

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

(Direktor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen)

## **Effekt kleinmolekularer Tyrosinkinase-Inhibitoren auf künstliches Herzgewebe**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von

Fabian Johannes Jacob  
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg, 2013

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. T. Eschenhagen**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. N. Kröger**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. W. Fiedler**

**Tag der Disputation: 04.11.2013**

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

|         |                                                                      |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | Einleitung                                                           | 1  |
| 1.1     | Das Herz                                                             | 1  |
| 1.2     | Kardiale Erkrankungen                                                | 1  |
| 1.2.1   | Herzinsuffizienz                                                     | 1  |
| 1.2.2   | Koronare Herzerkrankung                                              | 2  |
| 1.2.3   | Arterielle Hypertonie                                                | 3  |
| 1.2.4   | Long-QT-syndrome                                                     | 3  |
| 1.3     | Kardiales Tissue Engineering                                         | 3  |
| 1.4     | Tyrosinkinase-Inhibitoren                                            | 5  |
| 1.4.1   | Grundlagen der Tyrosinkinase-Inhibitoren                             | 5  |
| 1.4.2   | Ein Exkurs zu den untersuchten TKIs                                  | 12 |
| 1.4.2.1 | Imatinib                                                             | 12 |
| 1.4.2.2 | Dasatinib                                                            | 13 |
| 1.4.2.3 | Lapatinib                                                            | 15 |
| 1.4.2.4 | EGFR-Inhibitoren                                                     | 16 |
| 1.4.2.5 | Multi-TKIs                                                           | 17 |
| 1.4.2.6 | Vandetanib                                                           | 21 |
| 1.4.2.7 | Lestaurtinib                                                         | 21 |
| 1.5     | Zielsetzung                                                          | 23 |
| 2       | Material und Methoden                                                | 24 |
| 2.1     | Material                                                             | 24 |
| 2.2     | Methoden                                                             | 24 |
| 2.2.1   | Versuchstierhaltung                                                  | 24 |
| 2.2.2   | Methoden der Zellkultur                                              | 24 |
| 2.2.2.1 | Organentnahme zur Präparation von neonatalen Rattenherzzellen        | 24 |
| 2.2.2.2 | Enzymatischer Gewebeaufschluss der Herzen                            | 24 |
| 2.2.2.3 | Herstellung von Hühnerembryonenextrakt                               | 26 |
| 2.2.2.4 | Herstellung von Fibrin-basierten mini-EHTs (FBMEs) im 24-Well Format | 27 |
| 2.2.2.5 | Messprotokoll                                                        | 29 |

---

|         |                                                                                |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.3   | Video-optische Methoden zur Bestimmung der Kraftentwicklung in FBMEs           | 32 |
| 2.2.4   | Histologische Analysen                                                         | 35 |
| 2.2.4.1 | Paraffineinbettung von FBMEs zur Herstellung von Mikrotomschnitten             | 35 |
| 2.2.4.2 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung der FBMEs                                            | 36 |
| 2.2.4.3 | Immunhistochemische Färbung des sarkomerischen Actin und Connexin-43 der FBMEs | 37 |
| 2.2.5   | Klinische Chemie                                                               | 38 |
| 2.2.6   | Westernblot-Verfahren                                                          | 38 |
| 2.2.6.1 | Gewebepräparation für Westernblot-Analysen                                     | 38 |
| 2.2.6.2 | Durchführung des Westernblots                                                  | 39 |
| 2.2.7   | Elektronenmikroskopische Aufnahmen von FBMEs                                   | 41 |
| 2.2.8   | Statistische Auswertung                                                        | 42 |
| 3       | Ergebnisse                                                                     | 43 |
| 3.1     | Kontraktionsparameter                                                          | 43 |
| 3.1.1   | TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung                                        | 44 |
| 3.1.2   | TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung                             | 44 |
| 3.1.3   | TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung                                  | 46 |
| 3.1.4   | Reversibilität der Kontraktionskraftverminderung                               | 49 |
| 3.1.4.1 | TKIs mit irreversibler Kontraktionskraftverminderung                           | 49 |
| 3.1.4.2 | TKIs mit reversibler Kontraktionskraftverminderung                             | 50 |
| 3.1.4.3 | Unterschiede zwischen den Vehikelkontrollen                                    | 52 |
| 3.1.5   | Kontraktions- und Relaxationszeit                                              | 52 |
| 3.1.5.1 | Veränderungen der Kontraktions- und Relaxationszeit                            | 53 |
| 3.1.5.2 | Reversibilität der Veränderungen der Relaxationszeit                           | 53 |
| 3.2     | Histologie                                                                     | 55 |
| 3.2.1   | Hämatoxylin-Eosin-Färbung                                                      | 55 |
| 3.2.1.1 | Histologische Analyse der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung              | 56 |
| 3.2.1.2 | Histologische Analyse der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung   | 56 |
| 3.2.1.3 | Histologische Analyse der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung        | 56 |

---

|         |                                                                                                        |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2   | Immunhistochemische Färbung gegen sarkomerisches Actin                                                 | 57 |
| 3.2.2.1 | Histologische Analyse der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung                                      | 58 |
| 3.2.2.2 | Histologische Analyse der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung                           | 58 |
| 3.2.2.3 | Histologische Analyse der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung                                | 58 |
| 3.2.3   | Immunhistochemische Färbung gegen Connexin-43                                                          | 60 |
| 3.2.3.1 | Histologische Analyse der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung                                      | 60 |
| 3.2.3.2 | Histologische Analyse der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung                           | 60 |
| 3.2.3.3 | Histologische Analyse der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung                                | 60 |
| 3.3     | Klinische Chemie                                                                                       | 62 |
| 3.3.1   | Klinisch chemische Analyse der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung                                 | 62 |
| 3.3.2   | Klinisch chemische Analyse der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung                      | 63 |
| 3.3.3   | Klinisch chemische Analyse der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung                           | 64 |
| 3.4     | Westernblot                                                                                            | 66 |
| 3.4.1   | Pathscan Antikörper-Cocktail                                                                           | 66 |
| 3.4.2   | p38 MAPK                                                                                               | 69 |
| 3.4.3   | LC3-II-/LC3-I-Westernblot                                                                              | 70 |
| 3.5     | Elektronenmikroskopie                                                                                  | 71 |
| 3.5.1   | Kriterien der elektronenmikroskopischen Beurteilung                                                    | 71 |
| 3.5.2   | Zusammenfassung der elektronenmikroskopischen Beurteilung                                              | 74 |
| 4       | Diskussion                                                                                             | 76 |
| 4.1     | TKIs und Kardiotoxizität                                                                               | 76 |
| 4.2     | Korrelation der klinischen Kardiotoxizität (LVDF) und den Ergebnissen der in vitro Screening-Plattform | 77 |
| 4.2.1   | Kontraktilität                                                                                         | 78 |

---

|       |                                                                         |     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.2 | Beurteilung der histologischen und elektronenmikroskopischen Ergebnisse | 80  |
| 4.2.3 | Beurteilung der Autophagie                                              | 82  |
| 4.2.4 | Fazit                                                                   | 83  |
| 4.3   | Der Vergleich mit anderen in vitro und in vivo Modellen                 | 84  |
| 4.4   | Ausblick                                                                | 87  |
| 5     | Zusammenfassung                                                         | 88  |
| 6     | Summary                                                                 | 90  |
| 7     | Literaturverzeichnis                                                    | 91  |
| 8     | Danksagung                                                              | 109 |
| 9     | Anhang                                                                  | 111 |
| 9.1   | Abkürzungsverzeichnis und SI-Einheiten                                  | 111 |
| 9.2   | Material                                                                | 115 |
| 9.3   | Geräte                                                                  | 116 |
| 9.4   | TKIs und Antikörper                                                     | 118 |
| 9.5   | Lebenslauf                                                              | 119 |
| 10    | Eidesstattliche Versicherung                                            | 121 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Herz

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, welches für die Aufrechterhaltung des Blutflusses sowohl im Lungen- als auch im Körperkreislauf verantwortlich ist. Durch ein Septum teilt sich das Herz in eine linke, den Körperkreislauf, und in eine rechte, den Lungenkreislauf versorgende Hälfte. Die Klappenebene trennt die beiden Vorhöfe (Atriae) von den beiden Kammern (Ventrikel). Zur Aufrechterhaltung des für den Lungen- und Körperkreislauf benötigten Blutdrucks ist die koordinierte Kontraktion des Herzens erforderlich. Diese wird unter physiologischen Bedingungen von zu Schrittmacherzellen differenzierten Kardiomyozyten des Sinusknotens übernommen. Über den venösen Zustrom aus den beiden großen Hohl- und den Pulmonalvenen füllt das Blut aus beiden Kreisläufen die Atriae (Diastole). Von dort gelangt es durch die Vorhofkontraktion über die Trikuspidal- bzw. Mitralklappe in den rechten bzw. linken Ventrikel und füllt diesen mit Blut (Systole). Die Weiterleitung der Erregung über den atrioventrikulären Knoten sowie das His-Purkinje-System ins Arbeitsmyokard bedingt die sich an die Diastole anschließende Kontraktion des Kammermyokards. In der Austreibungsphase wird das Blut zum einen für die Oxygenierung über die Pulmonalklappe in den Lungenkreislauf befördert, zum anderen gelangt es über die Aortenklappe in den Körperkreislauf.

## 1.2 Kardiale Erkrankungen

### 1.2.1 Herzinsuffizienz

Die Weltgesundheitsorganisation definiert die Herzinsuffizienz als eine verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund ventrikulärer Funktionsstörungen. Der Insuffizienz des Herzens liegt dabei entweder eine diastolische oder eine systolische Dysfunktion zugrunde. Sie kann akut beispielsweise in Folge eines Myokardinfarktes oder chronisch bei der koronaren Herzkrankheit, der Hypertonie oder einem Klappenvitium auftreten. Die Stadien der Herzinsuffizienz werden von der *New York Heart Association* (NYHA) eingeteilt, wobei Stadium I einer Beschwerdefreiheit unter normaler körperlicher Belastung und Stadium IV Beschwerden in Ruhe bedeutet. Neuroendokrine Kompensationsmechanismen sind dafür verantwortlich, dass die funktionale Kapazität des Herzens noch über Jahre stabil bleiben kann. Früher oder

später kommt es jedoch zur Dekompensation bzw. zur symptomatischen Herzinsuffizienz, welche von einer gesteigerten Aktivierung der neuroendokrinen Kompensationsmechanismen begleitet wird. Hierdurch kommt es zu einem linksventrikulären Remodeling, welches unter anderem eine myozytäre Volumenzunahme (Hypertrophie), den Verlust an Myozyten und eine Veränderung der kontraktilen Eigenschaften der Myozyten beinhaltet.

### **1.2.2 Koronare Herzerkrankung**

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist in der entwickelten Welt für mehr Todesfälle und Folgeerkrankungen verantwortlich als jede andere Krankheit. Meist bedingt durch atherosklerotische Veränderungen der epikardialen Koronararterien kommt es zu einem Ungleichgewicht von Sauerstoffangebot und -bedarf, bedingt durch einen verminderten Blutfluss. Die KHK manifestiert sich als stabiles Brustengegefühl (Angina pectoris), als akutes Koronarsyndrom oder als plötzlicher Herztod. Die stabile Angina pectoris ist Folge einer vorübergehenden Myokardischämie, die reproduzierbar unter körperlicher Anstrengung oder emotionalem Stress auftreten kann. Die Beschwerden sind nicht progredient und bilden sich in Ruhe oder unter Gabe von Nitraten innerhalb kurzer Zeit zurück. Zum akuten Koronarsyndrom zählen die instabile Angina pectoris (Erstmanifestation hoher Intensität, Auftreten in Ruhe und zunehmende Stärke der Beschwerden), der Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt (NSTEMI, instabile Angina pectoris mit Anstieg von kardialen Markern eines Zellschadens) und der ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt (STEMI, wie NSTEMI mit zusätzlicher ST-Streckenelevation). Häufigste Ursache eines Herzinfarktes ist der Koronararterienverschluss durch Thrombusbildung nach atherosklerotischer Plaqueruptur. Seltener ist der Auslöser ein mit dem Blutstrom eingeschwemmter Thrombus (Koronarembolien) oder ein Koronararterienspasmus. Die Myokardischämie führt zum Zelluntergang (Nekrose), der das Risiko für Herzrhythmusstörungen oder die Entwicklung einer Herzinsuffizienz steigert.

### 1.2.3 Arterielle Hypertonie

Die *European Society of Hypertension* (ESH) definiert einen Hypertonus durch Blutdruckwerte über 140 mmHg systolisch bzw. 90 mmHg diastolisch. In 90% liegt ein essentieller Hypertonus vor, dessen Ursache unklar ist. 10% der Fälle sind durch eine andere Grunderkrankung (z.B. Nierenarterienstenose) bedingt und werden als sekundäre Hypertonie bezeichnet. Sie ist die Folge eines erhöhten Herzzeitvolumens und/oder eines erhöhten peripheren Widerstandes in den Gefäßen. Die häufigste Todesursache der Patienten mit arterieller Hypertonie stellt die hypertensive Herzkrankheit dar.

### 1.2.4 Long-QT-syndrome

Beim *long-QT-syndrome* (LQTS) kommt es zur Verlängerung der frequenz-korrigierten QT-Zeit (QTc) in der Elektrokardiographie (EKG). Ein LQTS liegt bei einer QTc-Zeit >440 ms vor. Die angeborenen Formen zeigen entweder einen vermehrten Natrium- oder Kalziumeinstrom oder einen verminderten Kaliumausstrom aus den Kardiomyozyten. Die verlängerte Dauer der Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials (Repolarisation) erhöht das Risiko für Kammerflimmern vom Spitzenumkehrtyp (*Torsades de pointes*, Tdp) durch frühe Nachdepolarisation. In 99% der Fälle sind hierfür die Mutationen der Allele LQT1, LQT2 und LQT3 verantwortlich. Ein erworbenes LQTS ist meistens medikamentenassoziiert (Dietel et al. 2009).

## 1.3 Kardiales Tissue Engineering

Als *Tissue Engineering* wird die künstliche Herstellung von gewebeähnlichen dreidimensionalen Strukturen bezeichnet. Ein wichtiges langfristiges Ziel dieser Forschungsrichtung ist die Herstellung von Ersatzgeweben zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen. Dieses könnte bei Herzerkrankungen eine große Rolle spielen, da sie zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen<sup>1</sup> und Kardiomyozyten als post-mitotische Zellen keine Regenerationsfähigkeit aufweisen. Die Herstellung der dreidimensionalen Herzgewebe aus isolierten Zellen lässt sich grob in drei unterschiedliche Verfahren einteilen:

- (i) Bei *scaffolds* handelt es sich um Gerüststrukturen aus unterschiedlichsten Materialien, die zellularisiert werden (Carrier et al. 1999).
- (ii) Hydrogele sind zunächst flüssige Matrices, die nach Zugabe der Zellen in einen gelförmigen Zustand übergehen und den Zellen somit als Gerüst dienen. Zu nennen sind hier vor allem Materialien wie Kollagen I, Matrigel (Eschenhagen et al. 1997; Zimmermann et al. 2002), Fibrin, Fibronectin und deren Derivate (Huang et al. 2007; Bian et al. 2009; Shapira-Schweitzer et al. 2009).
- (iii) Bildung dreidimensionaler Gewebe durch Stapelung mehrerer *Zellmonolayer* (Shimizu et al. 2002).

Neben dem Einsatz zur Reparation von degenerativen Erkrankungen könnten dreidimensionalen Gewebe als *in vitro Screening*-Plattform für präklinische Medikamentenuntersuchung dienen. Mittels solcher präklinischer Modelle könnte eine Optimierung der klinischen Sicherheit und somit eine Minimierung unerwünschter Arzneimittelwirkungen erreicht werden. Die Aussagefähigkeit eines solchen Systems ist zum einen von dem standardisierten und automatisierten Versuchsaufbau, zum anderen vom Ursprung der für das Testverfahren verwendeten Zellen abhängig. Mit Hilfe des von Hansen et al. (2010) entwickelten video-optischen Messsystems und einer Hydrogelmethode auf Fibrinbasis (siehe 2.2.2.4 und 2.2.3) ist es möglich, eine hohe Stückzahl der Fibrin-basierten-mini-EHTs (FBMEs) unter sterilen Bedingungen über einen längeren Zeitraum zu beobachten und automatisiert auszuwerten. FBMEs lassen sich aus unterschiedlichen Zellpopulationen herstellen, zum Beispiel aus neonatalen Maus- und Rattenkardiomyozyten, Kardiomyozyten aus humanen embryonalen (hES-Zellen) oder induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen). Hier ist es für die Untersuchung von proarrhythmischer Toxizität von großer Bedeutung, humane Kardiomyozyten zu verwenden, da die Ursache hierfür häufig eine Hemmung von repolarisierenden Kaliumkanälen ist und es hier große Unterschiede zwischen den Spezies gibt (Nerbonne & Kass 2005). Für die Beurteilung anderer Kardiotoxizitäten z.B. durch Antrazykline (z.B. Doxorubicin) oder Anthracendione (z.B. Mitoxantron) könnten auch FBMEs aus anderen Spezies eine größere Rolle spielen.

