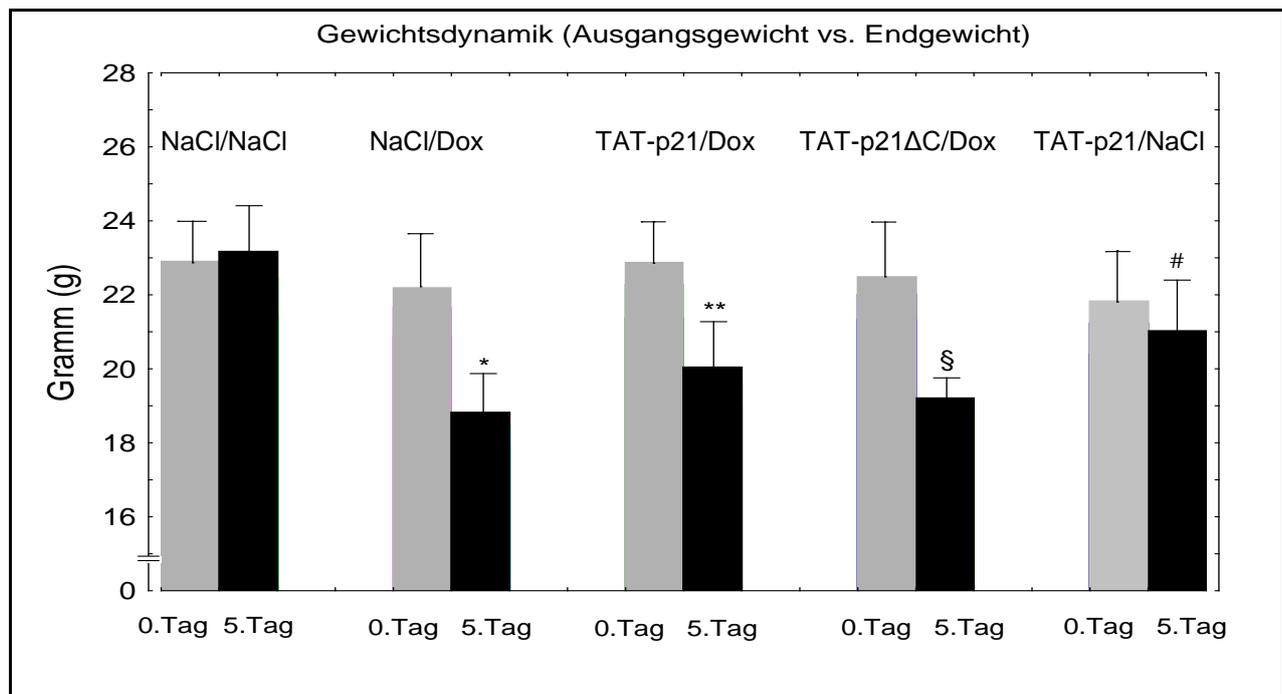


Abb. 4.9. Gewichtsdynamik

Ausgangskörpergewicht und Gewicht am Ende des Versuches wurden für die einzelnen Gruppen in Paaren dargestellt. Die statistische Relevanz der Gewichtsdynamik wurde in jeder Gruppe bestimmt (Anfangsgewicht vs. Endgewicht). Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5-7 Tieren ($n=5-7$) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

* $p < 0,005$, ** $p < 0,05$, § $p < 0,001$, # $p < 0,05$.

4.7.2. Herzgewicht

Am 5. Tag des Versuches wurden die Herzen nach Perfundierung mit PBS entnommen und gewogen. Das Herzgewicht betrug am 5. Tag in der Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe) $140,4 \pm 11,78\text{mg}$ sowie $122,0 \pm 13,66\text{mg}$ in der TAT-p21-Kontrollgruppe (TAT-p21/NaCl-Gruppe). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 4.10.; Tab.4.1.).

Das Herzgewicht lag in den mit Doxorubicin behandelten Gruppen zwischen $94,5 \pm 10,39\text{mg}$ in der NaCl/Dox-Gruppe und $100,67 \pm 15,75\text{mg}$ in der TAT-p21/Dox-Gruppe und war signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen mit Doxorubicin behandelten Gruppen (jeweils $p > 0,05$) (Abb. 4.10.; Tabl. 4.1.).

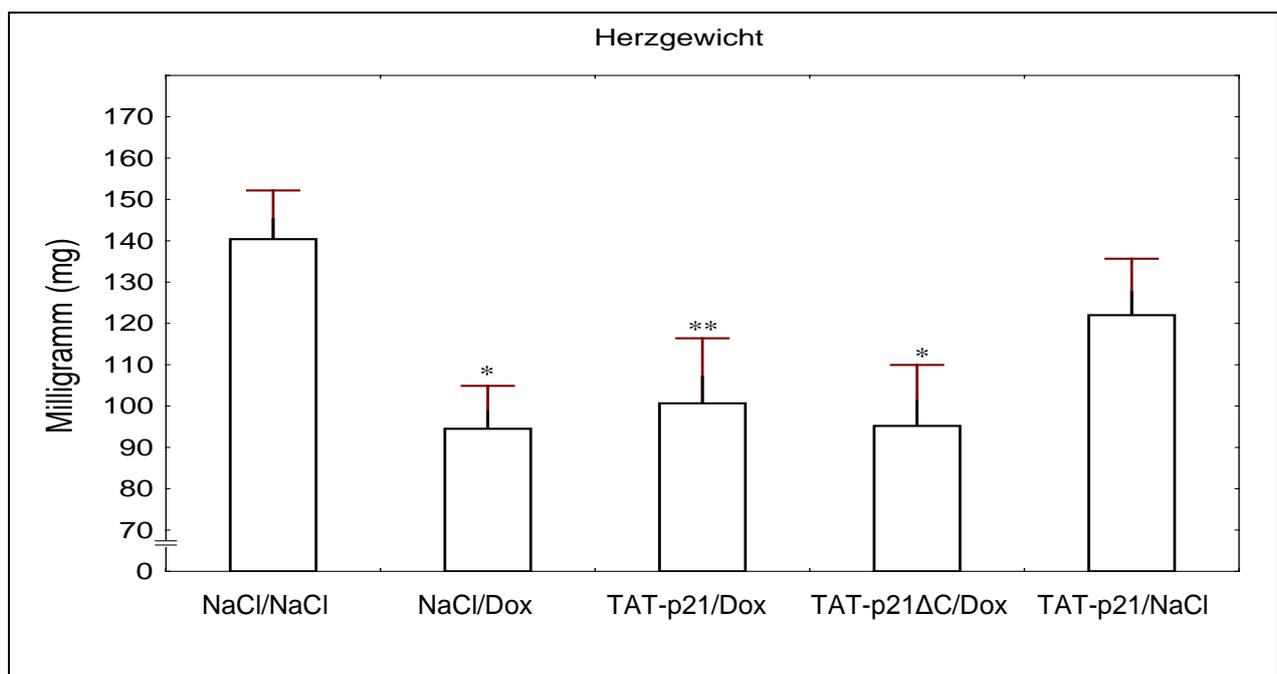


Abb. 4.10. Herzgewicht

Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5-6 Tieren ($n=5-6$) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

* $p < 0,001$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), ** $p < 0,005$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe).

4.7.3. Herzgewicht/Körpergewicht Ratio, Herzgewicht/Fibulalänge Ratio

Um das Herzgewicht verschieden großer und schwerer Tiere miteinander in Relation zu setzen, wurde das Herzgewicht auf das Körpergewicht und die Fibulalänge bezogen. Die Herzgewicht/Körpergewicht Ratio in Kontrollgruppen (NaCl/NaCl-Gruppe: $6,06 \pm 0,25$ mg/g und TAT-p21/NaCl-Gruppe: $5,85 \pm 0,44$ mg/g) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p > 0,05$). In den mit Doxorubicin behandelten Gruppen betrug dieses Verhältnis: $5,13 \pm 0,50$ mg/g in der NaCl/Dox-Gruppe, $5,12 \pm 0,54$ mg/g in der TAT-p21/Dox-Gruppe, $4,90 \pm 0,71$ mg/g in der TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe und war signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe) ($p < 0,01$). Es gab keine signifikanten Differenzen zwischen den mit Doxorubicin behandelten Gruppen ($p > 0,05$) (Abb. 4.11.; Tabl. 4.1.).