## 1.4 Tyrosinkinase-Inhibitoren

### 1.4.1 Grundlagen der Tyrosinkinase-Inhibitoren

Unter den insgesamt 518 Kinasen des humanen Kinoms befinden sich 90 Tyrosinkinasen (Karaman et al. 2008). Im Zuge des wissenschaftlichen Fortschritts der letzten Jahre wurde die Bedeutung dieser Kinasen für die maligne Transformation von Tumorzellen beschrieben (Krause & Van Etten 2005) und nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (insgesamt 58 Kinasen, z.B.: *Rat sarcoma*, Ras; *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*, ABL1) oder Rezeptor-Tyrosinkinasen (insgesamt 32 Kinasen, z.B.: *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR; *epidermal growth factor receptor*, EGFR; Krause & Van Etten 2005) als Protoonkogene identifiziert. Hieraus entwickelte sich das pharmakologische Konzept der anti-Tumorthherapie durch Inhibition dieser Tyrosinkinasen. Unterschieden werden humane monoklonale Antikörper gegen den Rezeptor der Tyrosinkinase und klein-molekulare-Inhibitoren der Tyrosinkinasen (Krause & Van Etten 2005). Der erste und gleichzeitig erfolgreichste TKI ist Imatinib (Glivec®), welcher 2001 zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zugelassen wurde. Imatinib hemmt kompetitiv das Genprodukt des Philadelphia-Chromosoms. Insbesondere für die CML bewirkt es eine substanzielle Verbesserung der Prognose von einer letalen Krankheit hin zu einer chronischen, behandelbaren Erkrankung. Mittlerweile hat sich dieser Ansatz der Krebstherapie zu einem äußerst vielversprechendem weiterentwickelt, sodass 20% des Gesamtetats der Medikamentenentwicklung in diesem Bereich investiert wird (Cheng & Force 2010). 2008 befanden sich ca. 600 Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) in der Entwicklung und die bereits zugelassenen TKIs erzielten Umsätze in Höhe von 4 Mrd. Dollar im Zeitraum von 2005 bis 2006 (Norman 2007). 2011 waren 14 TKIs von der *US Food and Drug Administration* (FDA) und 13 von der *European Medicines Agency* (EMA) zugelassen<sup>2</sup> (Cheng & Force 2010). In Tabelle 1 sind neun klein-molekulare TKIs dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

| TKI                      | Zulassung  | C <sub>max</sub>                   | On-targets                                            | Indikation                         |
|--------------------------|------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Imatinib<br>(Gleevec®)   | 2001       | 5,9 µM<br>(Peng et al. 2004)       | ABL 1/2, c-Kit,<br>PDGFR-α/β                          | CML, GIST, B-ALL, CMML, CEL        |
| Gefitinib<br>(Iressa®)   | 2003       | 0,23 µM<br>(Swaisland et al. 2005) | ErbB1 (EGFR)                                          | NSCLC                              |
| Erlotinib<br>(Tarceva®)  | 2004       | 3,1 µM<br>(Prados et al. 2006)     | ErbB1 (EGFR)                                          | NSCLC,<br>Pankreaskarzinom         |
| Sorafenib<br>(Nexavar®)  | 2005       | 8,4 µM<br>(Moore et al. 2005)      | C-Raf, B-Raf, FLT3,<br>VEGFR 1-3, c-Kit,<br>PDGFR-α/β | RCC,<br>Leberzellkarzinom          |
| Dasatinib<br>(Sprycel®)  | 2006       | 0,11 µM<br>(Demetri et al. 2009)   | ABL1/2, c-Kit,<br>PDGFR-α/β, SFK                      | CML                                |
| Sunitinib<br>(Sutent®)   | 2006       | 0,14 µM<br>(Faivre et al. 2006)    | VEGFR 1-3, c-Kit,<br>PDGFR-α/β, RET,<br>CSF1R, FLT3   | RCC, GIST                          |
| Lapatinib<br>(Tykerb®)   | 2007       | 1,5 µM<br>(Burris et al. 2009)     | ErbB1 (EGFR),<br>ErbB2 (HER2)                         | Brustkrebs<br>(HER2 <sup>+</sup> ) |
| Vandetanib<br>(Zactima®) | 2011 (FDA) | 2,16 µM<br>(De Boer et al. 2009)   | ErbB1 (EGFR),<br>VEGFR 2, RET                         | MTC                                |
| Lestaurtinib             | Phase II   | 27,5 µM<br>(Marshall et al. 2005)  | JAK2, FLT3, RET                                       |                                    |

**Tab. 1: Übersicht der untersuchten TKIs**

Die Tabelle gibt einen Überblick über Zulassungsjahr, Indikation, Zielstrukturen der Tumorthherapie (*targets*) sowie die maximale Plasmakonzentration im Menschen.

Legende: ABL1/2 (*abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1/2*), AMPK (*5' AMP-activated protein kinase*), B-ALL (*B-cell acute lymphoblastic leukaemia*), B-Raf (*B-rapidly growing fibrosarcoma*), c-Kit (Stammzellfaktor-Rezeptor), C-Raf (*C-rapidly growing fibrosarcoma*), CEL (*chronic eosinophilic leukaemia*) CML (*chronic myeloid leukaemia*), CMML (*chronic myelomonocytic leukaemia*), CSF1R (*colony-stimulating factor 1 receptor*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), ErbB2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2), ErbB4 (*human epidermal growth factor receptor 4*), FLT3 (*FMS-related tyrosine kinase 3*), GIST (*gastrointestinal stromal tumour*), JAK2 (Januskinase 2), MTC (*medullary thyroid cancer*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*), NSCLC (*non-small-cell lung cancer*), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), RCC (*renal cell carcinoma*), VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*; aus: Force & Kolaja (2011)).

Die TKIs entfalten ihr Wirkung durch Inhibition der Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungstasche (Cheng & Force 2010). Prinzipiell können drei Mechanismen der Inhibition unterschieden werden:

- (i) Typ I bindet nur an die aktive Konformation der hochkonservierten ATP-Bindungstasche und ist deshalb relativ unselektiv.
- (ii) Typ II bindet an die hochkonservierte ATP-Bindungstasche in der inaktiven Konformation.
- (iii) Typ III stellt einen allosterischen Modulator dar, der fern der ATP-Bindungstasche bindet und deshalb am selektivsten ist (Chen et al. 2008).

Durch die geringe Selektivität der Typ I-Inhibitoren werden zusätzliche Kinasen inhibiert (*off-target* Effekte), die nicht für die anti-Tumor-Wirkung, aber für unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) von großer Bedeutung sein könnten. Einen Überblick über *off-target* Effekte der meisten TKIs, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, bietet Karaman et al. (2008). Für die zukünftige Wirkstoffentwicklung wird es wichtig sein, zwischen *on-* bzw. *off-targets* zu differenzieren. Bei der pharmakokinetischen Charakterisierung der TKIs fallen die hohe Proteinbindung sowie das große Verteilungsvolumen der lipophilen Substanzen auf. Einen Überblick bietet Tabelle 2.

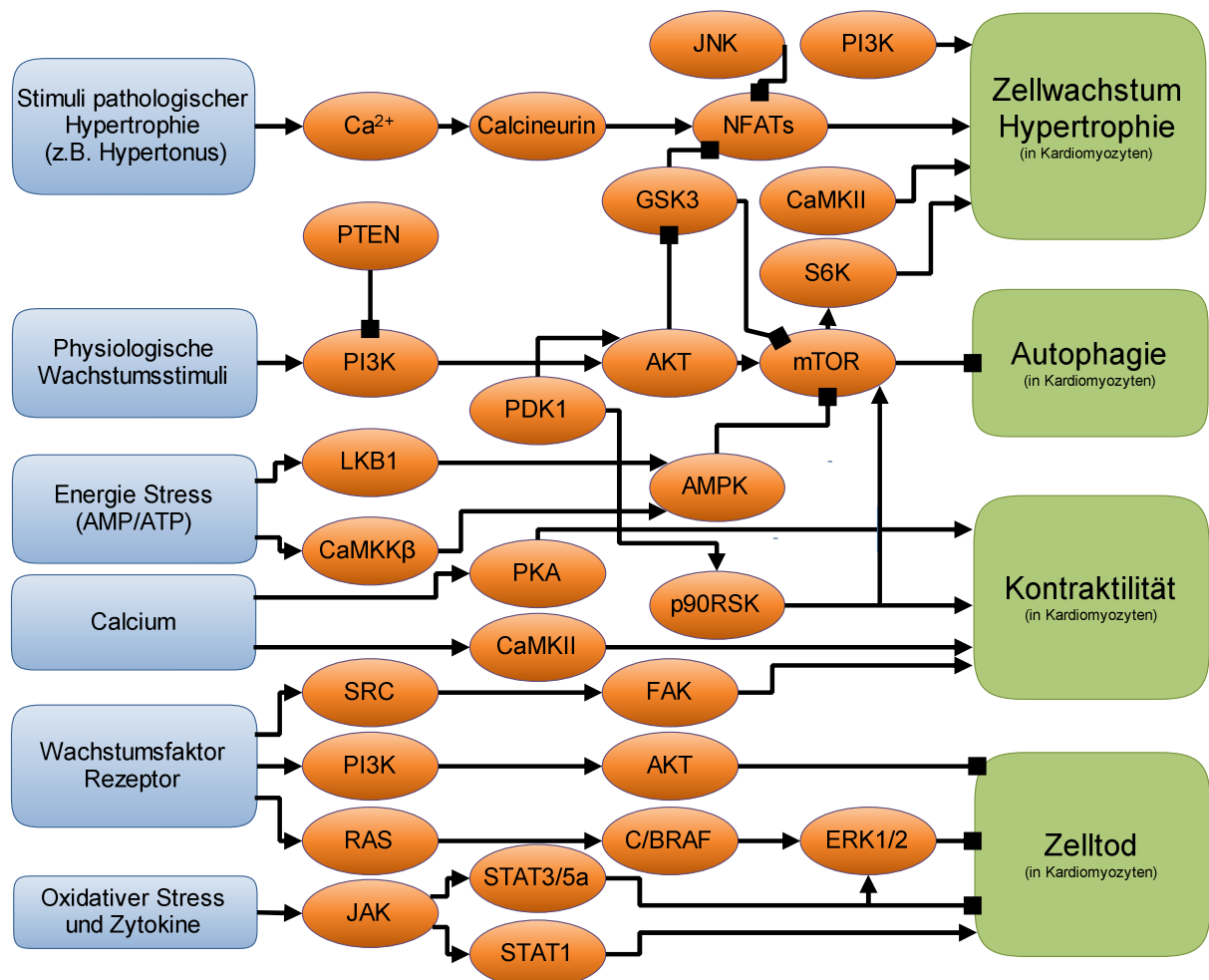
| TKI          | Vd (L)    | Proteinbindung (%) | t <sub>1/2</sub> |
|--------------|-----------|--------------------|------------------|
| Imatinib     | 295       | ~95                | 18 h             |
| Gefitinib    | 1400      | ~91                | 48 h             |
| Erlotinib    | 232       | ~93                | 36 h             |
| Sorafenib    | 108       | ~99,5              | 25-48 h          |
| Dasatinib    | 2505      | ~96                | 3-5 h            |
| Sunitinib    | 2230      | ~95                | 40-60 h          |
| Lapatinib    | >2200     | >99                | 24 h             |
| Vandetanib   | 7450      | ~90                | 10-12 d          |
| Lestaurtinib | Unbekannt | Hoch               | 6,8-9,2 h        |

**Tab. 2: Pharmakokinetik der TKIs**

Dargestellt ist das Verteilungsvolumen (Vd, *volume of distribution*) in Litern (L), die Proteinbindung in Prozent (%) und die Halbwertszeit (t<sub>1/2</sub>) in Stunden (h) bzw. Tagen (d). Für Lestaurtinib liegen bislang keine genaueren Daten vor (Van Erp et al. 2009; Levis et al. 2011; Mardjuadi et al. 2012).

TKIs sind in der Regel besser verträglich als konventionelle Chemotherapeutika (z.B. Anthrazykline, interkalierende Substanzen, Mitosehemmer, Antimetabolite). Allerdings wurden in der Dauertherapie diverse UAWs beschrieben, von denen die Kardiotoxizität einen besonderen Stellenwert einnimmt. Zu den kardialen UAWs der

TKIs zählen linksventrikuläre Dysfunktionen, Leitungsabnormalitäten, QT-Zeit-Veränderungen, das akute Koronarsyndrom, arterielle Thrombosen und Hypertonie (Chen et al. 2008). Aufgrund der unterschiedlichen Ausprägungen der kardialen Nebenwirkungen der einzelnen TKIs wird klar, dass es sich hierbei wahrscheinlich nicht um einen Klasseneffekt handelt, sondern um ein Kinase-spezifischen Mechanismus (Force et al. 2007). Die Erkenntnis über die Funktion der Signalkaskaden in Kardiomyozyten ist in den letzten Jahrzehnten deutlich vorangeschritten und umfasst viele zellbiologische Aspekte. Einen Überblick über diese Prozesse bietet Abbildung 1.



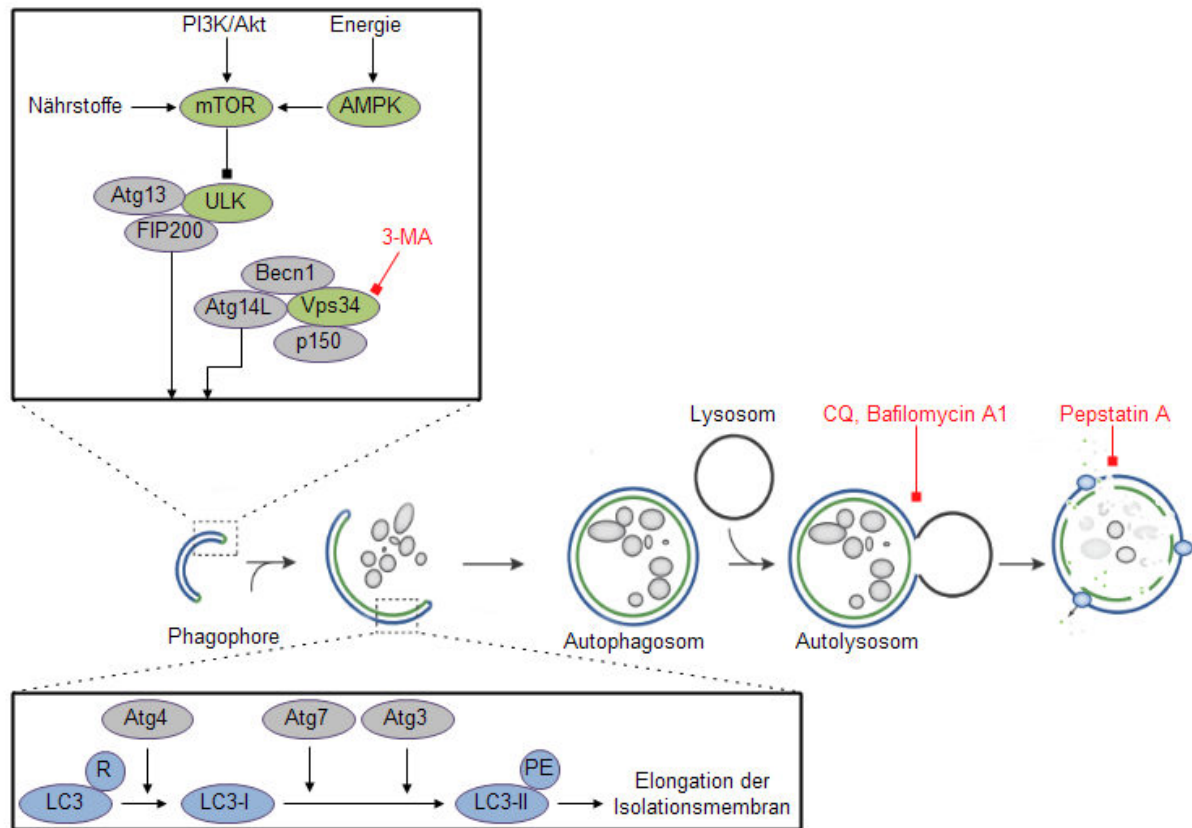
**Abb. 1: Übersicht wichtiger kardialer Signaltransduktionswege**

Vereinfacht dargestellt sind wichtige postulierte Signaltransduktionswege in Kardiomyozyten. Die Effekte (rechte Seite) sowie deren unterschiedliche Stimuli (linke Seite) sind ebenfalls aufgeführt.

Legende: AMP/ATP (Adenosinmono-/triphosphat), AMPK (5' AMP-activated protein kinase), CaMKII (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*), CaMKKβ (*Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase kinase β*), ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase 1/2*), FAK (*focal adhesion kinase*), GSK3 (*Glykogen Synthase Kinase 3*), JNK (*c-Jun N-terminale Kinase*), LKB1 (*Serin Threonin Kinase 11*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*), NFAT (*nuclear*

*factor of activated T-cells*), p90RSK (p90 ribosomale S6 Kinase), *PDK1* (pyruvat dehydrogenase kinase 1) PI3K  $\gamma$  (Phosphoinositid-3-Kinase  $\gamma$ ), PKA (Proteinkinase A), PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), S6K (S6 Kinase), STAT1, 3 und 5a (*signal transducers and activators of transcription 1, 3 and 5a*) aus: Kuramochi et al. (2006); Shahbazian et al. (2006); Barry et al. (2007); Anjum & Blenis (2008); Cuello et al. (2011); Force & Kolaja (2011).

Der Mechanismus, wie die Hemmung von Tyrosinkinasen zur Schädigung von Kardiomyozyten führt, ist nicht klar. Die Bedeutung der in Abbildung 1 genannten Signalwege für die Kardiomyozytenfunktion legt die Vermutung nahe, dass es zu einer Veränderung dieser Signalwege kommt (Eschenhagen et al. 2011). Zusätzlich wird eine Modulation von Autophagie als Mechanismus der Kardiotoxizität diskutiert. Die Autophagie stellt einen Recyclingmechanismus der Zelle dar, über den beschädigte Proteine und Organellen abgebaut werden und der Zelle wieder als Substrate zur Verfügung stehen. Dieser Prozess ist von großer Bedeutung bei allen Zelltypen mit hohem Energieverbrauch und in diesem Punkt haben postmitotische Kardiomyozyten und proliferierende maligne Zellen große Ähnlichkeit. Zusätzlich sind einige TKIs als Modulatoren der Autophagie beschrieben (Cheong et al. 2012). Man unterscheidet Chaperon-medierte Autophagie (CMA), Mikroautophagie und Makroautophagie (Dutta et al. 2012). Bei der CMA werden die markierten Proteine vom Hitzeschockprotein 70 (HSP 70) erkannt und ein direkter Transport in die Lysosomen vermittelt (Kaushik & Cuervo 2012). Ebenso selektiv werden bei der Mikroautophagie fehlgefaltete ubiquinierte Proteine erkannt, die kleine lösliche Aggregate bilden, die direkt lysosomal abgebaut werden. Die Makroautophagie ist ein unspezifischer Mechanismus, der z.B. durch Nährstoffmangel, bakterielle oder virale Infektionen, Hypoxie, Energiemangel, ER-Stress und Medikamente induziert werden kann (Abb. 2; Mizushima et al. 2010). Dieser Prozess wird eingeleitet durch die mTOR-abhängige Bildung von Phagophoren. Die mTOR-Aktivität wiederum wird beeinflusst von Nährstoffzufuhr und Energiebilanz. Die Weiterentwicklung der Phagophoren erfordert die Umwandlung der Vorstufe des *Microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3) über LC3-I (18 kDa) zu LC3-II (16kDa). Dieser Prozess kann anhand des unterschiedlichen Laufverhaltens im Westernblot für die Analyse der Autophagie genutzt werden. Im weiteren Verlauf der Autophagie kommt es zur Fusion mit Lysosomen (Autophagolysosomen) und zur Degradation, wobei LC3 abgebaut wird. Diese Prozesse können unter anderem durch Bafilomycin A1, Chloroquin (CQ) und Pepstatin A inhibiert werden.

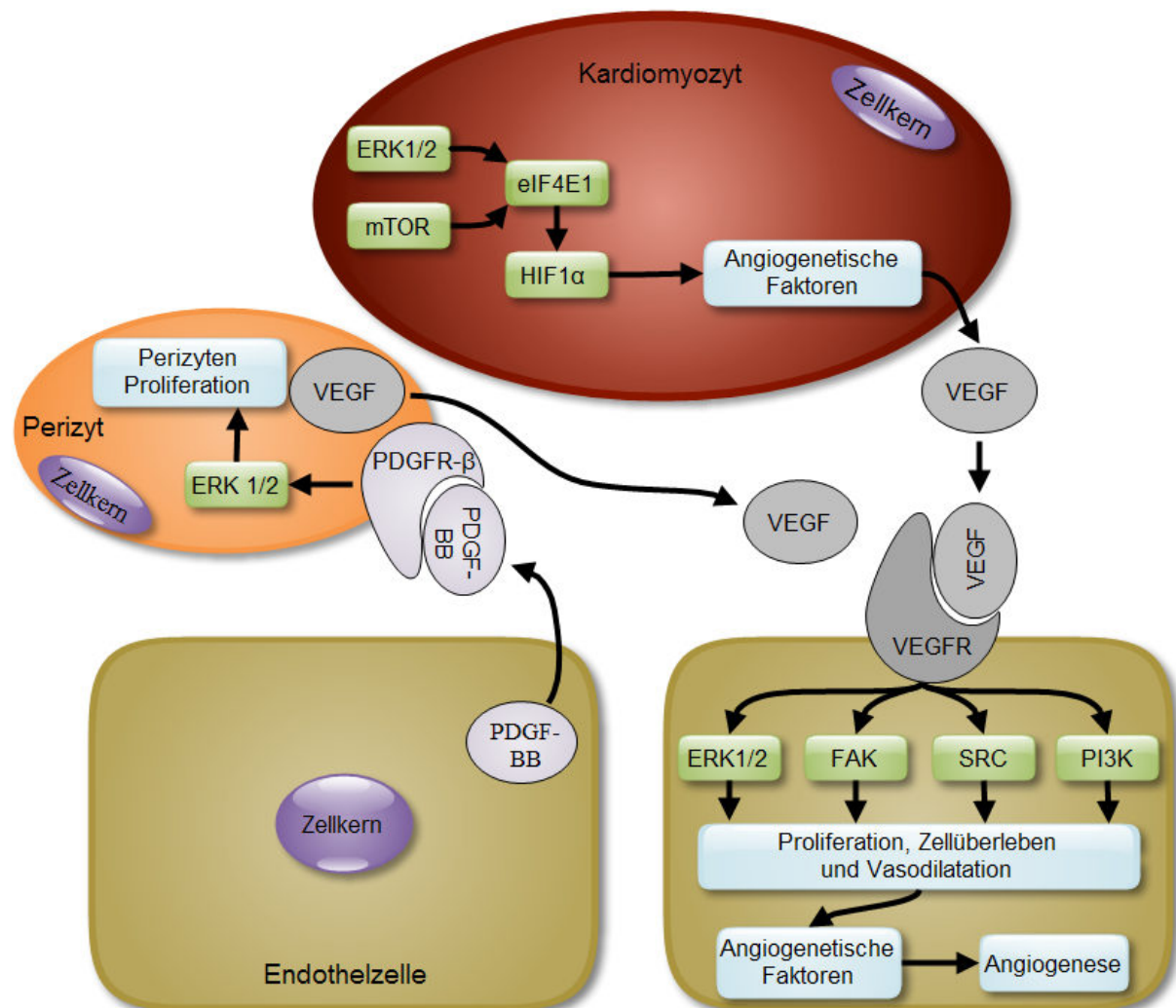


**Abb. 2: Darstellung der Makroautophagie von der Nukleation bis zum Autolysosom**

Wachstumsfaktoren und Veränderungen der Energie-Homöostase regulieren mTor-abhängig die Autophagie. Dabei spielt der ULK/Atg13/FIP200-Komplex (ULK, *mammalian Atg1 homologues UNC-51-like kinase*; Atg1, *Autophagy-related protein 13*; FIP200, *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*) sowie der Vps34/p150/Becn1/Atg14L-Komplex (Vps34/p150, Klasse III PI3K/p150-Untereinheit; Becn1, Beclin-1), der wiederum durch 3-Methyladenin (3-MA) inhibiert werden kann, eine entscheidende Rolle. Schlüsselenzyme der Autophagie sind in Grün, Inhibitoren in Rot, für den Westernblot relevante Proteine in Blau dargestellt; LC3 mit Arginin am C-Terminus (LC3R), Phosphatidylethanolamine (PE), aus Cheong et al. (2012).

Ein möglicher Mechanismus für eine indirekte Kardiotoxizität von TKIs ist die Hemmung der Angiogenese durch Hemmung von VEGF- und PDGF-Rezeptoren. In diesem Fall werden die Kardiomyozyten nicht direkt geschädigt. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Angiogenese wichtig ist für die kardiale Homöostase bei Druckbelastung (Izumiya et al. 2006; Sano et al. 2007) und Ischämie (May et al. 2008) und dass *vice versa* eine Hemmung des VEGFR eine Hypertonie hervorrufen kann. Diese Druckbelastung des Herzens kann zur Abnahme der myokardialen Gefäßdichte sowie der globalen Kontraktionsfunktion, zur Fibrose und schließlich zu Dekompensation des Herzens führen (Shiojima et al., 2005;

Izumiya et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine basale Konzentration von VEGF für das Bestehen von intakten Gefäßen essentiell ist (Carmeliet 2005) und dass neben VEGF auch noch andere Signalmoleküle, unter anderem PDGF- $\beta$ , von Bedeutung sind (Chen et al. 2008). Ein PDGFR- $\beta$ -*Knock-out* führt in Mäusen bei experimenteller Verengung der thorakalen Aorta (*transverse aorta constriction*; TAC) zu einer Herzinsuffizienz (Chintalgattu et al. 2010). Des Weiteren beeinflusst er negativ die Gefäßummantelung mit Perizyten, welches defekte Verbindungen zwischen Endothelzellen, eine Endothelhyperplasie, mikrovaskuläre Leckagen, eine Gefäßdilatation und einen verminderten Blutfluss zur Folge hat (Hellström et al. 2001; Bjarnegard et al. 2004).



**Abb. 3: Angiogenese und kardiale Homöostase**

Gezeigt ist die Bedeutung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors bzw. Rezeptors (VEGF bzw. VEGFR) im Zuge der Anpassung an Hypoxie und Ischämie. Die Hypertrophie bzw. die daraus resultierende Ischämie führen in den Kardiomyozyten durch den

eukaryotischen Initiationsfaktor 4E1 (eIF4E1) zur Ausschüttung des Hypoxie-induzierenden Faktors (*hypoxia-inducible factors 1- $\alpha$* ; HIF1- $\alpha$ ), der seinerseits die Freisetzung von VEGF und anderen für die Angiogenese wichtigen Faktoren bedingt (Sano et al. 2007). VEGF bindet lokal an VEGF-Rezeptoren von Endothelzellen, wodurch es zur Aktivierung mehrerer Signalkaskaden kommt, die letztendlich zu einer Vasodilatation sowie erhöhtem Überleben und Proliferation in Endothelzellen führt. Die weitere Freisetzung von proangiogenetischen Faktoren stellt im Zustand der kompensierten Hypertrophie die ausreichende Versorgung der Kardiomyozyten sicher (Shiojima et al. 2005; Izumiya et al. 2006). Der *platelet-derived growth factor  $\beta$*  (PDGF- $\beta$ ) ist ebenfalls wichtig für die Angiogenese, da es durch dessen Bindung an den PDGF-Rezeptor auf Perizyten abermals zu einer Freisetzung von VEGF kommt. Diese Sekretion ist wichtig, um die Perizyten an die Endothelzellen, der nach der Sprossung noch unreifen Gefäße, zu dirigieren (Hellström et al. 2001). Dadurch werden die Perizyten in die Gefäßwand integriert (Rhodin & Fujita 1989; Hirschi et al. 1998) und diese somit stabilisiert (Raza et al. 2010).

Legende: ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase 1/2*), FAK (*focal adhesion kinase*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*), PI3K  $\gamma$  (Phosphoinositid-3-Kinase  $\gamma$ ), aus: Chen et al. (2008) und <http://www.cellsignal.com/pathways/angiogenesis.jsp> (Zugriff: Mai 2011) <sup>5</sup>.

### 1.4.2 Ein Exkurs zu den untersuchten TKIs

#### 1.4.2.1 Imatinib

Imatinib (Glivec<sup>®</sup>) ist ein seit der Erstzulassung durch die FDA (2001) breit eingesetzter TKI, dessen Wirksamkeit gegen die CML, B-ALL, CEL, CMML und für gastrointestinale Stromatumoren (GIST) in klinischen Studien belegt ist (O'Brien et al. 2003). Der antineoplastische Effekt von Imatinib wird hauptsächlich auf die kompetitive Inhibition des BCR (*breakpoint cluster region*)-ABL-Fusionsproduktes zurückgeführt bzw. durch die Inhibition von c-Kit vermittelt. Zu den am häufigsten auftretenden kardialen UAWs der Therapie mit Imatinib zählen Herzinsuffizienz mit 1,7% (Atallah et al. 2007) und Perikardergüsse 2-6%<sup>6</sup>. In selteneren Fällen kam es zu Hypertonie oder Tachykardie (0,1-1%)<sup>6</sup>. Bei den vorliegenden Daten der Studie von Atallah et al. (2007) mit einem Patientenkollektiv von 1276 Personen müssen mehrere Aspekte berücksichtigt werden, um die Daten im richtigen Kontext zu erfassen. 82% der Patienten, die an einer Herzinsuffizienz erkrankten, wiesen kardiale Risikofaktoren auf, und das mediane Alter der Erkrankten betrug 70 Jahre, sodass die Anzahl der wahrscheinlich auf Imatinib zurückzuführenden Erkrankten auf 0,6% einzustufen ist. Trotzdem erhärtet sich der Verdacht, dass Imatinib eventuell zu einer Verminderung der linksventrikulären Pumpfunktion führt (Kerkelä et al. 2006). Anhand von elektronenmikroskopisch untersuchten humanen Herzbiopsien und Untersuchungen eines Mausmodells liegen Ultrastrukturveränderungen der Mitochondrien als Ursache nahe (Kerkelä et al. 2006).

Möglicherweise ist die Inhibition des Signaltransduktionsweges der ABL-Kinase für die kardiotoxischen Effekte von Imatinib verantwortlich (Force et al. 2007). Die Inhibition der ABL-Kinase durch Imatinib führt durch einen noch unbekannten Mechanismus zur Akkumulation von übermäßig vielen ungefalteten oder nur teilweise gefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER). Dies wird als ER-Stress bezeichnet, der die Aktivierung der *doublestranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase* (PERK), der Proteinkinase  $C\delta$  (PKC $\delta$ ) und der Serin/Threonin-Proteinkinase/Endoribonuklease (IRE1; Force et al. 2007) zur Folge hat. Dies führt über mehrere Signalkaskaden zur Freisetzung von Cytochrom C mit konsekutivem Zelluntergang. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des ER-Stresses durch den Wirkstoff Salubrinal, der die Dephosphorylierung des kardioprotektiven eukaryotischen Initiationsfaktors 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) verringert, die Imatinib-induzierte Kardiotoxizität herabsetzt (Kerkelä et al. 2006). Der durch PERK phosphorylierte eIF2 $\alpha$  führt zu einem generellen Translationsstop, jedoch mit paralleler Hochregulation der Translation von spezifischen *messenger-Ribonukleinsäuren* (mRNAs), die sich als zytoprotektiv erwiesen (Boyce et al. 2005), was zu einer Reduktion des ER-Stresses führt. Bei länger andauerndem ER-Stress kommt es zur Aktivierung der JNK durch die IRE1-Kinase (Ron 2002; Zhang & Kaufman 2004) und der PKC $\delta$ . An Mäuseherzen und isolierten Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die PKC $\delta$  nicht ursächlich für den Zelluntergang war, wohingegen eine Blockierung der durch die JNK aktivierten Signalkaskade zu einer deutlichen Reduktion der Kardiotoxizität von Imatinib führte (Kerkelä et al. 2006). Der Gentransfer einer Imatinib resistenten C-ABL-Kinase vermittelte in Kardiomyozyten eine Resistenz gegenüber Imatinib (Fernández et al. 2007). Dies lässt vermuten, dass Imatinib-induzierte Kardiotoxizität mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Hemmung der ABL-Kinase hervorgerufen wird. C-Kit ist eine weitere Kinase, die durch Imatinib gehemmt wird. Sie ist für die Neuformation der Intima bei infarktbedingter Gefäßverletzung mitverantwortlich (Wang et al. 2006).