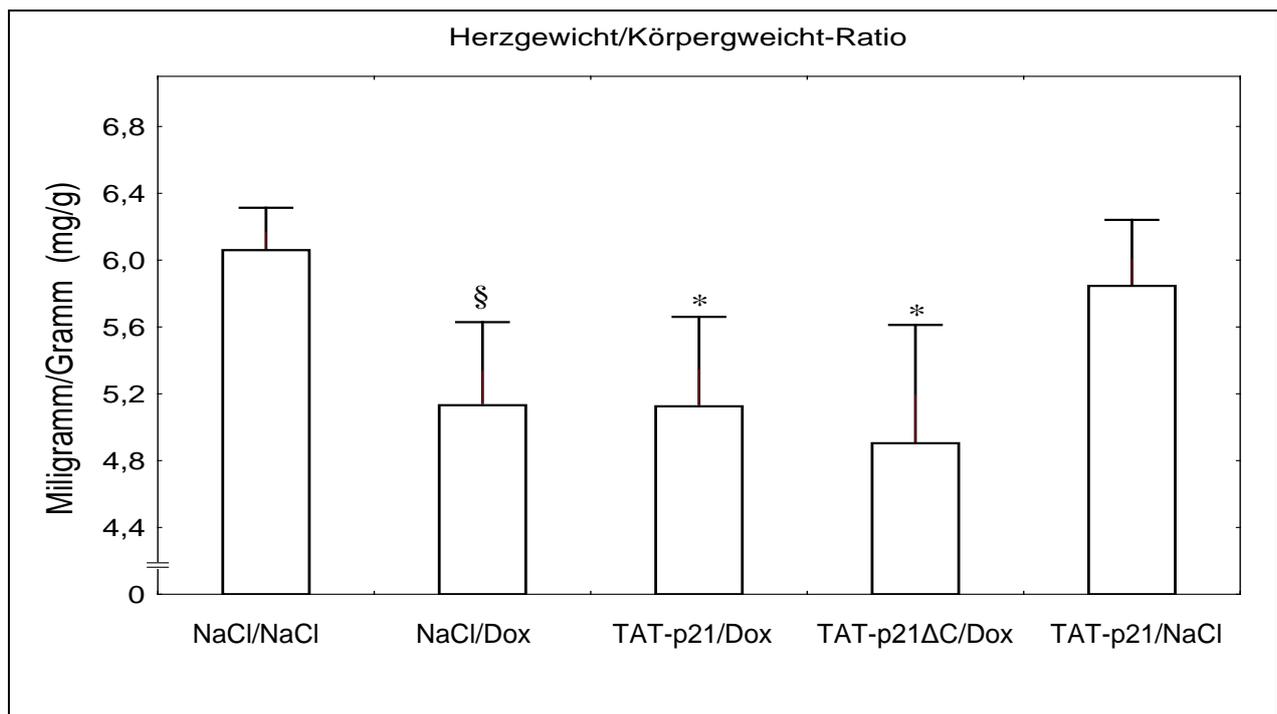


Abb. 4.11. Herzgewicht/Körpergewicht Ratio

Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5-6 Tieren ($n=5-6$) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

* $p < 0,01$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), § $p < 0,005$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe).

Das Herzgewicht/Fibulalänge Verhältnis war in den mit Doxorubicin behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls deutlich signifikant reduziert (NaCl/NaCl-

Gruppe: $7,51 \pm 0,58 \text{ mg/mm}$; $p < 0,005$). Die Ratio betrug: $5,29 \pm 0,58 \text{ mg/mm}$ in der NaCl/Dox-Gruppe, $5,25 \pm 0,67 \text{ mg/mm}$ in der TAT-p21/Dox-Gruppe und $5,05 \pm 0,73 \text{ mg/mm}$ in der TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe. Die Unterschiede in den mit Doxorubicin behandelten Tieren waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tab. 4.1.).

Das Verhältnis Herzgewicht zu Fibulalänge war in der Gruppe mit alleiniger Gabe von TAT-p21 gegenüber der Kontrollgruppe leicht aber nicht signifikant reduziert (TAT-p21/NaCl-Gruppe: $6,82 \pm 0,41 \text{ mg/mm}$ vs. NaCl/NaCl-Gruppe: $7,51 \pm 0,58 \text{ mg/mm}$; $p > 0,05$) (Tab. 4.1.).

	NaCl/NaCl	NaCl/Dox	TAT-p21/ Dox	TAT-p21 Δ C/ Dox	TAT-p21/ NaCl
Ausgangs- Gewicht (g)	$22,90 \pm 1,83$	$22,20 \pm 1,31$	$22,88 \pm 1,48$	$22,48 \pm 1,16$	$21,84 \pm 1,83$
Endgewicht (g)	$23,18 \pm 1,76$	$18,82 \pm 0,84^{**}$	$19,46 \pm 1,05^{**}$	$19,20 \pm 0,51^{**}$	$21,04 \pm 1,49^*$
Herzgewicht (HG) (mg)	$140,4 \pm 11,78$	$94,5 \pm 10,39^{\S}$	$100,67 \pm 15,75^{**}$	$95,2 \pm 14,77^{\S}$	$122,0 \pm 13,66$
Dynamik des Gewichts (%)	1,2	15,32	15,0	14,59	3,66
HG/Endgewicht Ratio (mg/g)	$6,06 \pm 0,25$	$5,13 \pm 0,50^{**}$	$5,12 \pm 0,54^{\S}$	$4,90 \pm 0,71^{**}$	$5,85 \pm 0,44$
Fibulalänge (FL) (mm)	$18,7 \pm 0,57$	$18,2 \pm 0,51$	$18,83 \pm 0,75$	$18,5 \pm 0,50$	$18,0 \pm 1,0$
HG/FL Ratio (mg/mm)	$7,51 \pm 0,58$	$5,29 \pm 0,58^{\#}$	$5,25 \pm 0,67^{\#}$	$5,05 \pm 0,73^{\#}$	$6,82 \pm 0,41$
Sterblichkeit (%)	0% (0/5)	16,6% (1/6)	28,6% (2/7)	14,3% (1/7)	0% (0/5)

Tab. 4.1. Gruppencharakteristik

HG – Herzgewicht, FL – Fibulalänge

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), ** $p < 0,005$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe),

\S $p < 0,001$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), $\#$ $p < 0,0005$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe).

4.7.4. Echokardiographische Analyse

Um den Einfluss von Doxorubicin auf die Herzfunktion, Herzmorphologie und eventuell protektive Wirkung von TAT-p21 zu evaluieren, erfolgte am 5. Tag des Experiments eine echokardiographische Untersuchung. Die Doxorubicin Behandlung induzierte keine signifikante Veränderung der linksventrikulären Funktion, die durch Bestimmung der Verkürzungsfraction (FS - Fractional Shortening) abgeschätzt wurde. Die Verkürzungsfraction betrug zwischen $25,1 \pm 1,53\%$ in der TAT-p21-Kontrollgruppe (TAT-p21/NaCl-Gruppe) und $34,14 \pm 7,66\%$ in der TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (jeweils $p > 0,05$) (Abb. 4.12.).

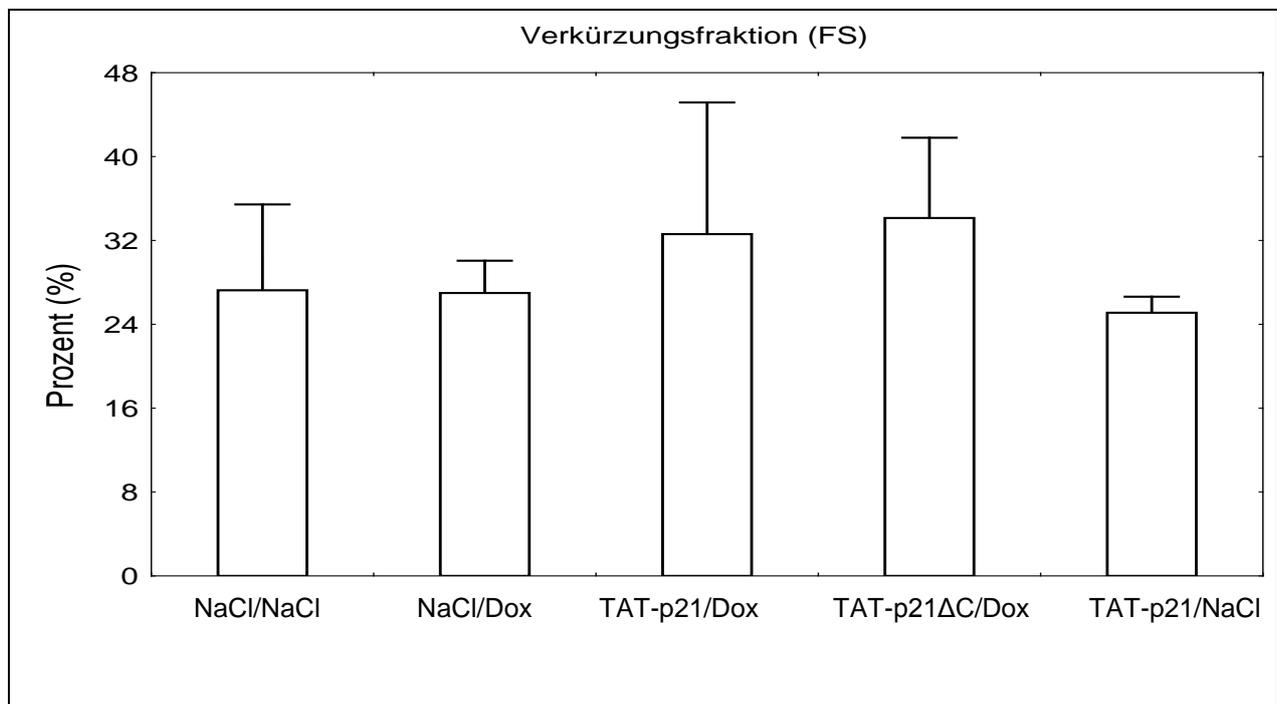


Abb. 4.12. Echokardiographische Verkürzungsfraction (FS)

Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Tieren ($n=5$) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

Die Doxorubicin Gabe führte nach 5 Tagen zu einer signifikanten Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen Diameters (LVDd) im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe: $4,074 \pm 0,38\text{mm}$; NaCl/Dox-Gruppe: $3,614 \pm 0,16\text{mm}$; $p < 0,05$). Sowohl die Gabe von TAT-p21 als auch von TAT-p21 Δ C hatte keinen Einfluss auf die

durch Doxorubicin Gabe induzierte Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen Diameters (TAT-p21/Dox-Gruppe: $3,342 \pm 0,41\text{mm}$; TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe: $3,190 \pm 0,25\text{mm}$; jeweils $p > 0,05$ vs. NaCl/Dox-Gruppe). Diese fiel verglichen mit der NaCl/Dox-Gruppe sogar noch verstärkt, wenn auch nicht signifikant aus. Somit wurden unter den mit Doxorubicin behandelten Gruppen keine relevanten Unterschiede beobachtet.