### 1.4.2.2 Dasatinib

Dasatinib (Sprycel®) ist ein seit 2001 zugelassener TKI zur Behandlung der CML bei Resistenz oder Intoleranz gegen Imatinib (Brave et al. 2008; Kantarjian et al. 2010). Der antineoplastische Effekt von Dasatinib wird hauptsächlich auf die Inhibition des

BCR-ABL-Fusionsproduktes, der *Discoidin domain receptor family 1 kinase* (DDR1-Kinase; Rikova et al. 2007), der SRC-Familie (SFK; Haura et al. 2010) und c-Kit zurückgeführt. Es handelt sich um einen bis zu 325fach potenteren Inhibitor der ABL-Kinase (Lombardo et al. 2004), der gegenüber allen Imatinib-resistenten Mutationen im BCR-ABL-Gen mit Ausnahme der Mutation T3151 wirksam ist (Xu et al. 2009). Dies mag, neben den vielen *off-target*-Effekten von Dasatinib, ein Grund für die höhere Rate an kardialen Nebenwirkungen sein. In einer 425 Patienten umfassenden Studie kam es bei 20 Patienten zur Ausprägung von Herzinsuffizienz bzw. ventrikulären Funktionsstörungen. Von diesen waren 12 kardiovaskulär bereits vorbelastet. Insgesamt stieg die durchschnittliche nach Fridericia adaptierte QT-Zeit (QTcF) um 3-6 ms, wobei 2,9% der Patienten eine Verlängerung von >60 ms erfuhren und 0,7% eine absolute QTcF >500 ms aufwiesen. Wie bei Imatinib kam es auch hier in 1% der Fälle zu einem Perikarderguss (Brave et al. 2008). Ventrikuläre Tachykardien, Kardiomegalie, Angina pectoris sowie Perikarditis traten in bis zu 1% und ein akutes Koronarsyndrom in <0,1% der Fälle auf<sup>7</sup>.

Wie bei Imatinib ist die Inhibition des Signaltransduktionsweges der ABL-Kinase eventuell für die kardiotoxische Wirkung von Dasatinib mitverantwortlich. Neben den bei Imatinib bereits erwähnten potentiell kardiotoxischen Signaltransduktionswegen inhibiert Dasatinib zusätzlich den der SRC-Kinase. Sie ist eine Zielstruktur der Tumorthherapie und wichtig für die Funktionalität des kardialen Synzytiums. Die SRC-Kinase ist wahrscheinlich für die Aktivierung von STAT3 und STAT5 verantwortlich. Dies wirkt antiapoptotisch über die Hochregulation von Bcl-XL und Bcl-2. Die Aktivität von SRC moduliert sowohl den PI3K-Signalweg als auch den von c-Kit und ist zusammen mit FAK wichtig für die tumorassoziierte Angiogenese (Honsi et al. 2007). An isolierten Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass der SRC-FAK Signaltransduktionsweg, aktiviert durch Neuregulin 1 $\beta$  (NRG1 $\beta$ ) über den ErbB2-Rezeptor, für den Erhalt sowie die Wiederherstellung der mechanischen Kopplung zwischen Kardiomyozyten durch Ausbildung von Lamellopodien wichtig ist. Eine Inhibition dieser Signalkaskade könnte zur Ausbildung einer linksventrikulären Funktionsstörung beitragen. Eine herzspezifische Inaktivierung von FAK resultierte in einem Herzfehler mit einer abnormalen myofibrillären Anordnung, was die Bedeutung von FAK für den Erhalt der Sarkomerstruktur hervorhebt (Kuramochi et al. 2006).

#### **1.4.2.3 Lapatinib**

Lapatinib (Tykerb<sup>®</sup>) ist ein seit 2007 zugelassenes Medikament. Als Kombinationspräparat mit einem Aromatasehemmer oder Capecitabin konnte seine Wirksamkeit bei gleichzeitig geringer Kardiotoxizität gegen HER2-positive Mammakarzinome bestätigt werden (Geyer et al. 2006; Perez et al. 2008; Schwartzberg et al. 2010). Bei Lapatinib handelt es sich um einen Inhibitor des EGF- und ErbB2-Rezeptors. Für reine EGFR-Inhibitoren (Erlotinib und Gefitinib) sind keine kardialen Nebenwirkungen bekannt (Chen et al. 2008). Daraus resultiert, dass kardiotoxische UAWs unter Lapatinib am ehesten auf die Inhibition von ErbB2 zurückzuführen sind. Als schwerste kardiale Nebenwirkung von Lapatinib ist die Verringerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) zu nennen. Diese trat in 1,6% (0,7% ohne Lapatinib) der Fälle auf, wobei die LVEF in 0,2% symptomatisch war. Bei einem Großteil der Fälle normalisierte sich die Ejektionsfraktion wieder. Der Verdacht, dass die UAWs insbesondere bei den Patienten auftreten, die zuvor Anthrazykline oder Trastuzumab erhielten, bestätigte sich nicht (Perez et al. 2008). Andere Studien zeigten bei Patienten eine Verminderung der LVEF von 2,5% bzw. 3,1%, die Lapatinib in Kombination mit Capecitabin bzw. Letrozol erhalten hatten, im Vergleich zu 1,0% bei Capecitabin bzw. 1,3% bei Letrozol allein (Geyer et al. 2006; Schwartzberg et al. 2010). Zurzeit sind keine weiteren, durch kontrollierte und randomisierte Studien belegbaren, kardialen UAWs von Lapatinib bekannt. Ein eventueller Anstieg des QTc-Intervalls wird diskutiert. Insgesamt ist Lapatinib bisher eher als gering kardiotoxisches Medikament einzustufen (Di Leo et al. 2008), allerdings fehlen für eine exakte Aussage noch entsprechende Studien.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Kardiotoxizität wahrscheinlich auf eine Inhibition am ErbB2-Rezeptor zurückzuführen. Er ist an Kardiomyozyten lokalisiert, seine Deletion im Mausmodell war neonatal letal und seine Inhibition führte im adulten Tier zur Ventrikeldilatation und verminderten Anpassungsfähigkeit an Druckbelastung (Crone et al. 2002; Ozcelik et al. 2002). Der ErbB2-Rezeptor wird durch Heterodimerisierung mit ErbB3/4, unter anderem initiiert von NRG1, aktiviert. NRG1 wird von Kardiomyozyten und Endothelzellen der endo- und myokardialen Mikrozirkulation freigesetzt. Es handelt sich um einen kardioprotektiven Liganden, der antiapoptotische, hypertrophe und mitotische Prozesse reguliert, für das Streckungswachstum mit Verstärkung der Zell-Zell-Kontakte und für eine Reduktion

der Sensibilität auf adrenerge Stimuli und Angiogenese verantwortlich ist. Eine Deletion von ErbB2/4 oder NRG1 führt im Tiermodell zu embryonaler Letalität oder abnormaler Trabekulation. In Kardiomyozyten wird durch die zuvor erwähnte Dimerisierung der Ras-ERK1/2- sowie der PI3K-Akt-Signaltransduktionsweg aktiviert. Der PI3K-Akt-Signalweg wird nur von ErbB3/4-Rezeptoren reguliert, die die entsprechende Bindungsstelle für die p85-Untereinheit von PI3K besitzen. Da ErbB3 nicht in adulten Kardiomyozyten exprimiert wird, gilt das besondere Interesse ErbB4. Lapatinib inhibiert selektiv intrazellulär den ErbB2-Rezeptor, verhindert jedoch nicht die Dimerisierung und blockiert somit auch nicht die Wirkung von NRG1 am ErbB4-Rezeptor. Da in Tumorzellen insbesondere der Komplex aus ErbB2/3-PI3K für das Tumorwachstum relevant ist (De Keulenaer et al. 2010), könnte dies die geringe Kardiotoxizität erklären. Spector et al. (2007) konnten zusätzlich zeigen, dass Lapatinib zu einer kardioprotektiven AMPK-Aktivierung (siehe 1.4.2.5) führt. Diese Entdeckung sowie die selektive Blockierung von ErbB2 könnten zu einer Erklärung des deutlich höheren kardiotoxischen Potenzials von Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper (mAb) gegen den ErbB2-Rezeptor, beitragen. Trastuzumab verhindert extrazellulär die Dimerisierung von ErbB2 mit ErbB3/4, was konsekutiv die Signalwege Raf-ERK1/2 sowie PI3K-Akt hemmt und damit zur Apoptose führt. Eine andere Vermutung, dass es bei Trastuzumab aufgrund von antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität zu einer höheren Kardiotoxizität kommt, konnte nicht bestätigt werden, da Pertuzumab, ebenfalls ein Immunglobulin G1 (IgG1) Antikörper, kaum kardiotoxisch ist (Gordon et al. 2006). Die unterschiedliche Toxizität dieser beiden Medikamente auf das Herz macht wiederum im Umkehrschluss die zuvor dargelegten Wirkmechanismen von Lapatinib wahrscheinlich.

### **1.4.2.4 EGFR-Inhibitoren**

Gefitinib (Iressa<sup>®</sup>) sowie Erlotinib (Tacerva<sup>®</sup>) sind seit 2003 bzw. 2004 als EGFR-Inhibitoren zugelassen. Ihre Wirksamkeit gegen das Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (non-small-cell lung carcinoma, NSCLC) und Pankreastumore (nur Erlotinib) in der Mono- bzw. Kombinationstherapie (Erlotinib) konnte in klinischen Studien belegt werden (Bezjak et al. 2006; Mok et al. 2009; Cappuzzo et al. 2010). Für beide Medikamente gibt es derzeit keine Hinweise für ein kardiotoxisches Potenzial (Chen et al. 2008).

#### 1.4.2.5 Multi-TKIs

Sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>) ist seit 2005 einer der zwei von der FDA zugelassenen Multi-TKIs. Als Multi-TKI werden solche bezeichnet, die viele Kinasen gleichzeitig inhibieren. Sorafenib ist klinisch wirksam gegen Nieren- (RCC) und Leberzellkarzinome (Kane et al. 2006; Kane et al. 2009). Es hemmt bis zu 15 unterschiedliche Kinasen (Ghoreschi et al. 2009), von denen VEGFR 1-3, PDGFR- $\beta$ , c-Kit, FLT3, C-RAF und B-RAF für die *on-target Effekte* der Krebstherapie verantwortlich gemacht werden. Als lebensbedrohliche kardiologische UAWs ist die Ischämie bzw. der Herzinfarkt mit 2,9% (0,4% in der Kontrollgruppe) zu nennen. Patienten, die Sorafenib einnehmen, wiesen ein ca. 3fach höheres Risiko auf, eine arterielle Thrombembolie zu entwickeln (Choueiri et al. 2010). Weitere UAWs sind Hypertonie mit 17% (2% in der Kontrollgruppe; Kane et al. 2006) und Herzinsuffizienz mit 1,7% (0,7% in der Kontrollgruppe)<sup>8</sup>. Eine weitere Studie, die 53 Patienten umfasste, konnte eine QTcF-Verlängerung um 9 ms aufzeigen, allerdings gab es bei keinem Patienten eine QTcF Zeit >500 ms (Tolcher et al. 2011).

Bezüglich des Mechanismus der Kardiotoxizität von Sorafenib müssen zwei unterschiedliche Ansätze betrachtet werden. Zum einen wird eine kardiotoxische Wirkung durch Inhibition von VEGFR und PDGFR diskutiert. Unterschieden wird hierbei der direkte Einfluss über den auf Kardiomyozyten exprimierten VEGFR 1 und die indirekte Wirkung durch Inhibition von VEGFR und PDGFR am Gefäßsystem. Diese Mechanismen tragen vermutlich zu einer Hypertonie, einer verminderten Angiogenese und eingeschränktem kardialen Remodeling unter Druckbelastung bei (Chen et al. 2008; Zentilin et al. 2010). Die PDGFR- $\alpha/\beta$  sind wichtig für die Herzentwicklung (Van den Akker et al. 2008) und die Steigerung der kardialen Funktion nach einem Infarkt (Hsieh et al. 2006). Studien im Mausmodell zeigten, dass die PDGFR-Expression in Kardiomyozyten ansteigt, sofern diese eine Druckbelastung erfahren. PDGFR-*Knock-out*-Mäuse wiesen nach experimenteller Verengung der thorakalen Aorta eine Herzinsuffizienz auf. Der Einsatz eines VEGF-Blockers führte zu einer reversiblen Rarifizierung der kleinen Gefäße am Herzen und zu segmentalen Abnormalitäten der myokardialen Kontraktion (Walsh & Shiojima 2007; May et al. 2008). Der VEGFR 1 scheint am Herzen eine gesonderte Rolle zu spielen. Er ist in den Glanzstreifen lokalisiert (Zentilin et al. 2010) und wahrscheinlich zusammen mit VEGFR 2 für eine verbesserte Kontraktilität und das Remodeling

nach Myokardinfarkt verantwortlich (Ferrarini et al. 2006). In isolierten Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass es unter konstanter Stimulation mit VEGF-A/B zu einer physiologischen Hypertrophie kommt. Parallel war unter VEGF-B, der nur an VEGFR 1 bindet, keine Zunahme der Angiogenese zu beobachten (Karpanen et al. 2008). Am Tiermodell konnte bei alleiniger Stimulation mit VEGF-B innerhalb von 48 h eine Verminderung der Apoptoserate von Kardiomyozyten beobachtet werden. In Anbetracht der VEGF-B-Wirkung auf die Angiogenese könnte dies eher auf einen direkten kardioprotektiven Effekt von VEGFR 1 auf das Herz zurückzuführen sein (Zentilin et al. 2010).

Der zweite Ansatz, der für die Kardiotoxizität von Sorafenib am Herzen verantwortlich sein könnte, befasst sich hauptsächlich mit den durch C-RAF (Abb. 1) vermittelten Signalkaskaden. Postuliert durch Force et al. (2007) führt Sorafenib, hervorgerufen durch eine Inhibition von C-RAF, zur Aktivierung der apoptotischen Signalkaskaden der *mammalian Ste20-like* Kinase 2 (MST2), der *apoptosis signal-regulating* Kinase 1 (ASK1) und durch eine Inhibition der für das Zellüberleben wichtigen RAS-ERK1/2-Signalkaskade zur Apoptose und wirkt damit kardiotoxisch. Hasinoff & Patel (2010) konnten jedoch an Kardiomyozyten zeigen, dass es durch Sorafenib nicht zu einer vermehrten Dephosphorylierung von ERK1/2 kommt, sondern sogar das Gegenteil der Fall ist. Dies deutet auf eine intakte Aktivierung von ERK1/2 hin. Eine mögliche Ursache der ERK1/2 Aktivierung könnte der durch Sorafenib verursachte Zellschaden sein, eine Weitere wäre die Erhöhung des oxidativen Stresses durch Sorafenib (Hasinoff & Patel 2010).

Im Zusammenhang mit diesen Signalkaskaden ist die Betrachtung der Ultrastruktur der Mitochondrien besonders interessant. Da sich hierfür die parallele Darstellung beider Multi-TKIs anbietet, soll an dieser Stelle bezüglich Sunitinib vorgegriffen werden. Im Tiermodell konnte bei einer 28-tägigen Sunitinib- bzw. Sorafenibgabe bei 6 von 8 bzw. 1 von 7 Ratten eine deutliche Verminderung der Cristae und eine Schwellung der Mitochondrien beobachtet werden. Bei Sunitinib kam es zusätzlich noch zu Matrix-Kavitationen und einer erhöhten Anzahl an elektronendichten Einschlüssen (French et al. 2010). Nach 4 h Inkubation von Kardiomyozyten mit Sunitinib (10 µM) war im Gegensatz zu Sorafenib (10 µM) ein deutlicher Anstieg der

Caspase 3 und 7 festzustellen (Hasinoff et al. 2008). Dies lässt den Schluss zu, dass der Zellschaden durch Sorafenib zumindest nicht bei diesen Konzentrationen und Inkubationszeiten durch Apoptose hervorgerufen wird (Hasinoff & Patel 2010). Im Mausmodell konnte unter Sunitinib keine erhöhte Apoptoserate ohne Druckbelastung nachgewiesen werden (Chu, Rupnick, Kerkela et al. 2007; Kerkela et al. 2009). Allerdings waren die Kardiomyozyten vergrößert, was bei konstanter Herzmasse auf einen Zelluntergang hindeutet (Kerkela et al. 2009). Beide TKIs führen innerhalb von 48 h Inkubationszeit bei Rattenkardiomyozyten zur Senkung der ATP-Konzentrationen auf 80% der Kontrollen (French et al. 2010). Will et al. (2008) konnten an isolierten Kardiomyozyten zeigen, dass Sorafenib im Vergleich zu Sunitinib bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ein direkter Inhibitor von Komplex II, III und V der Atmungskette ist. Keiner der beiden TKIs konnte eine Ca-induzierte Erhöhung der Permeabilität der mitochondrialen Transitions-pore bewirken, was *in vivo* anhand der Schwellung von Mitochondrien schon gezeigt werden konnte (French et al. 2010). Kerkela et al. (2009) und French et al. (2010) konnten im Gegensatz zu Will et al. (2008) eine Erhöhung der Permeabilität der mitochondrialen Transitions-pore bei isolierten Kardiomyozyten unter Sunitinib beobachten. Zusammengefasst scheinen beide Multi-TKIs zu einer Ultrastrukturveränderung der Mitochondrien zu führen, mit stärkerer Ausprägung bei Sunitinib. Nur Sunitinib verändert das Membranpotential der Mitochondrien, wohingegen Sorafenib direkt in die Atmungskette eingreift. Beide führen zu einer Verminderung der ATP-Reserven. In isolierten Kardiomyozyten führte nur Sunitinib zu einer erhöhten Apoptoserate.

Sunitinib (Sutent®) ist der andere seit 2006 zugelassene Multi-TKI. Die Wirksamkeit von Sunitinib gegen GIST (Demetri et al. 2006), metastasierte Nierenzellkarzinome (mRCC; Motzer et al. 2007) und pankreatische neuroektodermale Tumore (pNET; Raymond et al. 2010) konnte in mehreren klinischen Studien belegt werden. Sunitinib hemmt bis zu 50 unterschiedliche Kinasen (Ghoreschi et al. 2009), von denen VEGFR1-3, PDGFR- $\alpha/\beta$ , c-Kit, FLT3, RET und CSF1R für *on-target* Effekte in der Krebstherapie verantwortlich gemacht werden. Die teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnisse zu kardialen UAWs lassen sich am ehesten durch unterschiedliche kardiale Risikoprofile (bestehende kardiale Risikofaktoren, vorherige Therapie mit Anthrazyklinen oder anderen TKIs) der Kollektive erklären. So gehen die Angaben

über die Inzidenz einer Hypertonie Grad III ( $\geq 180 / > 110$  mmHg) von 3% (Demetri et al. 2006) über 6,8% (Zhu et al. 2009) bis hin zu 9,7% (Di Lorenzo et al. 2009) bei fehlendem Auftreten in den Kontrollgruppen. Die Veränderungen der LVEF reichen von keinen signifikanten Unterschieden (Demetri et al. 2006) über 2,7% Neuauftreten einer symptomatischen Herzinsuffizienz (Khakoo et al. 2008) bis hin zu Herzinsuffizienz in 8% der Fälle (Chu, Rupnick, Kerkela et al. 2007). Als weitere für das Herz relevante Nebenwirkungen treten arterielle Thrombembolien mit ca. 3fach höherem Risiko (Choueiri et al. 2010) und eine durchschnittliche Verlängerung des QTcFs von 9,6 ms auf. Kein Patient wies eine QTcF  $> 500$  ms auf (Bello et al. 2009). Unklar ist, inwieweit die Verminderung der LVEF primär entsteht oder sekundär eine Folge des Hypertonus oder des Hypothyreoidismus ist.

Neben den bereits bei Sorafenib beschriebenen potentiellen Mechanismen, die für die Kardiotoxizität von Sunitinib verantwortlich sein könnten, sind im Speziellen für Sunitinib zwei weitere Kinasen relevant. Die AMPK ist ein wichtiges Enzym für die Energiehomöostase in Kardiomyozyten (Kerkela et al. 2009). Eine Verschiebung des AMP/ATP-Verhältnisses zu AMP bei Energiemangel führt, wie eine Phosphorylierung durch CaMKK oder LKB1, zur Aktivierung der AMPK. Dadurch werden energieverbrauchende Prozesse wie die Translation oder die Lipidbiosynthese gehemmt. Auf diese Weise wird einer Erschöpfung der ATP-Reserven entgegengewirkt. Sunitinib ist ein direkter Inhibitor der AMPK mit  $IC_{50}$  Werten von 6,5 bis 37 nM für die Untereinheit AMPK $\alpha$ 1 bzw. 4,8 bis 72 nM für die AMPK $\alpha$ 2. Mittels eines adenoviralen Gentransfers konnte in Kardiomyozyten eine konstant aktive Form der AMPK exprimiert werden. Hierunter war die Sterblichkeit der Kardiomyozyten unter Sunitinibexposition, im Vergleich zu Zellen mit unveränderter AMPK, signifikant reduziert. Dies lässt den Schluss einer zumindest partiellen Kardiotoxizität von Sunitinib, vermittelt über die Hemmung der AMPK, zu (Kerkela et al. 2009). Biopsische Ergebnisse in mit Sunitinib behandelten Mäusen konnten eine Myozyten-Hypertrophie bei gleich bleibender Herzmasse aufzeigen (Kerkela et al. 2009). Im Kontrast dazu konnte Sunitinib ohne zusätzliche Druckbelastung im Mausmodell keine erhöhten Apoptoseparameter aufweisen (Chu, Rupnick, Kerkela et al. 2007). Ob es sich bei der Inhibition der AMPK um den Hauptmechanismus der Kardiotoxizität handelt, bleibt ungeklärt (Mellor et al. 2011). Nichtsdestotrotz ist nach

derzeitigem Kenntnisstand eine kardiotoxische Wirkung durch AMPK-Inhibition wahrscheinlich, da Sunitinib im Vergleich zu anderen VEGFR-Inhibitoren wie Sorafenib deutlich häufiger zu einer linksventrikulären Dysfunktion (LVDF) führt (Chu, Rupnick, Kerkela et al. 2007). Ob es sich bei der AMPK um einen *off-target* Effekt handelt ist fraglich, da ihre Hemmung in hypoxischen Tumoren eine Rolle spielen könnte (Kerkela et al. 2009).

Die weiteren, für *on-target* Effekte verantwortlichen Kinasen wie RET, FLT3 und CSF1R werden nicht auf Kardiomyozyten exprimiert. Daher erscheint eine Beteiligung an der kardiotoxischen Wirkung unwahrscheinlich (Chen et al. 2008).

### **1.4.2.6 Vandetanib**

Vandetanib (Zactima<sup>®</sup>) ist ein im April 2011 von der FDA zugelassener TKI zur Therapie des medullären Schilddrüsenkarzinoms (MTC)<sup>10</sup>. In einer Phase III-Studie wurde die Wirksamkeit bei NSCLC erwiesen, jedoch besteht für diese Tumorentität noch keine Zulassung (Herbst et al. 2010). Zu den Kinasen, die *on-target* Effekte von Vandetanib vermitteln, zählen RET, EGFR, VEGFR 2 und mit einer geringeren Affinität zu VEGFR 1 und 3 (Wedge et al. 2002). Zu den kardialen Nebenwirkungen von Vandetanib gehören ein Hypertonus Grad 3 in 9% (1% in der Kontrollgruppe) der Fälle. Die mittlere QTcF stieg im Vergleich zur Kontrollgruppe um >35 ms und in 7% der Fälle traten QTcF-Zeiten von >500 ms auf. Eine Herzinsuffizienz war bei 0,9% und ein akutes Herzversagen bei 0,4% der Patienten zu beobachten<sup>2</sup>. Unter den insgesamt ca. 5000 mit Vandetanib behandelten Patienten wurden zwei Fälle von EKG-gesicherten Tdp registriert, die ohne Todesfolge blieben<sup>3</sup>. Die für den antiproliferativen bzw. kardiotoxischen Effekt von Vandetanib verantwortlichen Rezeptoren wurden bereits unter 1.4.2.3 und 1.4.2.5 behandelt, weshalb hier nicht näher darauf eingegangen werden soll.

### **1.4.2.7 Lestaurtinib**

Lestaurtinib (CEP 701) befindet sich zurzeit in Phase II für die Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) und das Myeloproliferative Syndrom (MPS). Die bisherigen Ergebnisse der Behandlung der AML zeigten kein verlängertes Überleben (Levis et al. 2011) sowie keine signifikante Wirksamkeit beim MPS

(Santos et al. 2010). Neben der Inhibition von FLT3 und JAK2 hemmt Lestaurtinib die Familie der Tropomyosin-Rezeptorkinasen (Trk) in nanomolaren Konzentrationen (Iyer et al. 2010) und könnte deshalb eine vielversprechende Therapieform bei Neuroblastomen sein (Iyer et al. 2010). In präklinischen Studien ist für Lestaurtinib ein Fall von Herzinsuffizienz Grad 3-4 bei einem Kollektiv von 17 Patienten (Smith et al. 2004), LVDF in 2,39% und Ventrikeldilatation in 1,02% der Fälle beschrieben<sup>10</sup>. Zu berücksichtigen ist, dass bisher (Stand: 01/13) keine prospektiven Studien zur Bestimmung der Kardiotoxizität durchgeführt wurden.

Da die FLT3, wie bereits in 1.4.2.5 beschrieben, für die Toxizität am Herzen nicht relevant zu sein scheint, rückt die Inhibition von JAK2 und der Trk-Familie in den Focus der kardiotoxischen Wirkung von Lestaurtinib. Bei JAK handelt es sich um Januskinasen, die mit Ausnahme von JAK3 (Xuan et al. 2001) am Herzen exprimiert werden (Barry et al. 2007). Sie aktivieren STAT-Proteine sowie den PI3K-Akt- und den RAF-ERK-Signaltransduktionsweg. Durch Zytokine oder oxidativen Stress aktivierte Januskinasen zeigen keine Spezifität für bestimmte STAT-Proteine (Kohlhuber et al. 1997; Murray 2007). Alle sieben STAT-Proteine werden am Herzen exprimiert, wobei STAT1, 3 und STAT5a eine Schlüsselrolle in der Homöostase des Herzens vorbehalten ist (Yamaura et al. 2003; Barry et al. 2007). STAT1 hingegen erhöht nach einem Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) die Apoptoserate von Kardiomyozyten. Außerdem hat seine Inhibition eine kardioprotektive Wirkung. STAT3 scheint in Kardiomyozyten unter anderem über die Expression von Bcl-2, Bcl-XL, die Inhibition von p53 und Caspasen antiapoptotische Effekte zu vermitteln. Im Mausmodell führte eine Überexpression von STAT3 im Herzen zu Hypertrophie und erhöhter Sekretion von VEGF mit konsekutiver Angiogenese. Es besteht Grund zur Annahme, dass STAT3-Effekte denen von STAT1 entgegenwirken, auch wenn beide durch JAK2 aktiviert werden können (Barry et al. 2007). STAT5a scheint bei einem I/R-Schaden ebenfalls kardioprotektiv zu sein, wird allerdings hauptsächlich durch SRC aktiviert (Yamaura et al. 2003). Zusammengefasst weist die Signaltransduktion durch JAK-STAT kardioprotektive Effekte auf, die für die Regeneration nach einem Infarkt, die Angiogenese und die Hypertrophie wichtig sind und unter anderem durch JAK2 vermittelt werden.

Die Trk-Familie umfasst TrkA/B/C, die in neonatalen Ratten sowohl von Kardiomyozyten als auch von Endothelzellen exprimiert werden. TrkA/B regulieren unter anderem die Angiogenese sowie die Neubildung der Intima nach Infarkt, wohingegen TrkC kaum auf Endothelzellen exprimiert wird. Bei isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass diese in die Apoptose übergehen, wenn TrkA inhibiert (K252a) wird und eine Stimulation von TrkA zu einem erhöhtem Überleben der Zellen führt (Caporali & Emanuelli 2009). Eine Stimulation von Rattenkardiomyozyten mittels Neurotrophin 3 (NT-3) führte über TrkC zu einer Hypertrophie. Die Effekte der Trk-Familie und JAK2 bieten potenzielle Ansätze, die zu einem Verständnis der vermutlichen Kardiotoxizität bei Lestaurtinib beitragen könnten.

### **1.5 Zielsetzung**

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob es anhand von Fibrin-basierten mini-EHTs (FBMEs, siehe 2.2.2.4) aus neonatalen Rattenkardiomyozyten möglich ist, die Kardiotoxizität (LVDF) von TKIs zu beschreiben, und ob dieses *in vitro* Modell dazu beitragen kann, die TKI-vermittelte Kardiotoxizität besser zu verstehen. Die Beurteilung der kardiotoxischen Wirkung von ausgewählten TKIs erfolgte primär mittels eines video-optischen Messverfahrens zur Bestimmung der Kontraktionsparameter (siehe 2.2.3). Die weitere Analytik erfolgte auf Proteinebene, mikroskopisch und laborchemisch. Für die Analyse wurden neun TKIs ausgewählt, bei sieben von diesen war eine linksventrikuläre Dysfunktion vorbeschrieben, bei zwei Kandidaten nicht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Alle verwendeten Substanzen wurden mindestens mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* (p.a.) verwendet. Alle Substanzen, Lösungen, Antikörper sowie Geräte sind, wenn nicht explizit aufgeführt, dem Anhang zu entnehmen.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Versuchstierhaltung**

Die verwendeten Wistar-Ratten stammten aus eigener Zucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) und wurden bei handelsüblichem Labortierfutter sowie Leitungswasser gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden neugeborene (postnatal 1.-3. Tag) Tiere verwendet. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org. #238).

#### **2.2.2 Methoden der Zellkultur**

##### **2.2.2.1 Organentnahme zur Präparation von neonatalen Rattenherzzellen**

Die Tiere (minimal 20, maximal 60) wurden dekapitiert und sternotomiert. Nach Spreizung der Thoraxwand wurde das Herz mit dem Gefäßstiel komplett entnommen und umgehend in eine Zellkulturschale mit sterilem, eisgekühltem kalzium- und bikarbonatfreiem Hanks-Puffer mit [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (CBFHH; in mM: 34,2 NaCl, 5,4 KCl, 0,81 MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0,34 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 5,6 Glucose, 20 [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES) pH 7,4) überführt.

##### **2.2.2.2 Enzymatischer Gewebeaufschluss der Herzen**

Nach der Entnahme der Herzen erfolgte die Zellpräparation unter sterilen Bedingungen. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) wurde ebenfalls steril verwendet. Die Rattenherzzellen wurden

mittels eines fraktionierten DNase/Trypsin-Verdau, modifiziert nach Webster et al. (1993), isoliert.

| Anzahl der Herzen | Trypsin-Arbeitslösung | DNase-Arbeitslösung |
|-------------------|-----------------------|---------------------|
| 60                | 7,7 ml                | 6,9 ml              |
| 40                | 5,1 ml                | 4,5 ml              |
| 30                | 3,9 ml                | 3,5 ml              |
| 25                | 3,2 ml                | 2,8 ml              |

**Tab. 3: Trypsin/DNase-Arbeitslösung**

Dargestellt sind die angepassten Mengen der Trypsin- bzw. DNase-Arbeitslösung für die Kardiomyozytenpräparation, in Abhängigkeit von der Anzahl der Herzen.