Die alleinige Gabe von TAT-p21 verursachte keine relevante Änderung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters gegenüber der Kochsalz Kontrollgruppe (TAT-p21/NaCl-Gruppe: $3,986 \pm 0,188\text{mm}$; $p > 0,05$ vs. NaCl/NaCl-Gruppe) (Abb. 4.13.).

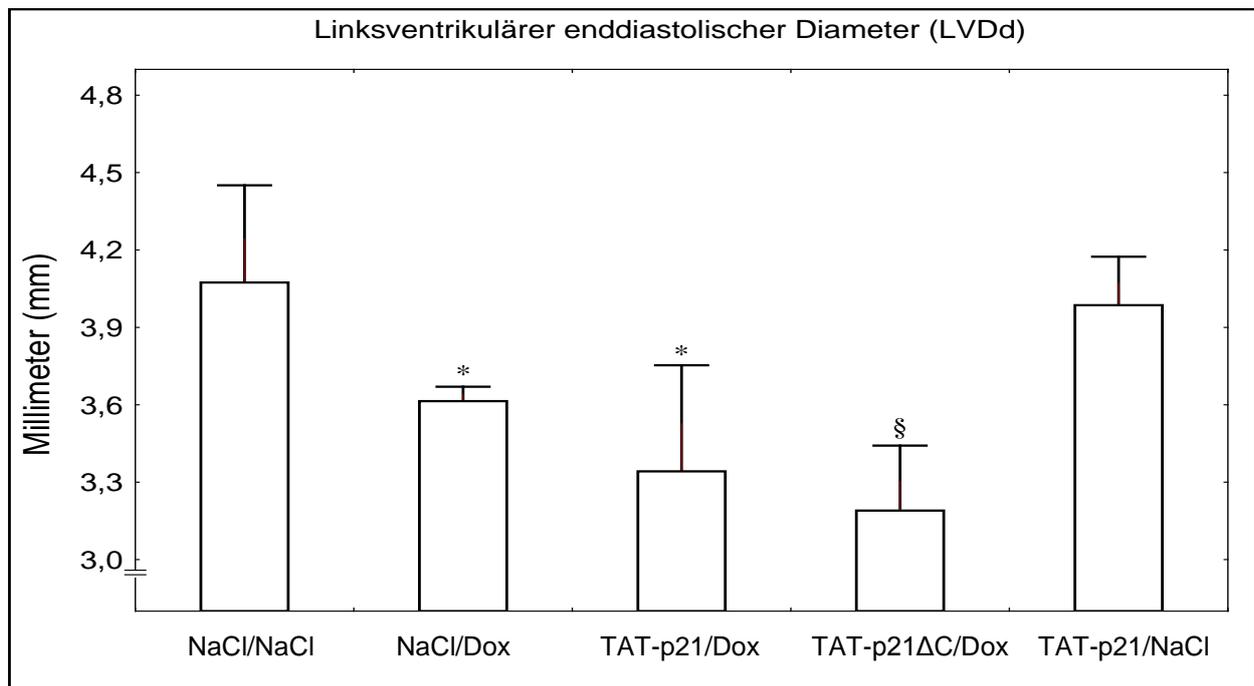


Abb. 4.13. Echokardiographischer linksventrikulärer enddiastolischer Diameter

Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Tieren ($n=5$) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), § $p < 0,005$ vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe).

4.7.5. Linksventrikuläre ANP mRNA-Expression

Das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) ist ein natriuretisch und blutdrucksenkend wirkendes Protein, dass hauptsächlich im Vorhofgewebe synthetisiert wird. Bei Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie kommt es zur gesteigerten ventrikulären ANP Expression. ANP gilt als guter Indikator für den Schweregrad einer Herzinsuffizienz, da der Serumspiegel mit dem klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz korreliert.

Die kardiale ANP Genaktivierung wurde mit Real-Time PCR bestimmt und dann auf die Expression eines konstant exprimierten Gens (GAPDH) bezogen (Abb. 4.14.).

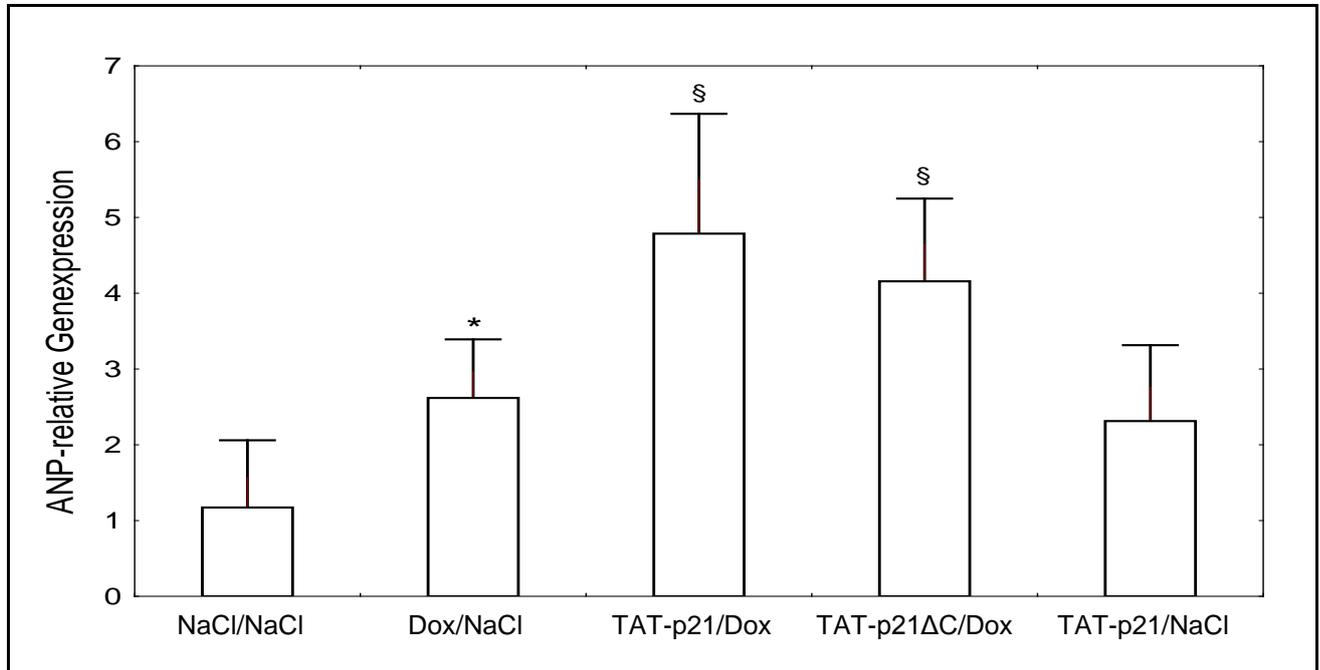


Abb. 4.14. Relative ANP Genexpression

Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4-5 Tieren (n=4-5) pro Gruppe dar. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM).

*p<0,05 vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe), § p<0,01 vs. Kontrolle (NaCl/NaCl-Gruppe).

Die kardiale ANP Genaktivierung wurde mit Real-Time PCR bestimmt und dann auf die Expression eines konstant exprimierten Gens (GAPDH) bezogen (Abb. 4.14.).

Die Behandlung mittels Doxorubicin resultierte in einem signifikanten 1,5-fachen Anstieg der relativen ANP-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl/NaCl-Gruppe: 1,17 ± 0,89; NaCl/Dox-Gruppe: 2,62 ± 0,77; p<0,05). Nach alleiniger Gabe von TAT-p21 war die ANP Expression gegenüber der Kontrollgruppe 1-fach erhöht (TAT-p21/NaCl-Gruppe: 2,31 ± 1,0). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (p>0,05). Die ANP Expression in der TAT-p21/NaCl-Gruppe unterschied sich ebenfalls nicht von der, der NaCl/Dox-Gruppe. Der höchste Anstieg wurde bei den mit Doxorubicin behandelten Tieren verzeichnet, die gleichzeitig TAT-Proteine bekamen. Hier zeigte sich ein 4-facher Anstieg in beiden TAT-Fusionsprotein Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Dox/TAT-p21-Gruppe: 4,79 ± 1,58; TAT-p21ΔC/Dox-

Gruppe: $4,16 \pm 1,09$; jeweils $p < 0,01$ vs. NaCl/NaCl-Gruppe). Zwischen den beiden TAT-Fusionsprotein Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (Abb. 4.14.).