Zunächst wurden die entnommenen Herzen in eisgekühltem CBFHH gewaschen. Nach Abtrennung der Gefäßstiele sowie der Vorhöfe wurden die Herzen erneut dreimal mit 10 ml CBFHH gewaschen. Anschließend wurden die Herzen in ca. 2 ml CBFHH aufgenommen und mit einer gebogenen, feinen Schere zerkleinert (max. 10 min), bis die Gewebestücke kleiner als 1 mm<sup>3</sup> waren. Mithilfe einer CBFHH-benetzten, weitlumigen Pipette wurden die Gewebestücke in ein 50 ml Sammelgefäß überführt, mit CBFHH erneut gewaschen und anschließend der Gewebeaufschluss begonnen. Für den Gewebeaufschluss wurde eine angepasste Menge der Trypsin-Arbeitslösung (0,5 ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), 1,3 ml Trypsin-Stammlösung, 0,6 ml DNase-Stammlösung, 47,6 ml CBFHH; mit Trypsin-Stammlösung: 100 mg/ml in CBFHH; Trypsin crude extract, DNase-Stammlösung: 2 mg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; w/o MgCl<sub>2</sub>, w/o CaCl<sub>2</sub>); DNase II, Typ V, *bovine spleen*) zu den zerkleinerten Gewebestücken gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert (Tab. 3). Anschließend wurde nach Sedimentation des Gewebes der Überstand aus dem Vorverdau verworfen. Erneut wurde Trypsin-Arbeitslösung zu dem Gewebe gegeben und inkubiert, bis sich der Überstand zu trüben begann. Sofort wurde eine angepasste Menge DNase-Arbeitslösung (0,5 ml Pen/Strep, 0,6 ml DNase-Stammlösung, 1,7 ml fötales Kälberserum (FKS, aktiv), 47,2 ml CBFHH; Tab. 3) zugegeben und 30× mit einer weitlumigen 10 ml Pipette trituriert. Nach Sedimentation des Gewebes wurde der Überstand in ein dafür vorgesehenes Sammelröhrchen mit einem vorgelegten Volumen an aktivem FKS (auf Eis) transferiert. Das aktive FKS diente hierbei zur Inaktivierung des Trypsins. Die Prozedur wurde so oft wiederholt, bis nur noch

Bindegewebsfasern übrig waren, die verworfen wurden. Sobald ein Sammelröhrchen voll war, wurden die Zellen sofort abzentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 2-3 ml gekühltem nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FKS (inaktiviert), 1% Pen/Strep, 1% L-Glutaminsäure) resuspendiert. So wurden die Zellen bis zum Ende der Präparation auf Eis gelagert. Am Ende wurden alle Zellpellets vereinigt und es erfolgte ein finaler DNase-Verdau (250 µl DNase-Stammlösung/30 ml Zellsuspension, 2 min Inkubation) zur Eliminierung der während der Präparation freigesetzten DNA. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem angemessenen Volumen NKM resuspendiert. Die Zellen wurden durch einen benetzten Zellfilter (100 µm) gegeben, um Debris abzutrennen. Nun wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wie folgt bestimmt. Die Suspension wurde gut durchmischt und 50 µl in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zusätzlich wurden 450 µl Trypanblau und 500 µl NKM zugegeben. Nach erneutem Mischen wurde die Neubauerkammer befüllt. Es wurden immer 8 große Quadrate ausgezählt, die Werte gemittelt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$y \times 10^6 \times ml^{-1} = \bar{x} \times 20 \times 10.000$$

Dabei stehen die Variablen für folgende Größen:

y: berechnete Zellzahl

x: Mittelwert der Zellzahl aus 8 großen Quadraten

Die Zellen wurden abschließend sofort weiterverwendet.

### **2.2.2.3 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt**

Der Hühnerembryonenextrakt (chick-embryo-extract, CEE) wurde dem verwendeten Zellkulturmedium zugegeben (2%). Zur Herstellung von CEE wurden 120-240 angebrütete VALO-Eier (7.-9. Bruttag, Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) verwendet. Zunächst wurden die Eier mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Schalen wurden am stumpfen Pol vorsichtig mit einer Schere geöffnet und die Embryonen mit einer gebogenen Pinzette entnommen. Nach

Dekapitation wurden die Köpfe sowie die Körper in ein bis zwei, mit je 150 ml eisgekühltem CBFHH (siehe 2.2.2.1) und 4% P/S gefüllten, 500 ml Glasflaschen gesammelt und auf Eis homogenisiert (Polytron<sup>®</sup> Homogenisator, 6 × 15 s bei Stufe 11). Das Homogenat wurde auf vier konische Reaktionsgefäße (150 ml) aufgeteilt und anschließend zentrifugiert (60 g, 15 min, 4°C). Nach Abnahme und Sammeln der Überstände wurden die Pellets nochmals mit CBFHH resuspendiert, vereinigt, auf 300 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert (6 × 15 s bei Stufe 11, 3 × 5 s bei Stufe 20). Nach erneuter Zentrifugation (60 g, 15 min, 4°C) und Vereinigung aller Überstände wurde das Hühnerembryonenextrakt in Aliquots à 14 ml bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine Präparation mit 120 angebrüteten Eiern ergab durchschnittlich 360-460 ml Hühnerembryonenextrakt. Die gesamte Präparation fand unter sterilen Bedingungen statt. Eine Probe des Extrakts wurde zur mikrobiellen Analyse in das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKEs gegeben und auf Bakterien sowie Pilze geprüft.

### **2.2.2.4 Herstellung von Fibrin-basierten mini-EHTs (FBMEs) im 24-Well Format**

Die Silikonhalterungen mit jeweils vier Paaren sogenannter Silikonposts (Abb. 4A) und die Teflon-Platzhalter (Abb. 4B) wurden ausgekocht, autoklaviert und bis zum Gebrauch steril gelagert. Zur Herstellung von FBMEs im 24-Well Format wurden zunächst Gussformen aus Agarose angefertigt. Hierfür wurden je Well 1,6 ml sterile 2%-ige Agarose in PBS (w/o MgCl<sub>2</sub>, w/o CaCl<sub>2</sub>) pipettiert. In die noch flüssige Agarose wurden die Teflon-Platzhalter (Maße (L × B × H): 12 mm × 3 mm × 13,5 mm; Abb. 4) positioniert. Nach dem Aushärten der Agarose wurden diese entfernt und stattdessen die Silikonhalterungen (Abb. 4) platziert. Für die FBMEs im 24-Well Format wurden spezielle industriell hergestellte Silikonhalterungen verwendet. Die Herstellung des Mastermixes für FBMEs mit einem Volumen von jeweils 100 µl erfolgte unmittelbar nach der Zellpräparation. Um die Osmolarität des Mastermixes zu gewährleisten, wurde das Volumen aus Fibrinogen und Thrombin durch 2fach DMEM ausgeglichen.

**FBME-Mastermix:**

|            |                                                                   |
|------------|-------------------------------------------------------------------|
| Zellen     | $4,1 \times 10^6/\text{ml}$                                       |
| Fibrinogen | 5 mg/ml                                                           |
| Thrombin   | 3 U/ml                                                            |
| 2fach DMEM | entsprechend dem kombinierten Volumen aus Fibrinogen und Thrombin |

aufgefüllt auf 1 ml mit NKM.

**Zusammensetzung 2fach DMEM:**

20% 10fach DMEM (mit 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l  $\text{NaHCO}_3$ )  
20% Pferdeserum (Horse Serum, HS; inaktiviert)  
2% Pen/Strep  
4% CEE  
in Aqua a.i., steril filtriert

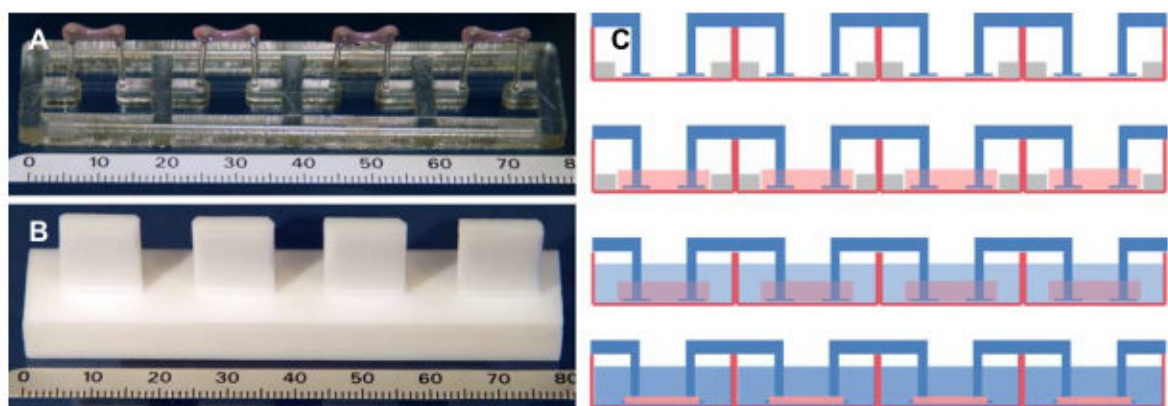
**FBME-Herstellung:**

In die zuvor mit Platzhaltern (jeweils ein Pärchen der Silikonposts in eine Agarosegussform) besetzten Gussformen aus Agarose wurde der auf Eis gelagerte Mastermix pipettiert. Dies geschah für jedes FBME einzeln. Dazu wurde zunächst ein entsprechender Teil (97  $\mu\text{l}$ ) des Mastermixes abgenommen, separat mit Thrombin (3  $\mu\text{l}$ ) vermischt und in die Vertiefungen der Gussform pipettiert. Anschließend wurden die FBMEs bei 37 °C, 7%  $\text{CO}_2$  und 40%  $\text{O}_2$  im Brutschrank für ca. 2 h inkubiert, damit das Fibrin polymerisieren konnte, bevor sie in eine neue, mit FBME-Medium gefüllte Zellkulturschale überführt wurden.

**FBME-Kulturmedium:**

DMEM (Biochrom) mit:  
10% HS  
2% CEE  
1% Penicillin/Streptomycin  
10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Insulin  
33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin

Das FBME-Kulturmedium wurde montags, mittwochs und freitags gewechselt und vor jedem Wechsel frisch angesetzt. Die Tage des Wechsels sowie das FBME-Medium konnten von den oben genannten Wochentagen zum Zeitpunkt der eigentlichen Messreihe abweichen. (siehe 2.2.2.5 und 2.2.5). Die FBMEs zeigten unter diesen Bedingungen nach einigen Tagen erste Kontraktionen. Diese waren allerdings auf einzelne Bereiche beschränkt und unkoordiniert. Nach etwa 10 Tagen schlugen sie messbar kohärent. FBMEs konnten bis zu 6 Wochen stabil kultiviert werden. Die Untersuchungen fanden zwei bis drei Wochen nach der Herstellung statt.



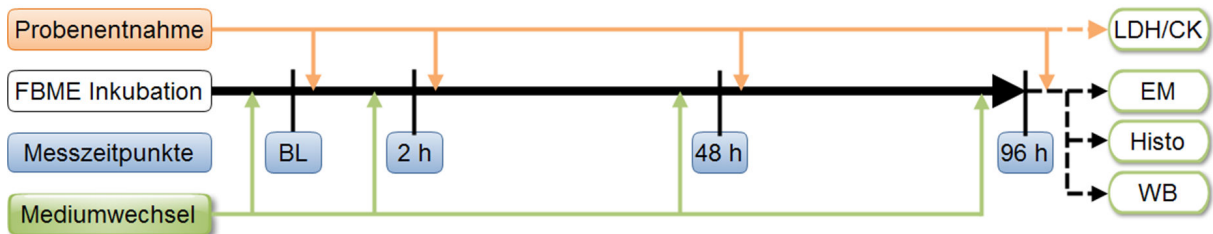
**Abb. 4: Darstellung der Elemente zur Generierung von FBMEs**

Zu sehen ist eine Silikonhalterung mit vier FBMEs (A) sowie ein Teflonspace zur Herstellung der Agarosegussformen (B; beides um 180° gedreht; Skalierungsbalken in mm). In C ist der Kulturverlauf schematisch abgebildet. Zunächst wurden die Silikonhalterungen in den Agarosegussformen platziert, dann der Mastermix für die FBMEs zugegeben, die nach 2 h bei 37 °C in eine neue, mit FBME-Medium befüllte Zellkulturschale überführt wurden. Unter diesen Bedingungen entwickelten sich innerhalb von 10-14 Tagen kohärent schlagende FBMEs.

### 2.2.2.5 Messprotokoll

Der Wechsel des FBME-Mediums erfolgte bis zum Erreichen der Plateauphase der Kontraktionskraft der FBMEs wie in 2.2.2.4 beschrieben. Am Tag der Baseline (BL)-Messung war das FBME-Medium zuletzt vor zwei Tagen gewechselt worden. Die FBMEs wurden zwei Stunden vor der eigentlichen Messung erneut in frisches FBME-Medium überführt, um eine möglichst hohe Anzahl an auszuwertenden Kontraktionen zu erhalten. Direkt im Anschluss an die video-optische Messung erfolgte die Inkubation der FBMEs mit einem der neun zu testenden TKIs mit und ohne Doxorubicin (10 nM). Um eventuelle Kurzzeiteffekte beobachten zu können, wurde

eine video-optische Messung 2 h nach Beginn der Inkubation durchgeführt. Einen Überblick über die zeitliche Abfolge der Messzeitpunkte, der Mediumwechsel und der Probenentnahmen des Zellkulturmediums für die spätere Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Kreatinkinase (CK) gibt Abbildung 5.



**Abb. 5: Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Versuchsaufbaus**

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf von der Baseline-Messung (BL)- bis hin zur letzten video-optischen Analyse nach 96 Stunden (96 h). Das durch die Probenentnahme gewonnene Medium diente der klinisch-chemischen Analyse. Im Anschluss an die letzte video-optische Messung (96 h) wurden die FBMEs entweder für das elektronenmikroskopische- (EM), das histologische- (Histo) oder das Westernblot-Analyseverfahren (WB) weiterverwertet.

Einen Tag vor dem Beginn des Experiments wurden die TKIs ihrer Löslichkeit bzw. orientierend an der maximal erreichten menschlichen Plasmakonzentration ( $C_{\max}$ ) entsprechend abgewogen (Analysenwaage Genius), in DMSO gelöst, steril filtriert und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Je nach Löslichkeit wurden für die TKIs Stockkonzentrationen, das 100fache oder 1000fache der maximalen Arbeitskonzentrationen, gewählt. Für die Messung nach 48 h bzw. 96 h wurde das FBME-Medium zwei Stunden vor der Messung gewechselt. Direkt im Anschluss erfolgte abermals die video-optische Messung.

Die Tabelle 4 zeigt das Pipettierschema der Verdünnungsreihe der TKIs ohne bzw. mit Zugabe von Doxorubicin (10 nM).

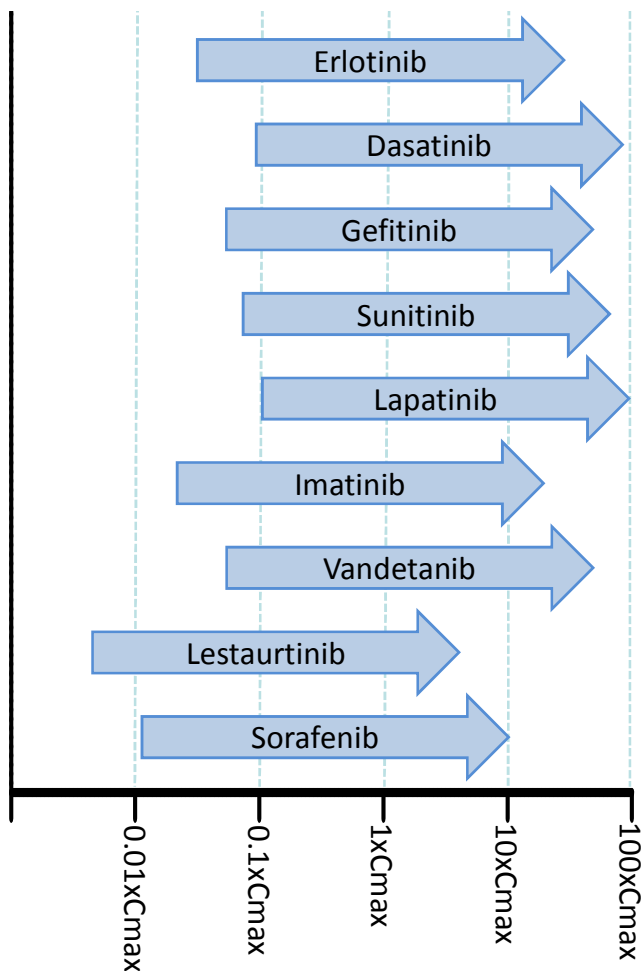
|                      |                             |                                                       |                                                     |                                                      |                                                       |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| CTR ±<br>Doxorubicin | CTR + DMSO<br>± Doxorubicin | 0,1 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 1 x C <sub>max</sub> TKI +<br>DMSO ±<br>Doxorubicin | 10 x C <sub>max</sub> TKI +<br>DMSO ±<br>Doxorubicin | 100 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin |
| CTR ±<br>Doxorubicin | CTR + DMSO<br>± Doxorubicin | 0,1 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 1 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 10 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 100 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin |
| CTR ±<br>Doxorubicin | CTR + DMSO<br>± Doxorubicin | 0,1 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 1 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 10 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 100 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin |
| CTR ±<br>Doxorubicin | CTR + DMSO<br>± Doxorubicin | 0,1 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 1 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 10 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin | 100 x C <sub>max</sub> TKI<br>+ DMSO ±<br>Doxorubicin |

**Tab. 4: Pipettierschema einer 24-Well Zellkulturschale in Aufsicht**

Dargestellt sind die Verdünnungsreihen der TKIs mit bzw. ohne Zugabe von Doxorubicin (10 nM). Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe orientierten sich an der maximal gemessenen Plasmakonzentrationen (C<sub>max</sub>) des TKIs bei der oralen Gabe der zugelassenen Höchstdosis. Die DMSO Konzentration ist in allen Wells identisch mit Ausnahme der Kontrolle (CTR).