5. Diskussion

Herzversagen ist weltweit eine der Haupttodesursachen bei Menschen über dem 65. Lebensjahr. Die Hälfte der Patienten, bei denen die Diagnose Herzinsuffizienz gestellt wurde, verstirbt innerhalb von 4 darauf folgenden Jahren.

Da die Überlebensrate von Tumorpatienten in den letzten 20 Jahren deutlich zugenommen hat, hat das durch Chemotherapie induzierte Herzversagen einen ähnlich limitierenden Einfluss auf das Überleben und die Lebensqualität des Patienten, wie es bei anderen Formen der Herzinsuffizienz der Fall ist.

Trotz zahlreicher Fortschritte in der medikamentösen Behandlung konnten bisher nur die Symptome der Herzinsuffizienz behandelt werden. Etablierte Medikamente wie β -Blocker, ACE-Hemmer, Sartane und Diuretika ermöglichen eine Reduktion der Herzarbeit durch Vor- und/oder Nachlastsenkung. Infolgedessen kommt es durch Optimierung der hämodynamischen Parameter wie Herzfrequenz, Blutdruck, Schlagvolumen und enddiastolischer Spannung zu einem reduzierten myokardialen Sauerstoffbedarf.⁸⁶

Hinsichtlich der etablierten medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz, bestehen einzelne Studien, die die Wirkung bei der Chemotherapie-induzierten Kardiomyopathie untersucht haben. Cardinale und ihre Mitarbeiter zeigten in einer randomisierten Studie, dass die Gabe von Enalapril bei Patienten nach einer Hochdosis-Chemotherapie mit Doxorubicin eine signifikante Verschlechterung der LV-Funktion verhindern konnte.⁸⁷

Die Rolle des apoptotischen Zelltodes wurde bei Herzerkrankungen, insbesondere in der Entwicklung der Herzinsuffizienz mehrfach nachgewiesen und diskutiert.¹⁰

Die Herzmuskelzellen verlieren postnatal weitgehend die Fähigkeit zur Zellteilung und können nur hypertroph wachsen. Der Wandel von hyperplastischem zu hypertrophem Wachstum geht mit einer Abnahme positiver Zellzyklusfaktoren wie Cycline und CDK2 sowie mit einer gesteigerten Expression der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 einher.⁸⁸

Da der Verlust von Kardiomyozyten nicht ausreichend durch regeneratives Wachstum kompensiert werden kann und zum Versagen der systolischen Pumpfunktion des Herzens führt, spielt die kausale Therapie, beispielsweise im Sinn einer Prävention der Apoptose von Herzmuskelzellen eine zentrale Rolle.

Die Charakterisierung der pro- und antiapoptotischen Signale dient der Etablierung neuer innovativer Interventionsstrategien zur Blockade der Apoptose und dadurch zur

Erhaltung des kontraktiven Myokards. Die Untersuchung der molekularen Verknüpfung zwischen Zellzyklus- und Apoptosekontrolle in Kardiomyozyten stellt einen wichtigen Aspekt im Verständnis dieser Prozesse dar und bietet einen potenziellen Ansatzpunkt der zukünftigen Therapie.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der cyklinabhängige Zellzyklus-Inhibitor p21 effizient die Apoptose der Herzmuskelzellen *in vivo* inhibieren kann. Somit konnte ein enger Zusammenhang zwischen dem Zellzyklus und dem programmierten Zelltod bestätigt werden. Des Weiteren führt die Verwendung einer p21 Mutante zu einem besseren Verständnis der antiapoptotischen Aktivität von p21.

5.1 Proteintransduktion

Die Herstellung eines Fusionsproteins bestehend aus der Proteinsequenz von p21 gekoppelt an die Proteintransduktionsdomäne des TAT-Proteins von HIV1 ermöglichte eine effiziente Transduktion von TAT-p21 Fusionsprotein ins Myokardium nach intraperitonealer Gabe. Immunhistochemische Untersuchungen bestätigten die zeitnahe Transduktion relevanter Mengen TAT-Fusionsproteins ins Myokard. Zahlreiche Studien belegen, dass die fusionierten Proteine in der Regel ihre Eigenschaften behalten.^{74,89}

Somit bietet die Fusionierung eines Zielgens an die TAT-Domäne ein interessantes und attraktives Instrument für die Proteintherapie und epigenetische Forschung. Viele *in vitro* und *in vivo* Studien belegen das therapeutische Potenzial der TAT-Proteintransduktionsmethode. TAT-Bcl-xl hemmt den programmierten Zelltod von primären Neuronen sowohl im Zellkulturexperiment als auch nach fokal-induziertem Ischämie/Reperfusionsschaden durch Ligatur der Arteria cerebri media.⁹⁰ Gustafsson und Mitarbeiter konnten am isolierten, perfundierten Herz sowohl eine effiziente Transduktion als auch eine antiapoptotische Wirkung von TAT-ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) nachweisen.⁹¹

Die Immunogenität von Fusionsproteinen stellt eine potenzielle Limitierung des Proteintransduktionsverfahren dar. Hierbei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass einfache Proteine und Peptide in der Regel weniger immunogen sind als virale Vektoren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit bestimmte immunogene Epitope zu entfernen sowie durch eine lokale Applikation eventuelle Nebenwirkungen einzuschränken. Dennoch müssen zukünftige Studien potenzielle immunologische und

toxische Reaktionen exakt untersuchen.

Ein weiteres Problem stellt die Verteilung von TAT-Proteinen in allen Organen, einschließlich dem Gehirn, dar. Da beispielweise p21 ein Protein mit einer breiten pleiotropen Wirkung ist, können daraus zahlreiche Nebenwirkungen resultieren. Aus diesem Grund wäre ein zielgenauer und selektiver Transport vorteilhaft.

5.2. Doxorubicin und Apoptose von Herzmuskelzellen

Die vorgelegten Daten zeigen Doxorubicin als einen potenten Induktor der Apoptose von Kardiomyozyten. Die Aktivierung des programmierten Zelltodes konnte mittels verschiedener Verfahren, wie der TUNEL-Methode, Messung der Caspasen-Aktivitäten und Bestimmung der Bcl-2/Bax Ratio mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen werden.

5.2.1. Dynamik der Apoptose

Der apoptotische Zelltod von Kardiomyozyten spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie. Die Ergebnisse zeigen, dass die Apoptose von Herzmuskelzellen nach Behandlung mit Doxorubicin betont innerhalb der ersten 24 Stunden induziert wird. In den darauf folgenden Tagen kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Apoptoserate bis zum Erreichen basaler Werte. Dieses Dynamik-Muster ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Arola und bietet eine Erklärung für Beobachtungen, die die Rolle der Apoptose in der Entwicklung der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie in Frage stellen.² Der Zeitpunkt nach der Doxorubicinapplikation, zu dem die Apoptoseuntersuchung durchgeführt wird, scheint entscheidend zu sein. Somit ist der fehlende Apoptosenachweis an späteren Tagen ohne Bedeutung.⁹²

Das Ausmaß der Apoptose variiert bei kardialen Erkrankungen sehr stark. Die Apoptoserate im insuffizienten humanen Herz variiert von 231 auf 10^5 Zellen bei Olivetti und Mitarbeitern bis zu 5-35% bei Narula und Mitarbeiter.^{93,94} Die Daten von Narula scheinen kaum vorstellbar zu sein, da ein so massiver Verlust von Kardiomyozyten innerhalb weniger Tage zum Herzschwund führen müsste.

Das Spektrum der Anzahl von apoptotischen Kardiomyozyten ist ebenfalls im Fall der

Doxorubicinapplikation nach vielen Publikationen sehr breit (siehe Tabelle 5.1). Ein 5-10 facher Anstieg der Apoptoserate nach Doxorubicin-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe scheint in den meisten Studien üblich zu sein.^{68,84,85, 95-97}

Die Zeitdauer der Apoptose variiert *in vivo* in Abhängigkeit vom Zelltyp zwischen 1 und 24 Stunden, dennoch werden oft apoptotisch sterbende Zellen innerhalb von 1 bis 3 Stunden aus dem Gewebe entfernt.⁹⁸ Wegen des kurzen zeitlichen Verlaufs des Apoptoseprozesses werden nur wenige apoptotische Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt detektiert. Aus diesem Grund ist auch eine quantitative Unterschätzung der Apoptoserate möglich.⁹⁹

	Apoptoserate	
	Kontrollgruppe	Doxorubicin-Gruppe
Disseration - Ergebnisse	8,66 ±1,30/10 000	42,50 ±7,99/10 000
Nozaki et al., <i>Circulation</i> ;2004 ⁸⁵	10%	25%
Toko et al. <i>Hypertens res</i> ;2002 ⁸⁴	0.30/ 10 000	3.63/10 000
Aries et al., <i>PNAS</i> ; 2004 ⁹⁵	0,45%	6%
Liu et al., <i>Am J Physiol Heart Circ Phys I</i> ; 2004 ⁹⁶	2,5 %	13,2%
Zhu et al., <i>Circulation</i> ; 2009 ⁶⁸	0,02/mm ²	0,22/mm ²
Li et al., <i>Circulation</i> ; 2006 ⁹⁷	0,3/mm ²	1,4/mm ²