Es gilt klar zwischen den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationsstufen und dem in klinischen Studien ermitteltem C<sub>max</sub>-Wert zu unterscheiden. Abbildung 6 zeigt, dass der in dieser Arbeit als C<sub>max</sub> definierte Wert sich grob am klinischen C<sub>max</sub>-Wert orientiert. Sie gibt über das tatsächliche Verhältnis Aufschluss. So liegt beispielsweise die für Sorafenib als C<sub>max</sub>-Wert definierte Konzentration ungefähr eine Zehnerpotenz unterhalb des klinischen C<sub>max</sub>-Wertes. Für die Beurteilung der Wirkung der TKIs muss dies Berücksichtigung finden. Der ursprüngliche Versuchsaufbau sah vor, den Effekt der TKIs auf FBMEs in vier Konzentrationsstufen zu messen, wobei die höchste Konzentration dem 100fachen der in klinischen Studien ermittelten Plasmakonzentrationen (Tab. 1) entsprechen sollte. Der Hintergrund für die Wahl dieser sehr hohen Konzentrationen war die Unsicherheit, ob Verminderungen der Kontraktionskraft im FBME-Modell innerhalb von 96 Stunden zu detektieren sind, da klinische Veränderungen zum Teil erst nach Monaten oder Jahren auftreten (Orphanos et al. 2009). Dieses Vorhaben ließ sich jedoch nicht umsetzen, da die TKIs aufgrund starker Lipophilie in so hohen Konzentrationen nicht in Lösung gebracht werden konnten.

Die gewählten Konzentrationen und das Verhältnis zu den C<sub>max</sub>-Werten ist in Abbildung 6 dargestellt.



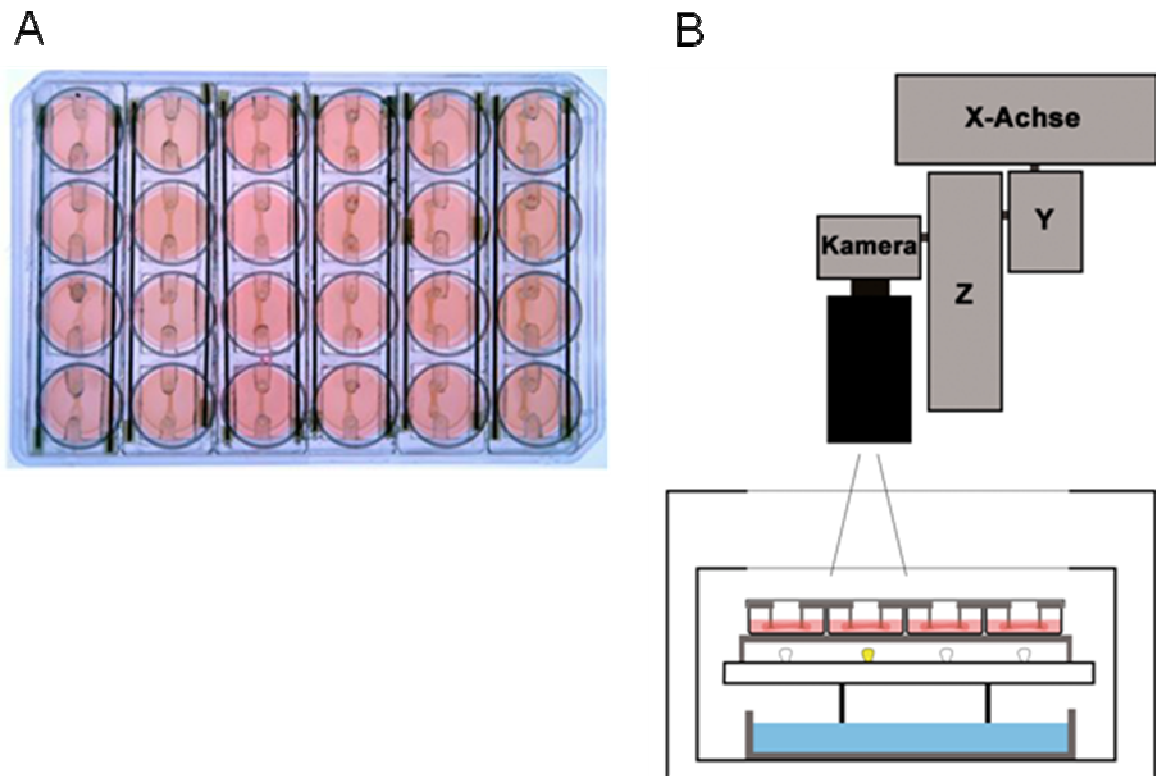
**Abb. 6: Unterschied zwischen klinischem  $C_{\max}$ -Wert und  $C_{\max}$ -Wert der Verdünnungsreihe der TKIs**

Dargestellt ist das Verhältnis des klinisch ermittelten  $C_{\max}$ -Wertes (Abszisse) unter oral zugelassener Höchstdosis, zu dem aufgrund der hohen Lipophilie erreichten  $C_{\max}$ -Werten der Verdünnungsreihe der TKIs (Pfeile).

### 2.2.3 Video-optische Methoden zur Bestimmung der Kraftentwicklung in FBMEs

Um Kontraktionskraftmessung unter standardisierten und automatisierten Bedingungen durchzuführen, wurde ein im Institut entwickeltes Messsystem verwendet. Dieses Messsystem bestand aus einer zellkulturähnlichen Einheit, in der Temperatur, Humidität sowie die Gaszusammensetzung kontrolliert wurde. Der Deckel dieser Einheit bestand aus einer Glasplatte, über der eine Basler-Kamera (Typ A 602f-2) montiert war. Mit Hilfe eines kundenspezifischen Computerprogramms konnten die Kamerakoordinaten für jedes FBME definiert und gespeichert werden, um die FBME-Kontraktilität video-optisch zu monitoren. Zur Optimierung der Bildqualität wurde das aktuell aufgenommene FBME von unten durch eine Diode

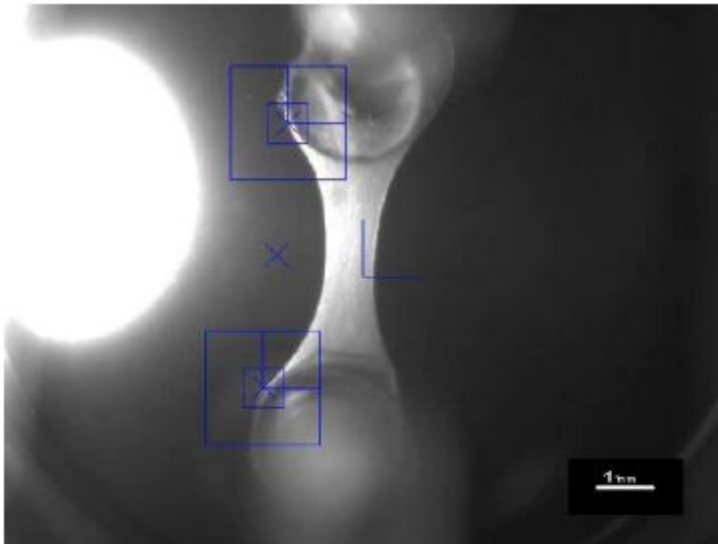
beleuchtet. Die Beleuchtung wurde mit den Aufnahmen synchronisiert, um ein Erwärmen des Zellkulturmediums durch dauerhafte Lichteinwirkung zu vermeiden (Abb. 7).



**Abb. 7: Schematischer Aufbau der Messapparatur**

Gezeigt ist eine Zellkulturschale in der Aufsicht mit sechs Silikonhalterungen, an denen sich jeweils vier FBMEs befinden (A). Die Messapparatur ist schematisch in B dargestellt. Zu sehen ist die am x-y-z-System befindliche Kamera über der Zellkultureinheit. Das grundsätzliche Prinzip der Synchronisation von Beleuchtung und Aufnahme ist ebenfalls dargestellt.

Die video-optischen Analysen fanden mit Hilfe einer speziell hergestellten Software (Consulting Team Machine Vision, CTMV, Pforzheim) statt. Diese erkannte in dem aufgenommenen Film automatisiert das obere und untere Ende der FBME-Struktur und verfolgte diese Positionen für den Zeitraum der Aufnahme. Die Positionen sind als blaue Quadrate in Abbildung 8 abgebildet.



**Abb. 8: Durch die Kamera aufgenommenes Bild zur Kontraktionsmessung**

Gezeigt ist das durch die Kamera aufgenommene Bild eines Wells der Zellkulturschale mit einem FBME in der Aufsicht. Die blauen Quadrate kennzeichnen die Messpunkte, die durch die Software gesetzt wurden. Bei der Kontraktion des FBMEs verringerte sich der Abstand der Messpunkte. Aus dieser Längenänderung wurde die Kraftentwicklung berechnet. Am linken Bildrand ist weiß die leuchtende Diode der Messapparatur zu erkennen.

Basierend auf der Geometrie, der elastischen Eigenschaften (Elastizitätsmodulus von 1,7 kPa) der Silikonposts und der Veränderung des Abstandes zwischen den automatisiert erkannten Messpunkten wurde die Kontraktionskraft berechnet. Dieser Berechnung lag eine von Vandenburg et al. (2008) publizierte Formel zu Grunde:

$$F = \frac{3EI\partial}{L^3} = \frac{3\pi ER^4\partial}{4L^3}$$

mit :

$$I = \frac{1}{4} \pi R^4$$

Dabei stehen die Variablen für folgende Größen:

F : Resultierende Kraft

E : Elastizitätsmodulus des Silikons

$\partial$  : Ablenkung der Silikonposts

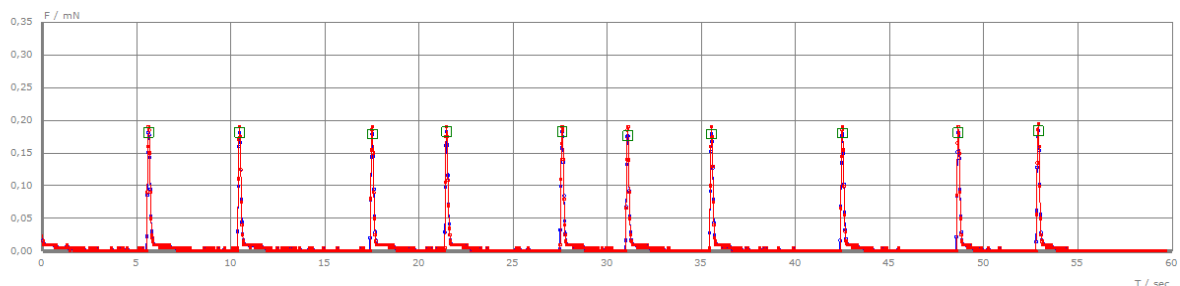
L : Länge der Silikonposts

R : Radius der Silikontellerchen am Ende der Silikonposts

$\pi$  : Kreiszahl

I : Trägheit des Materials bzw. Silikons

Der Verlauf der berechneten Kontraktionen über die Zeit wurde graphisch dargestellt (Abb. 9), die Kontraktionspeaks anhand vordefinierter Peakkriterien erkannt und mit grünen Kästchen markiert. Wichtige Qualitätsmerkmale dieses Messvorgangs waren die automatisierte Erkennung der FBME-Figur (blaue Markierung, Abb. 8) und die Darstellung einzelner Kontraktionspeaks (grüne Kästchen im Kontraktionsgraphen, Abb. 9) in einem automatisiert erstellten Report. Basierend auf den grün markierten Kontraktionspeaks charakterisierte die Software den Kontraktionsgraphen durch die automatisierte Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen für wichtige Kontraktionsparameter wie Kontraktionskraft, Kontraktions- und Relaxationszeit (T1, T2), Schläge pro Minute sowie Muskelverkürzung (fractional shortening, FS). Das Messsystem ermöglichte es, eine große Anzahl an FBMEs zu untersuchen und gab die Ergebnisse der Messung in Form eines durch die Software erstellten Reports wieder. Bei zuvor suboptimal definierten Peakparametern bestand die Möglichkeit, dieselbe Messung unter angepassten Kriterien *offline* erneut durchzuführen.



**Abb. 9: Typisches Kontraktionsmuster**

Die Messzeit in Sekunden (s; Abszisse) ist gegen die ermittelte Kraft in Millinewton (mN; Ordinate) aufgetragen. Die grünen Quadrate markieren die erkannten Kontraktionspeaks. Basierend auf den grün markierten Peaks fand die Charakterisierung (Frequenz, Kraft, Kontraktionszeit etc.) der Kontraktionen statt.

## 2.2.4 Histologische Analysen

### 2.2.4.1 Paraffineinbettung von FBMEs zur Herstellung von Mikrotomschnitten

Für die Paraffineinbettung wurden die FBMEs zunächst an den Silikonposts belassen und im 37 °C warmen PBS (w/o MgCl<sub>2</sub>, w/o CaCl<sub>2</sub>) für 2 × 5 min gewaschen. Die Fixierung erfolgte mittels Histofix<sup>®</sup> über Nacht bei 4 °C mit anschließendem Waschen der FBMEs in Tris gepufferter physiologischer Salzlösung (TBS). Nach dem Lösen der FBMEs vom Silikonpost wurden sie anschließend in 4%-iger Agarose (PBS w/o MgCl<sub>2</sub>, w/o CaCl<sub>2</sub>) eingebettet, um ihre Lage im späteren Paraffinblock adjustieren zu

können. Nach dem Zuschneiden der Agaroseblöcke wurden die FBMEs entwässert. Alle weiteren Schritte erfolgten im Institut für Neuropathologie des UKEs. Die Dehydrierung erfolgte automatisch mit einem Leica ASP 300s<sup>®</sup> Instrument.

Formalin (4% für 60 min) bei Raumtemperatur (RT)

Aqua a. i. (für 15 min) bei RT

Isopropanol (70% für 30 min, 80% für 45 min, 96% (I) für 75 min, 96% (II) für 75 min, 100% (I) für 90 min, 100% (II) für 120 min) bei RT.

Xylol (1 × 45 min bei RT, 1 × 90 min bei 40 °C)

Reines Paraffin (1 × 60 min bei 60 °C, 2 × 90 min bei 60 °C)

Die FBMEs wurden nach diesen Schritten in geeigneten, vorgewärmten Formen positioniert und mit Paraffin ausgegossen. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden auf einer Kühlplatte (Leica EG 1150C<sup>®</sup>) heruntergekühlt, bevor am Mikrotom (Leica SM 2000R<sup>®</sup>) 4 µm dünne Schnitte angefertigt wurden, die dann in einem 37 °C warmen Wasserbad gestreckt und abschließend auf Objektträger (Superfrost, HistoBond<sup>®</sup>) gezogen wurden. Die Schnittebenenauswahl erfolgte bei allen angefertigten Schnitten nach dem gleichen Schema. Die Paraffinblöcke wurden bis zum Beginn des Präparates angeschnitten, die anschließenden 100 µm verworfen und die 6 folgenden Schnitte, je 2 Schnitte pro Objektträger, aufgezogen. Dies diente der besseren Vergleichbarkeit der Schnitte, die im Anschluss entweder mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) oder immunhistochemisch gefärbt wurden. Um insbesondere bei späteren immunhistochemischen Verfahren ein Abschwimmen der Schnitte vom Objektträger zu verhindern, wurden diese mittels befeuchtetem Chromatographiepapier angedrückt. Die Anheftung der Präparate auf den Objektträger wurde zusätzlich durch Lagerung im Brutschrank für 20 min verstärkt.

### **2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der FBMEs**

Die H.E.-Färbung erfolgte im Institut für Neuropathologie des UKEs. Für die Doppelfärbung mit Hämatoxylin (selektive Kernfärbung nach Harris) und Eosin (Zytosolfärbung) wurden die Mikrotomschnitte mit Xylol entparaffiniert (2 × 10 min), in einer absteigenden Ethanolreihe (3 × 99%, 3 × 96%, 80%, 70%, Aqua) für jeweils 30 s rehydriert und bis zur Einstellung der Kerbfärbung 5 min in Harris' Hämatoxylin

(frisch filtriert) inkubiert. Anschließend wurden sie 5 min gewässert (Aqua a. i.). Die Differenzierung erfolgte für wenige Sekunden in HCl-Wasser (2,5 ml HCl 37%ig in 500 ml Aqua a. i., HCL, Salzsäure). Nach der Differenzierung wurden die Schnitte umgehend in Wasser gespült und zum Bläuen für 5 min in lauwarmes Leitungswasser gegeben. Nach weiteren 3 min in Ethanol 70% wurden die Präparate für 0,5-3 min (je nach Präparat) in Eosin-Gebrauchslösung (Gebrauchslösung: 50 ml Lösung A aus: 3g wasserlöslichem Eosin in 300 ml Aqua a.i., + 5 ml Lösung B aus: 0,5 g Phloxin B in 50 ml Aqua a.i., + 390 ml 96% Ethanol + 2 ml konzentrierte Essigsäure) überfärbt und abschließend mit Ethanol 99% für 1-2 min ausgewaschen und entwässert. Für die Einbettung wurde Einschlussmedium (TissueTek<sup>®</sup>) verwendet. Zur Analyse der Histologien wurden im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie Ausschnitte mit einem Mikroskop (Zeiss Axioskop 2) fotografiert (Zeiss-Axiocam).