Tab. 5.1. **Anzahl der apoptotischen Kardiomyozytenkerne in ausgewählten Publikationen.**

Ausgewählte Publikationen betreffen ausschließlich Tierexperimente mit männlichen Mäusen

Die Spezifität und Sensitivität der TUNEL-Methode wurde in der Literatur ausführlich diskutiert. Diese Technik basiert auf der Markierung von DNA-3'-OH Enden, die während der Apoptose durch entstehende DNA-Strangbrüche zugänglich werden. Freie DNA-3'-OH Enden sind jedoch nicht ausschließlich für den programmierten Zelltod charakteristisch, sie können ebenfalls während anderer Prozesse, wie DNA-Reparatur oder nicht spezifischen DNA-Schäden vorkommen.¹⁰⁰

Bei einer ultrastrukturellen Untersuchung TUNEL-positiver Kardiomyozyten aus humanem Myokardium mittels Elektronenmikroskopie konnte keine apoptotischen und

nekrotischen Zellen nachgewiesen werden. Es wurde in diesen Kardiomyozyten eine erhöhte Aktivität von Reparaturprozessen nachgewiesen.¹⁰¹

Zahlreiche Untersuchungen zeigen jedoch eine Übereinstimmung der TUNEL-Analyse mit anderen Methoden. TUNEL-positive Kardiomyozyten zeigten morphologische Merkmale der Apoptose, wie Chromatinkondensation und Chromatinfragmentierung in der konfokalen Mikroskopie sowie ein charakteristisches Bandenmuster in der DNA-Elektrophorese.^{93,94,99}

Eine weitere Bestätigung der Beteiligung von kardiomyozytärer Apoptose an der Pathogenese der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie stellt der Anstieg der Caspaseaktivitäten und die Beeinflussung der Bcl-2/Bax Ratio dar. Beide Apoptoseparameter werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Ein wichtiger Aspekt stellt die inkomplette Kardiomyozytenapoptose dar. Sie charakterisiert sich histologisch mit einer zytoplasmatischen Lokalisation von mitochondrialem Cytochrom c und der gespalteten Caspase-3, ohne bestehende Kondensation des Chromatins und oligonukleosome DNA-Fragmente. Diese so genannten Zombie-Kardiomyozyten sind ihrer Funktion beraubt und tragen somit zur Verschlechterung der kontraktilen Leistung des Herzens bei.^{15,102}

Dieser Status ist durch eine gleichzeitige Aktivierung von endogenen Caspase-Inhibitoren, zentralem Apoptoseinhibitor XIAP (X-linked inhibitor of Apoptosis) und Apoptose Repressor mit Caspasen-Rekrutierungsdomänen (ARC) möglich.¹⁰³

Apoptose Induktion soll nicht als einziger pathophysiologischer Mechanismus der Doxorubicin-Kardiotoxizität betrachtet werden. Eine wichtige Rolle scheinen auch eine Induktion von Inflammation und Fibrose zu spielen. Des Weiteren wurden Veränderungen im Zytoskelett sowie in den kontraktilen Elementen von Kardiomyozyten beschrieben. Diese Wirkung kann auf die direkte Toxizität von Doxorubicin oder auf eine Beeinträchtigung der Proteinsynthese durch DNA-Schädigung zurückgeführt werden.^{2,85,92}

5.3 Einfluss von TAT-Fusionsproteinen auf Doxorubicin-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten

5.3.1 TUNEL-Analyse

Doxorubicin-induzierte Kardiomyozytenapoptose wurde effizient durch eine TAT-p21-Behandlung reduziert. Die Effektivität von TAT-p21 war bis zu einem gewissen Maße dosisabhängig. Eine weitere Erhöhung der Dosis (30 mg/kg KG) führte nicht zu einer steigenden Wirkung. Dieser Effekt kann auf eine nicht-lineare Dosis-Wirkung-Beziehung und/oder mögliche Toxizität der höheren Dosis zurückgeführt werden. Darauf deutet unter anderem der bei 2 Tieren, die mit der höchsten Dosis von TAT-p21 (30mg/kg KG) behandelt wurden, gesehene Aszites hin.

Zusätzlich wurde die Wirkung von TAT-p21 auf Doxorubicin-induzierte Kardiomyozytenapoptose mit einer trunkierten Mutante - TAT-p21 Δ C ohne CDK2 inhibitorische Aktivität verglichen. Gegenüber TAT-p21 zeigte die TUNEL-Analyse von TAT-p21 Δ C eine niedrigere antiapoptotische Wirkung der Mutante. Die verminderte Apoptose-inhibierende Aktivität von TAT-p21 Δ C bestätigt die Rolle der CDK2-Aktivität für den apoptotischen Prozess und somit einen Zusammenhang zwischen dem Zellzyklus und dem programmierten Zelltod.^{49,50,55} Obwohl die Mutante eine niedrigere Wirkung besitzt, reduziert sie signifikant die Anzahl von apoptotischen Zellen. Diese Daten bestätigen, dass die antiapoptotische Wirkung von p21 pleiotrop ist und nicht nur auf eine Inhibition der CDK2-Aktivität zurückgeführt werden kann.^{57,60}

5.3.2 Caspasen-Aktivität

Die Aktivierung der Caspasenkaskade ist ein spezifisches Attribut des programmierten Zelltods. Das Caspasensystem wird während der Behandlung mit Doxorubicin aktiviert. 24-Stunden nach der Doxorubicingabe kam es zu einem zweifachen Anstieg der Aktivität der Caspasen 3 und 7, was bereits sowohl in *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten nachgewiesen wurde.¹⁰⁴

P21 gilt einerseits als Substrat für Caspasen, andererseits kann es die Aktivierung von inaktiven Procaspasen inhibieren. Obwohl beide TAT-Fusionsproteine die Aktivierung der Caspasen in gleichem Ausmaß supprimierten, war die Anzahl apoptotischer

Kardiomyozytenkerne in beiden Gruppen unterschiedlich. Eine Erklärung der reduzierten antiapoptotischen Eigenschaften von TAT-p21 Δ C könnte die fehlende CKD-inhibitorische Aktivität sein.

Diese Ergebnisse bestätigen die Rolle von Caspasen in apoptotischen Prozessen. Sie zeigen jedoch auch, dass die Caspasen-Aktivität erforderlich, aber nicht allein verantwortlich für den apoptotischen Phänotyp ist. Für die Ausführung der Apoptose ist auch die Aktivierung von CDKs notwendig. Diese Schlussfolgerung ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Harvey und Mitarbeitern. Sie zeigten, dass einerseits die CDK-Aktivität Caspsen-abhängig ist und andererseits eine Transfektion mit dominant-negativen Mutanten (DN-CDKs) und CDK-Inhibitoren den apoptotischen Zelltod verhindert.⁶⁴

5.3.3 Bcl-2/Bax Ratio

Das Verhältnis von antiapoptotischem Bcl-2 zu proapoptotischem Bax ist kritisch für die Regulierung der Freisetzung von proapoptotischen Faktoren vom Mitochondrium und für die folgende Aktivierung der Apoptose-Kaskade. Die Änderung des Verhältnisses von pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie beeinflusst das Überleben von Kardiomyozyten, was sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Versuchen beobachtet wurde.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Trotz des beobachteten Anstiegs der Apoptoserate in jeder mit Doxorubicin-behandelten Gruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der relativen Bcl-2/Bax Ratio (Abb.4.8). Diese Daten stimmen mit Beobachtungen von Childs überein und könnten auf eine potenziell schützende Anpassungsreaktion hindeuten, die dem Herzmuskel einen partiellen Schutz gegenüber Doxorubicin-induziertem Zelluntergang ermöglicht.⁶⁹

Die Expression von beiden Genen wird durch Doxorubicin gleichermaßen hochreguliert, was auf eine Transkription-unabhängige Regulation hindeutet.⁸⁵ Möglicherweise erfolgt die Regulierung durch posttranslationale Modifikationen von Bcl-2 und Inhibition der Bcl-2-Degradation.^{108,109}

Der fehlende Einfluss der TAT-p21 Fusionsproteine auf den Doxorubicin-induzierten Anstieg der relativen Bcl-2/Bax Ratio deutet auf eine Unabhängigkeit diverser Regulationsmechanismen der Apoptose hin. Dagegen spricht jedoch die Tatsache,

dass sowohl die Induktion von p21 als auch die transkriptionelle Aktivierung von Bax als Antwort auf DNA-Schäden über einen p53-abhängigen Mechanismus erfolgen. Einerseits wird Zellzyklusarrest über p21 vermittelt, andererseits p53-vermittelte Apoptose über Zelltod-Aktivatoren, wie Bax und Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis). Obwohl p21 keinen Einfluss auf die Bax/Bcl-2-Ratio hat, inhibierte TAT-p21 in der vorgelegten Arbeit die Caspasen-Aktivität, die durch Bax-Aktivierung induziert wird.¹¹⁰ Des Weiteren ist p21 ein Substrat für Caspase-3.⁶²

5.4 Doxorubicin-induzierte Kachexie.

Appetitlosigkeit, Übelkeit sowie Emesis und infolgedessen ein Gewichtsverlust gehören zu häufigen Nebenwirkungen von Chemotherapeutika. Um diesen Nebenwirkungen vorzubeugen werden üblicherweise Antiemetika verabreicht. In den durchgeführten Experimenten induzierte Doxorubicin eine erhebliche (ca. 25 %-ige) Gewichtsreduktion innerhalb der ersten 5 Tage nach Applikation. Damit einher ging eine signifikante ca. 30 %-ige Reduktion des Herzgewichtes. Die Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio (HG/KG-Ratio) war ebenfalls in den Doxorubicin-behandelten Gruppen signifikant geringer im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

In publizierten Arbeiten war der Einfluss von Doxorubicin auf das Körpergewicht unterschiedlich. Eine deutliche Gewichtsreduktion haben ebenfalls Olson sowie Karen Li beobachtet. In der Studie von Olson zeigte sich eine ca. 17- %-ige Herabsetzung des Gewichtes in den ersten 5 Tagen nach einmaliger Gabe von Doxorubicin.⁴ In den Experimenten von Karen Li zeigte sich trotz einem ca. 20%-igen Gewichtsverlust eine unveränderte HG/KG-Ratio im Vergleich zur Kontrollgruppe.⁹⁷ Eine 30-%ige Reduktion des Herzgewichtes wurde in den Experimenten von Zhu beobachtet. In seiner Arbeit wurde ebenfalls ein deutlicher Körpergewichtsverlust sowie eine Verminderung der Herzgewicht/Tibiallänge-Ratio bei Doxorubicin-behandelten Tieren beobachtet.⁶⁸

Kein Einfluss auf die HG/KG-Ratio wurde in der Studie von Longhu Li beobachtet, es wurde jedoch in seinen Tierexperimenten eine niedrigere Dosierung von Doxorubicin (15 mg/kg Kg) verwendet.⁹²

Die Ursache der erheblichen Gewichtsreduktion ist komplex. Es kann sich um kardiale Kachexie, Anorexie sowie Malnutrition handeln. Am ehesten handelt es sich um ein Zusammenspiel aller drei Prozesse. Das Auftreten von Kachexie bei Patienten mit

chronischer Herzinsuffizienz verschlechtert deutlich die Prognose. Die Pathophysiologie der kardialen Kachexie ist nicht vollständig geklärt. Sie entspricht in großem Ausmaß den Prozessen der Kachexie anderer Erkrankungen, wie Sepsis, Tumorerkrankung und AIDS. Ebenso werden viele Mediatoren, wie pro-inflammatorische Zytokine, Katecholamine, Kortisol, ANP, Ghrelin und HSP (heat shock protein) damit in Verbindung gebracht.¹¹¹

Die Gabe von TAT-p21 in den mit Doxorubicin-behandelten Gruppen zeigte keinen Einfluss auf die Doxorubicin-induzierte Reduktion des Körpergewichtes und des Herzgewichtes. Die alleinige Gabe von TAT-p21-Protein führte zu einer signifikanten Gewichtsreduktion und einer nicht signifikanten Herzgewichtsreduktion. Diese Beobachtung deutet auf eine mögliche toxische Wirkung des TAT-p21-Proteins hin. Sowohl p21 als auch TAT-Protein üben eine pleiotrope Wirkung aus, die potenziell toxisch wirken kann. HIV TAT-Protein beeinflusst unter anderem mehrere Wachstumsfaktoren und Chemokine und übt dadurch eine pleiotrope Wirkung, auch in Abwesenheit von anderen viralen Strukturen, auf die Zelle aus.¹¹² Entgegen diesen Daten stehen die Beobachtungen von Frau Sorriento. Dort kam es bei der Applikation vom TAT-Fusionprotein zu keinem signifikanten Gewichtsverlust bei den behandelten Tieren, auch die histologische Untersuchung der inneren Organe erbrachte keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.⁸⁹

5.5 Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie

Klinische Symptome einer Herzinsuffizienz wurden bei 1-5 % mit der Antracyclinen behandelten Patienten beobachtet. Eine asymptotische Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion wurde bereits bei bis zu 20-30 % der Patienten festgestellt.^{113,114} Die Kardiotoxizität von Medikamenten wird als eine über 10 %-ige Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion im Vergleich zum Ausgangswert definiert, wobei die LV-Funktion nach der Verschlechterung weniger als 50 % betragen muss.⁸⁷

Das Mausmodell der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie ist in der Literatur gut etabliert. In zahlreichen Experimenten wurden ca. 5 Tage nach Applikation von 20 mg/kg KG Doxorubicin eine Verschlechterung der LV-Funktion und eine linksventrikuläre Dilatation beobachtet.^{4,68,92,97}

In den durchgeführten Versuchen wurde trotz der üblicherweise verwendeten Standarddosis von Doxorubicin keine dilatative Kardiomyopathie induziert. Die definierten echokardiographischen Parameter einer dilatativen Kardiomyopathie wurden nicht erfüllt. Es kam weder zu einer Dilatation des linken Ventrikels noch zu einer Abnahme der linksventrikulären Funktion. Der enddiastolische linksventrikuläre Durchmesser zeigte sich bei den Doxorubicin-behandelten Mäusen deutlich reduziert, was mit einem erheblich reduzierten Herzgewicht in allen Doxorubicin-behandelten Gruppen einherging. Diese Veränderungen kann man ausschließlich auf eine akute Kachexie zurückführen.

In der oben genannten Studie von Karen Li konnte trotz eines ähnlich erheblichen Gewichtsverlustes sowie einer Herzgewichtsverminderung die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie beobachtet werden. Zhu konnte ebenfalls eine Dilatation der linken Kammer trotz 30-%iger Reduktion des Herzgewichtes nachweisen.

Diese Diskrepanz kann nicht durch eine höhere Apoptose Rate erklärt werden. Die Doxorubicin-Gabe in den Experimenten von Frau Li sowie von Herrn Zhu induzierte, ähnlich wie in der vorgelegten Arbeit, einen ca. 5-10-fachen Anstieg der Apoptose.^{68,97}

Der ANP Spiegel gilt als ein zuverlässiger Marker der Herzschwäche, der mit dem Grad der Herzinsuffizienz sowie der linksventrikulären Pumpfunktion korreliert.

Die in klinischen Studien mit Doxorubicin behandelten Patienten zeigen einen signifikanten Anstieg von ANP im Serum erst nach einer relevanten Verschlechterung der Ejektionsfraktion. Bei Patienten mit einer erhaltenen LV-Funktion wurde kein signifikanter ANP-Anstieg nach Antrazyklin-Behandlung nachgewiesen.¹¹⁵ Im Kontrast zu diesen Studien resultierte die Behandlung mittels Doxorubicin in den durchgeführten Experimenten in einem signifikanten Anstieg der relativen ANP-Expression trotz einer normalen LV-Funktion. Da keine Verschlechterung der LV-Funktion beobachtet wurde, könnte dieser Anstieg durch eine diastolische Herzinsuffizienz erklärt werden. Nausiainen und seine Mitarbeiter untersuchten die diastolische Funktion bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, die eine Chemotherapie nach dem CHOP-Schema bekommen haben. In dieser Studie war der ANP Spiegel enger assoziiert mit der Verschlechterung der diastolischen Funktion als mit der Reduktion der linksventrikulären Funktion.¹¹⁶ Die Gabe von TAT-p21 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die relative ANP-Expression. Der Zusammenhang zwischen Apoptose von Herzmuskelzellen und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz wurde bereits in mehreren experimentellen Modellen nachgewiesen. Die Reduktion der Apoptoserate sollte somit

zu einem fehlenden Anstieg, beziehungsweise niedrigeren Anstieg der ANP-Genexpression bei den neben Doxorubicin auch mit TAT-p21 Fusionsprotein behandelten Mäusen führen. Die relative ANP-Genexpression war in den TAT-Gruppen (TAT-p21/Dox-Gruppe und TAT-p21ΔC-Gruppe) nicht signifikant unterschiedlich, jedoch höher als in der NaCl/Dox-Gruppe. Möglicherweise stellt die Applikation von TAT-Proteinen eine zusätzliche Volumenbelastung dar, die eine ANP-Expression zusätzlich stimuliert. Darauf deutet ebenfalls der nicht signifikante Anstieg der ANP-Genexpression in der Gruppe mit alleiniger Gabe von TAT-p21 hin.

Der Anstieg der ANP-Genexpression könnte auch als Kachexie-Mediator fungieren. ANP beeinflusst sowohl den Kohlenhydratenstoffwechsel als auch den Lipidenmetabolismus. ANP stimuliert beim Menschen durch Aktivierung der cGMP-vermittelten hormonsensitiven Lipase eine massive Zunahme der Lipolyse.¹¹⁷

5.6 Ausblick

Apoptose und Zellteilung sind miteinander eng verbundene Prozesse. Die Regulierungsmechanismen dieser beiden Prozesse sind vielfältig und überschneiden sich teilweise. Durch sie wird über das Zellschicksal entschieden: Überleben oder Zelltod. Sowohl die Verhinderung des gesteigerten Zelltodes als auch die Induktion der Zellteilung von vitalen Herzmuskelzellen wären ein zukunftsorientierter therapeutischer Ansatzpunkt. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die Apoptose nicht als der einzige Pathomechanismus in der Entwicklung der Herzinsuffizienz betrachtet werden kann. Obwohl TAT-p21 sich als ein potenter Apoptose-Inhibitor der Doxorubicin-induzierten Kardiomyozytenapoptose herausstellte, konnte die Applikation von TAT-p21 die Entstehung einer Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie bei der Maus nicht verhindern. Weitere Untersuchungen zur Identifizierung der beteiligten Pathomechanismen im Rahmen der Entstehung einer Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie sind für die Entwicklung einer effektiven Therapie unabdingbar.

Zusammenfassung

Kardiomyozyten sind weitgehend enddifferenzierte, postmitotische Zellen. Deswegen ist das adulte Myokard nicht in der Lage den Verlust von Herzmuskelzellen durch Proliferation zu kompensieren. Die Kardiomyozytenapoptose wird bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz verschiedener Genese beobachtet. Interessanterweise besteht eine enge Verbindung zwischen den Regulationsmechanismen der Apoptose und dem Zellzyklus. Cycline/Cyclin-abhängige-Kinasen Komplexe sind erforderlich für die Ausführung des Zellzyklus und spielen gleichzeitig eine wichtige Rolle in der Regulierung der Apoptose. Cyklin/CDK-Komplexe werden durch die CDK-Inhibitoren: CIP/KIP-Proteine (u.a. p21, p27) beeinflusst. Eine Überexpression von p21 kann die Kardiomyozytenapoptose *in vitro* inhibieren. Der p21-vermittelte antiapoptotische Mechanismus ist sehr vielseitig und weiterhin nicht vollständig geklärt.

Die Transduktion von TAT-Proteinen liefert eine neue Möglichkeit für die therapeutische Modifikation auf der molekularen Ebene. Die chemische Kopplung des TAT-Proteins an heterologes Protein ermöglicht einen direkten Transport vom Fusionsprotein in die Zellen.

Zur Beurteilung der kardiotoxischen Wirkung von Doxorubicin und Testung der antiapoptotischen Wirkung von p21 *in vivo* wurden TAT-p21 und eine trunkierte, nicht-funktionelle Mutante TAT-p21 Δ C verwendet.

Es wurden insgesamt 5 Versuchsgruppen gebildet. Dabei wurde die Kontrollgruppe mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl/NaCl-Gruppe) behandelt, eine Gruppe mit einem gewichtsadaptierten Volumen der Kochsalzlösung und Doxorubicin (NaCl/Dox-Gruppe), eine Gruppe mit Doxorubicin und TAT-p21 (TAT-p21/Dox-Gruppe) und eine weitere mit einer nicht-funktionellen Mutante: TAT-p21 Δ C und Doxorubicin (TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe). Um den Einfluss von TAT-p21 auf unbehandelte Tiere zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Tieren mit TAT-p21 und mit Kochsalzlösung anstatt Doxorubicin behandelt (TAT-p21/NaCl-Gruppe).

Die TUNEL-Analyse zeigte einen 5-fachen Anstieg von apoptotischen Kardiomyozyten in der Gruppe der mit Doxorubicin behandelten Mäuse (20 mg/kg KG) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Dox/NaCl-Gruppe vs. NaCl/NaCl-Gruppe: $41,75 \pm 4,75$ vs. $8,33 \pm 0,88$; $p < 0,0001$). Desweiteren induzierte das Doxorubicin einen signifikanten Anstieg der

Caspasen-3 /-7-Aktivität ($914,95 \pm 42,02$ RLU in der NaCl/Dox-Gruppe vs. $375,50 \pm 95,07$ RLU in der NaCl/NaCl-Gruppe; $p < 0,0001$).

Eine simultane Applikation von TAT-p21 reduziert signifikant die Doxorubicin-induzierte Apoptose (TAT-p21/Dox-Gruppe vs. NaCl/Dox-Gruppe: $14,46 \pm 2,90/10^5$ vs. $41,75 \pm 4,75/10^5$; $p < 0,00001$). TAT-p21 Δ C reduziert ebenfalls die Apoptoserate (TAT-p21 Δ C/Dox vs. NaCl/Dox – $31,03 \pm 3,0$ vs. $41,75 \pm 4,75$ per 10^5 ; $p < 0,005$), jedoch deutlich weniger stark (TAT-p21 Δ C/Dox vs. TAT-p21/Dox: $31,03 \pm 3,0/10^5$ vs. $14,46 \pm 2,90/10^5$; $p < 0,0001$).

Hinsichtlich des Einflusses auf die Caspasen-Aktivität zeigen dagegen die beide Fusionsproteine eine ähnlich inhibierende Wirkung (TAT-p21/Dox-Gruppe, TAT-p21 Δ C/Dox: $554,43 \pm 103,84$ RLU, $524,02 \pm 119,87$ (RLU) vs. $914,95 \pm 42,02$ RLU in der NaCl/Dox-Gruppe; $p < 0,001$).

Die Doxorubicin-Gabe führte zu einem signifikanten, ca. 15 %-igem Gewichtsverlust und ca. 30 %-igem Herzgewichtsverlust in allen behandelten Gruppen. Echokardiographisch wurde die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie nicht beobachtet. Der linksventrikuläre enddiastolischer Diameter (LVDd) zeigte sich in den Doxorubicin-behandelten Gruppen deutlich reduziert ($4,074 \pm 0,38$ mm in der NaCl/NaCl-Gruppe vs. $3,614 \pm 0,16$ mm in der Dox/NaCl-Gruppe; $3,342 \pm 0,41$ mm in der TAT-p21/Dox-Gruppe und $3,190 \pm 0,25$ mm in der TAT-p21 Δ C/Dox-Gruppe).

Die vorliegende Arbeit bestätigt den Zusammenhang zwischen Kontrollmechanismen des Zellzyklus und der Apoptose. Der Einsatz von TAT-p21 führt nicht nur durch CDK-Inhibition sondern auch durch die Interaktion mit Caspasen zur Inhibition der Kardiomyozytenapoptose. Da die echokardiographischen Daten keinen Anhalt für eine Entwicklung einer Kardiomyopathie unter Doxorubicin-Gabe erbrachten, konnte die zentrale Rolle der Apoptose in der Pathogenese der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie nicht bestätigt werden.

1. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1998;339(13):900-905.
2. Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res.* 2000;60(7):1789-1792.
3. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest.* 2003;111(10):1497-1504.
4. Olson LE, Bedja D, Alvey SJ, Cardounel AJ, Gabrielson KL, Reeves RH. Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Res.* 2003;63(20):6602-6606.
5. Von Harsdorf R. Can cardiomyocytes divide? *Heart.* 2001;86(5):481-482.
6. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998;82(11):1111-1129.
7. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-257.
8. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):3-15.
9. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(2):277-287.
10. Kang PM, Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):177-182.
11. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995;267(5203):1445-1449.

12. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest.* 2003;111(10):1457-1459.
13. Li Q, Li B, Wang X, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 1997;100(8):1991-1999.
14. Yamashita K, Kajstura J, Discher DJ, et al. Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1. *Circ Res.* 2001;88(6):609-614.
15. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(9):6252-6256.
16. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation.* 1998;97(3):276-281.
17. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305(5684):626-629.
18. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* 2003;93(4):292-301.
19. Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem.* 1998;273(26):16589-16594.
20. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 1998;273(5):2926-2930.
21. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science.* 1999;283(5401):543-546.

22. Tschopp J, Martinon F, Hofmann K. Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol.* 1999;9(10):R381-384.
23. Daniel PT. *Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren.* Berlin: Habilitationsschrift, Humboldt-Universität zu BerlinHumboldt-Universität zu; 2002.
24. Adamopoulos S, Parissis JT, Georgiadis M, et al. Growth hormone administration reduces circulating proinflammatory cytokines and soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2002;144(2):359-364.
25. Li Y, Takemura G, Kosai K, et al. Critical roles for the Fas/Fas ligand system in postinfarction ventricular remodeling and heart failure. *Circ Res.* 2004;95(6):627-636.
26. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med.* 1998;187(8):1261-1271.
27. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* 2006;13(8):1378-1386.
28. Rosse T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature.* 1998;391(6666):496-499.
29. 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(5):H2313-2320.
30. van Delft MF, Huang DC. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res.* 2006;16(2):203-213.
31. Pines J. Cell cycle. Checkpoint on the nuclear frontier. *Nature.*

- 1999;397(6715):104-105.
32. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 2004;116(2):221-234.
 33. Pucci B, Giordano A. Cell cycle and cancer. *Clin Ter*. 1999;150(2):135-141.
 34. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995;374(6518):131-134.
 35. Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*. 1999;97(4):431-434.
 36. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 2004;18(22):2699-2711.
 37. Harper JW. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv*. 1997;29:91-107.
 38. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13(12):1501-1512.
 39. Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10699-10704.
 40. Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2000;2(4):E65-67.
 41. Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(1):11-20.
 42. Lin J, Reichner C, Wu X, Levine AJ. Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol*. 1996;16(4):1786-1793.
 43. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by

- interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997;11(16):2090-2100.
44. Balbin M, Hannon GJ, Pendas AM, et al. Functional analysis of a p21WAF1,CIP1,SDI1 mutant (Arg94 --> Trp) identified in a human breast carcinoma. Evidence that the mutation impairs the ability of p21 to inhibit cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 1996;271(26):15782-15786.
 45. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 1997;11(7):847-862.
 46. Cheng M, Olivier P, Diehl JA, et al. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J.* 1999;18(6):1571-1583.
 47. Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J. Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell.* 1996;87(2):297-306.
 48. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature.* 1994;369(6481):574-578.
 49. Jin YH, Yoo KJ, Lee YH, Lee SK. Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J Biol Chem.* 2000;275(39):30256-30263.
 50. von Harsdorf R, Hauck L, Mehrhof F, Wegenka U, Cardoso MC, Dietz R. E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21CIP1 and p27KIP1 and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of insulin-like growth factor I. *Circ Res.* 1999;85(2):128-136.
 51. Bergeron L, Yuan J. Sealing one's fate: control of cell death in neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 1998;8(1):55-63.

-
52. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 1992;69(1):119-128.
 53. Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*. 1996;382(6591):511-517.
 54. Muller H, Bracken AP, Vernell R, et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*. 2001;15(3):267-285.
 55. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-348.
 56. Gorospe M, Wang X, Guyton KZ, Holbrook NJ. Protective role of p21(Waf1/Cip1) against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 1996;16(12):6654-6660.
 57. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*. 2003;13(2):65-70.
 58. el-Deiry WS. p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998;227:121-137.
 59. Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC, Holbrook NJ. p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*. 1997;14(8):929-935.
 60. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998;282(5393):1497-1501.
 61. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*. 1999;402(6759):309-313.
 62. Levkau B, Koyama H, Raines EW, et al. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1

- mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell*. 1998;1(4):553-563.
63. Adachi S, Ito H, Tamamori-Adachi M, et al. Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2001;88(4):408-414.
64. Harvey KJ, Lukovic D, Ucker DS. Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events. *J Cell Biol*. 2000;148(1):59-72.
65. Suzuki A, Tsutomi Y, Yamamoto N, Shibutani T, Akahane K. Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol*. 1999;19(5):3842-3847.
66. Xu SQ, El-Deiry WS. p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269(1):179-190.
67. Asada M, Yamada T, Ichijo H, et al. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J*. 1999;18(5):1223-1234.
68. Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation*. 2009;119(1):99-106.
69. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res*. 2002;62(16):4592-4598.
70. Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. 1988;55(6):1179-1188.
71. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human

- immunodeficiency virus. *Cell*. 1988;55(6):1189-1193.
72. Fawell S, Seery J, Daikh Y, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2):664-668.
73. Schwarze SR, Dowdy SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(2):45-48.
74. 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(5433):1569-1572.
75. Wadia JS, Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(4):579-596.
76. Torchilin VP, Levchenko TS. TAT-liposomes: a novel intracellular drug carrier. *Curr Protein Pept Sci*. 2003;4(2):133-140.
77. Eguchi A, Akuta T, Okuyama H, et al. Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J Biol Chem*. 2001;276(28):26204-26210.
78. Sawant RM, Hurley JP, Salmaso S, et al. "SMART" drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjug Chem*. 2006;17(4):943-949.
79. Snyder EL, Meade BR, Dowdy SF. Anti-cancer protein transduction strategies: reconstitution of p27 tumor suppressor function. *J Control Release*. 2003;91(1-2):45-51.
80. Kilic E, Dietz GP, Hermann DM, Bahr M. Intravenous TAT-Bcl-XI is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Ann Neurol*. 2002;52(5):617-622.

81. Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem.* 1997;272(25):16010-16017.
82. Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell.* 1997;88(2):223-233.
83. An J. *Protein transduction of p21CIP1 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice.* Berlin: Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie der Medizinischen Fakultät der Charité Universitätsmedizin Berlin; 2006.
84. Toko H, Oka T, Zou Y, et al. Angiotensin II type 1a receptor mediates doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Hypertens Res.* 2002;25(4):597-603.
85. Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, Kubota I. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. *Circulation.* 2004;110(18):2869-2874.
86. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail.* 2008;10(10):933-989.
87. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, et al. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation.* 2006;114(23):2474-2481.
88. Pasumarthi KB, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res.* 2002;90(10):1044-1054.
89. Sorriento D, Campanile A, Santulli G, et al. A new synthetic protein, TAT-RH, inhibits tumor growth through the regulation of NFkappaB activity. *Mol Cancer.*

2009;8:97.

90. Cao G, Pei W, Ge H, et al. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci.* 2002;22(13):5423-5431.
91. Gustafsson AB, Sayen MR, Williams SD, Crow MT, Gottlieb RA. TAT protein transduction into isolated perfused hearts: TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain is cardioprotective. *Circulation.* 2002;106(6):735-739.
92. Li L, Takemura G, Li Y, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation.* 2006;113(4):535-543.
93. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997;336(16):1131-1141.
94. Narula J, Haider N, Virmani R, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996;335(16):1182-1189.
95. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(18):6975-6980.
96. Liu X, Chua CC, Gao J, et al. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(3):H933-939.
97. Li K, Sung RY, Huang WZ, et al. Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Circulation.* 2006;113(18):2211-2220.
98. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119(3):493-501.

-
99. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45(3):528-537.
 100. Eastman A, Barry MA. The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest.* 1992;10(3):229-240.
 101. Kanoh M, Takemura G, Misao J, et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation.* 1999;99(21):2757-2764.
 102. Narula J, Arbustini E, Chandrashekhar Y, Schwaiger M. Apoptosis and the systolic dysfunction in congestive heart failure. Story of apoptosis interruptus and zombie myocytes. *Cardiol Clin.* 2001;19(1):113-126.
 103. Dorn GW, 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009;81(3):465-473.
 104. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2006;101(2):151-158.
 105. Kirchhoff SR, Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation.* 2002;105(24):2899-2904.
 106. Kirshenbaum LA, de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation.* 1997;96(5):1580-1585.
 107. Leri A, Liu Y, Malhotra A, et al. Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes. *Circulation.* 1998;97(2):194-203.
 108. Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med.* 1999;189(11):1815-1822.

109. Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21648-21652.
110. Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1:S71-83.
111. von Haehling S, Doehner W, Anker SD. Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2007;73(2):298-309.
112. Kim BO, Liu Y, Ruan Y, Xu ZC, Schantz L, He JJ. Neuropathologies in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 Tat protein under the regulation of the astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein promoter and doxycycline. *Am J Pathol.* 2003;162(5):1693-1707.
113. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation.* 2004;109(22):2749-2754.
114. Hequet O, Le QH, Moullet I, et al. Subclinical late cardiomyopathy after doxorubicin therapy for lymphoma in adults. *J Clin Oncol.* 2004;22(10):1864-1871.
115. Daugaard G, Lassen U, Bie P, et al. Natriuretic peptides in the monitoring of anthracycline induced reduction in left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2005;7(1):87-93.
116. Nousiainen T, Vanninen E, Jantunen E, et al. Natriuretic peptides during the development of doxorubicin-induced left ventricular diastolic dysfunction. *J Intern Med.* 2002;251(3):228-234.
117. Sengenès C, Bouloumie A, Hauner H, et al. Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(49):48617-48626.

Erklärung an Eides Statt

Ich, Marek Tadeusz Nowak, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Untersuchung des antiapoptotischen Effekts von TAT-p21 bei der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie in der Maus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Curriculum Vitae

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

Teile dieser Arbeit sind in die folgende Publikation eingegangen:

Nowak MT, An JF, Hauck L, Donath S, von Harsdorf R; TAT-p21 inhibits doxorubicin-induced apoptosis of cardiomyocytes by interactions with CDK and Caspase-3.

Hypertension 2006;48;763 (Abstracts From the 11th Annual Meeting of the ECCR)

Erstautorenschaft Originalarbeiten

Eitel I, **Nowak M**, Stehl C, Adams V, Fuernau G, Hildebrand L, Desch S, Schuler G, Thiele H. Endothelin-1 release in acute myocardial infarction as a predictor of long-term prognosis and no-reflow assessed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Am Heart J.* 2010 May;159(5):882-90.

Zweitautorenschaft Originalarbeiten

Thiele H, Hildebrand L, Schirdewahn C, Eitel I, Adams V, Fuernau G, Erbs S, Linke A, Diederich KW, **Nowak M**, Desch S, Gutberlet M, Schuler G. Impact of high-dose N-acetylcysteine versus placebo on contrast-induced nephropathy and myocardial reperfusion injury in unselected patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. The LIPSIA-N-ACC (Prospective, Single-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Leipzig Immediate Percutaneous Coronary Intervention Acute Myocardial Infarction N-ACC) Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2010 May 18;55(20):2201-9.

Fal AM, Nowak AA, **Nowak MT**, Litwa M. Use of selected parameters of nasal lavage fluid in asthma severity monitoring; *Pneumonol Alergol Pol.* 2004;72(9-10):375-82.

Fal AM, Nowak AA, **Nowak MT**, Malolepszy J. Mechanisms regulating tissue eosinophilia in bronchial asthma: focus on apoptosis; *Pneumonol Alergol Pol.* 2003;71(5-6):281-7.

Fal AM, Nowak AA, **Nowak MT**, Malolepszy J. Programmed cell death and its role in diseases pathogenesis; *Pol Arch Med Wewn.* 2003;Jan;109(1):71-8.