### **2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung des sarkomerischen Actin und Connexin-43 der FBMEs**

Die komplette immunhistochemische Färbung erfolgte vollautomatisiert an einem Färbeautomaten (Benchmark XT<sup>®</sup>) im Institut für Neuropathologie des UKEs. Die Entparaffinisierung erfolgte mittels EZ.Pre<sup>®</sup> mit anschließender absteigender Ethanolreihe. Zur Antigendemaskierung wurden die Paraffinschnitte für beide Antikörper für 30 min in CC1m inkubiert. Bei der folgenden indirekten Methode wurden die Gewebeschnitte (siehe 2.2.4.1) mit unkonjugierten Primärantikörper gegen  $\alpha$ -Actin (*Monoclonal Mouse Anti-Sarcomeric Actin*) und Connexin-43 (*Purified Mouse Anti-Connexin-43*), 32 min in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit der *Horseradish peroxidase* gekoppelt und wandelte das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin unter Bildung eines Farbumschlages um. Abschließend wurde mit Hämatoxylin (Ventana Medical Systems) gegengefärbt (4 min), mit Bluing Reagent<sup>®</sup> gebläut und mit Einschlussmedium eingebettet (Acrytol<sup>®</sup>). Zur Analyse der Histologien wurden im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie Ausschnitte mit einem Mikroskop (Zeiss Axioskop 2) fotografiert (Zeiss-Axiocam).

## **2.2.5 Klinische Chemie**

Im Zellkulturmedium der FBMEs zum Zeitpunkt Baseline, 48 h und 96 h wurde die LDH (Laktatdehydrogenase)- und CK (Kreatinkinase)-Aktivität gemessen. Dies geschah mittels photometrischer Auswertung im Institut für klinische Chemie des UKEs am Analysesystem Roche P-Modul. Da der Indikator Phenolrot im DMEM (Biochrom) die photometrische Messbarkeit des FBME-Mediums störte, wurden das DMEM im FBME-Medium durch phenolrot-loses DMEM (Gibco) ersetzt. Die FBMEs wurden 2 Tage vor der Baseline-Messung in PBS (37 °C) gewaschen und in die zuvor 2 × mit Aqua a. i. ausgespülten und abgesaugten 24-Well Zellkulturschalen überführt. Das Waschen der 24-Well Zellkulturschalen, das in diesem Fall für die Überführung der FBMEs notwendig war, geschah ebenfalls am Tag der Baseline-Messung. Aus jedem Well wurde 1 ml des FBME-Mediums zum Zeitpunkt Baseline, 48 h und 96 h in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, wobei es zuvor 3 × auf- und abpipettiert wurde. Anschließend wurde das abgenommene FBME-Medium 5 min bei 300 g in einer Tischzentrifuge (5415R<sup>®</sup>) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Die Inkubationszeit aller drei Probenentnahmen betrug somit 2 Tage. Die Analyse der gewonnenen Proben erfolgte blockweise (ca. 30/Tag), wobei zwischen der Probenentnahme und der Auswertung maximal 9 Wochen lagen. Die Proben wurden dafür bei Raumtemperatur aufgetaut, für 10 s bei 13200 g zentrifugiert und der Überstand in ein Probenröhrchen zur weiteren Analyse an die klinische Chemie übergeben. Dort wurde die Enzymaktivität noch am selben Tag untersucht.

## **2.2.6 Westernblot-Verfahren**

### **2.2.6.1 Gewebepräparation für Westernblot-Analysen**

Um sicherzustellen, dass der Phosphorylierungsstatus der untersuchten Proteine sich präanalytisch nicht veränderte, wurden die FBMEs nach der letzten Messung (96 h) vom Silikonpost gelöst und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Gewebepräparation erfolgte bei -80 °C. Am Tag vor dem Westernblot wurden sämtliche Proben zum besseren Gewebeaufschluss bei -80 °C mechanisch zerkleinert, bis zum Folgetag bei -80 °C zwischengelagert, anschließend

im Tissuelyser 2 × 30 s unter Verwendung von 60 µl Kraniaspuffer lysiert und bei 12 g für 5 min zentrifugiert.

### Zusammensetzung Kraniaspuffer:

2 ml Tris (1,5M; pH 8,8)

1 ml EDTA (0,5M)

6 ml NaF (500mM)

15 ml SDS (20%)

10 ml Glycerol (10%)

aufgefüllt auf 100 ml mit Aqua a.i.

### **2.2.6.2 Durchführung des Westernblots**

Die Aufbereitung der Proben sowie die Durchführung der Westernblots erfolgten maßgeblich durch unseren wissenschaftlichen Mitarbeiter Thomas Schulze. Die Proteine der Proben (Gewebepräparation) wurden über ein denaturierendes, diskontinuierliches Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecylsulfate*, SDS)-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zuerst wurde das Trenngel (8%) gegossen und nach dem Aushärten das Sammelgel (4%), in welchem durch einen Kamm Taschen zum Auftragen der Proben freigehalten wurden. Zur späteren Zuordnung der Proteingrößen wurde ein Molekulargewichtsstandard (Precision Plus All Blue) in eine Tasche geladen. Nach der Probenbeladung wurde die Elektrophorese mit einer Stromspannung von 80 V für 20 min gestartet und dann auf 120 V erhöht. Sobald die Lauffront die Unterkante des Trenngels erreicht hatte (nach ca. 100 min), wurde die Elektrophorese beendet und das Sammelgel vom Trenngel separiert.

### Trenngel (8%):

2,7 ml Acrylamid (30%, Mix 37,5:1)

4,6 ml Aqua a.i.

2,5 ml Tris HCl (1,5 M, pH 8,8)

0,1 ml SDS (10%)

0,1 ml Ammoniumpersulfat (10%)

0,6 µl N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)

### Sammelgel (4%):

0,85 ml Acrylamid (30%, Mix 37,5:1)

2,8 ml Aqua a.i.

1,25 ml Tris HCl (0,5 M, pH 6,8)

0,05 ml SDS (10%)

0,05 ml Ammoniumpersulfat (10%)

5 µl TEMED

### Laufpuffer:

3,02 g Tris

14,4 g Glycin

1 g SDS

ad 1000 ml Aqua a.i.

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch ein Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen bzw. geblottet. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei einem konstanten Gleichstrom von 400 mA. Eine Quellung des Gels wurde durch das im Transferpuffer enthaltene Methanol verhindert. Um die übergegangenen Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran für 2 min mit Ponceau S-Lösung gefärbt und die Höhe der Banden des Proteinstandards zur späteren Identifikation des Molekulargewichtes spezifisch gefärbter Banden dauerhaft markiert. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran mit TBS plus Tween 20<sup>®</sup> (0,1%, TBST) gewaschen und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen mit Trockenmilch-Lösung für 60 min inkubiert. Die Membran wurde mit TBST 0,1% (3 x 5 min) gewaschen. Die Inkubation mit dem verdünnten primären Antikörpern erfolgte über Nacht auf einem Rollenmischer bei 4 °C (verdünnt in 5% BSA in TBST 0,1%). Nach weiterer Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur und 3 x 10 min Waschen mit TBST (0,1%) folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h in Trockenmilch-Lösung bei Raumtemperatur. Der sekundäre Antikörper war gegen den ersten Antikörper gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettichs (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Anschließend wurde 3 x 5 min mit TBST (0,2%) gewaschen und die Membran mit dem *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* inkubiert. Dieses enthielt

ein Substrat der Peroxidase, das nach Umsetzung eine Chemolumineszenz zeigte. Zur Visualisierung wurden die Filme, je nach Stärke der Lumineszenz, für 1 bis 120 s belichtet und anschließend entwickelt. Eine quantitative Erfassung und Auswertung der Banden erfolgte mit der *Syngene Chemidoc*-Bildgebungs-Apparatur und Software.

### Transferpuffer:

3,03 g Tris  
14,4 g Glycin  
200 ml Methanol  
ad 1000 ml Aqua bidest

### Ponceaurot S-Lösung:

0,5 g Ponceaurot S  
1,0 ml Essigsäure (100%)  
ad 100 ml Aqua bidest

### 10 x TBS:

242,3 g Tris  
175,3 g NaCl  
ad 2000 ml Aqua bidest  
pH mit HCl auf 7,5 eingestellt

### TBST:

100 ml 10 × TBS  
1 ml Tween 20  
ad 1000 ml Aqua bidest

### Trockenmilch-Lösung:

5% Milchpulver in TBST

## **2.2.7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von FBMEs**

Die elektronenmikroskopische Aufbereitung der Proben erfolgte durch die *HEXT Core Facility Mousepathology* am Institut für Neuropathologie des UKEs. Die Analyse der Aufnahmen erfolgte durch Pradeep Luther am *National Heart and Lung Institut, Imperial College London* (<http://www1.ic.ac.uk/medicine/people/p.luther>). Hierfür wurden die FBMEs zunächst mehrfach mit PBS (w/o MgCl<sub>2</sub>, w/o CaCl<sub>2</sub>) gewaschen und anschließend 10 min in 30 mM 2,3-Butan-Dion-Monoxim (BDM in PBS) inkubiert, um zu gewährleisten, dass die Kardiomyozyten in den FBMEs vor der Fixierung vollständig relaxiert waren. Fixiert wurde anschließend in 2,5% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,4 mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>) über Nacht bei 4 °C. Die weitere Bearbeitung geschah durch das Institut für Neuropathologie. Von den in Epon eingebetteten FBMEs wurden Semidünnschnitte (1 µm) zur ersten Übersicht angefertigt und mit

Toluidinblau gefärbt. Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden im letzten Schritt Ultradünnschnitte (50 nm) angefertigt. Analysiert wurden serielle Längsschnitte der FBMEs.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die Daten werden präsentiert als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) oder als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (standard deviation, SD). Die Angaben wurden für den jeweiligen Fall aufgeführt. Mit n wurde die Anzahl der FBMEs bzw. Einzelversuche/-proben bezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test nach Student für gepaarte bzw. ungepaarte Versuchsreihen ermittelt. Die Analysen wurden mit der GraphPad Prism Software durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant bewertet.

### 3 Ergebnisse

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der kardiotoxischen Wirkung von ausgewählten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) anhand von Fibrin-basierten mini-EHTs (FBMEs). Den Kern dieser Beurteilung bildete die video-optische Analyse der FBMEs, anhand derer Veränderungen der Kontraktionsparameter in den Versuchsreihen analysiert wurden. Die video-optische *Screening*-Plattform (siehe 2.2.3) stellte eine reproduzierbare, standardisierte und objektive Möglichkeit dar, Charakteristika der Kontraktionsparameter, wie zum Beispiel Kontraktionskraft, Kontraktions- und Relaxationszeit, zu analysieren. Dieses Messsystem erlaubte aufgrund seiner Bauweise die Messung derselben FBMEs über mehrere Tage bis Wochen. Dadurch konnten Aussagen über die Langzeitwirkung bzw. verzögerte Effekte getroffen werden.

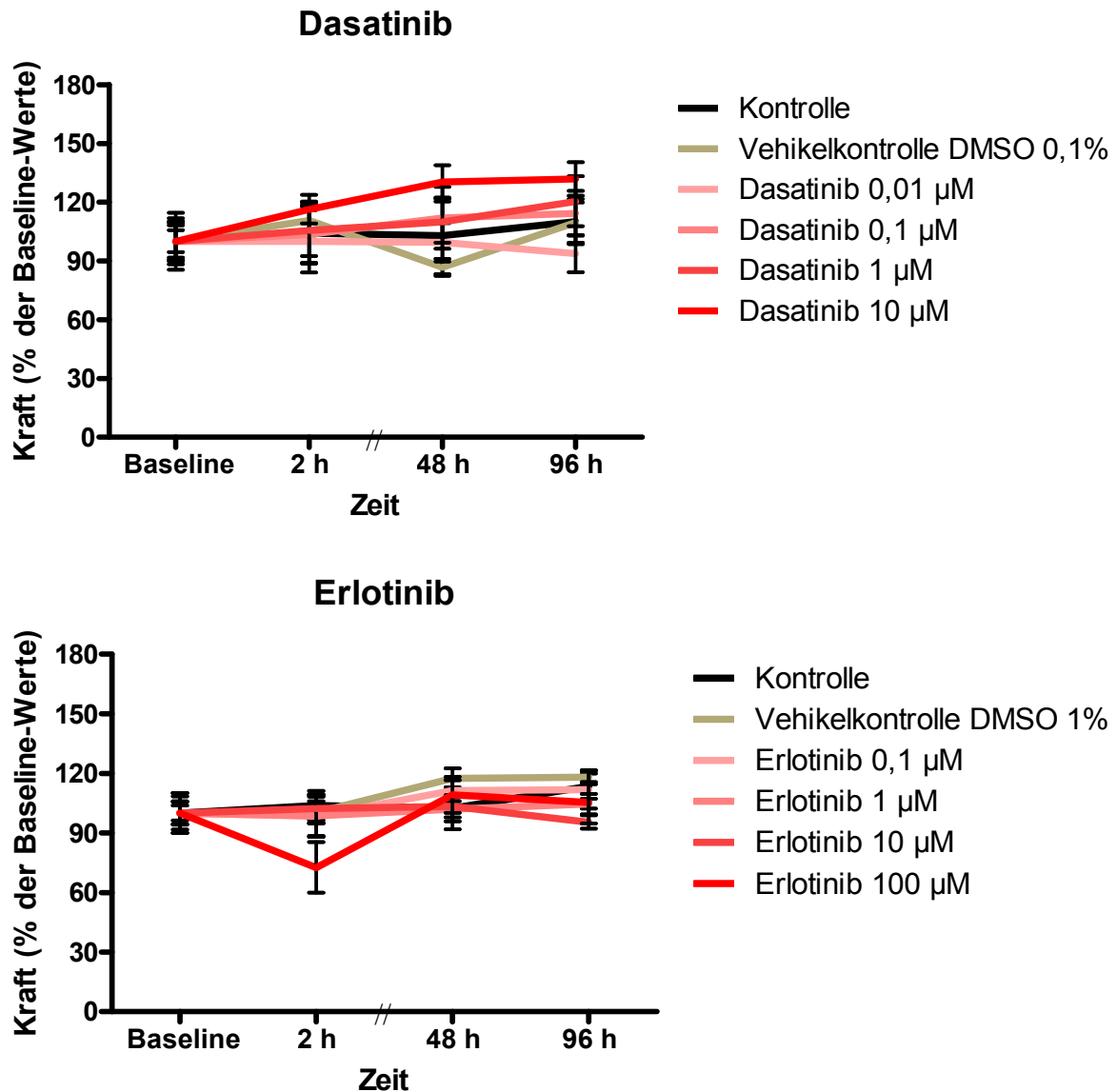
#### 3.1 Kontraktionsparameter

Zur Abbildung der LVDF als häufige UAW stellte sich die Kontraktionskraft als aussagekräftiger Parameter heraus. Außerdem zeigte sich in Pilotexperimenten, dass einige Substanzen zu einer schnellen Verminderung der Kontraktionskraft führten, weshalb ein Messprotokoll etabliert wurde, das vorsah, die Kontraktilität nicht nur nach 48 und 96 Stunden sondern auch schon 2 Stunden nach Inkubationsbeginn zu analysieren. Orientierend am  $C_{\max}$ -Wert sollten das 0,1fache, 1fache, 10fache und 100fache der  $C_{\max}$  untersucht werden. Die in 2.2.2.5 beschriebene geringe Löslichkeit der TKIs bedingte eine DMSO-Konzentration von 1% bei Erlotinib, Lapatinib, Lestaurtinib und Vandetanib. Bei Dasatinib, Gefitinib, Imatinib, Sorafenib und Sunitinib konnte die 0,1%ige Konzentration beibehalten werden. Die Ergebnisse der Kontraktionskraftmessungen legten eine Einteilung der TKIs in drei Kategorien nahe und werden dieser Einteilung entsprechend besprochen:

- (i) keine Verminderung der Kontraktionskraft (Dasatinib und Erlotinib)
- (ii) verzögert eintretende Verminderung der Kontraktionskraft (Eintritt der Wirkung  $\geq 48$  h; Gefitinib, Imatinib, Lapatinib und Sunitinib)
- (iii) akut eintretende Verminderung der Kontraktionskraft (Eintritt der Wirkung innerhalb von 2 h; Lestaurtinib, Sorafenib und Vandetanib)

### 3.1.1 TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung

Sowohl Dasatinib als auch Erlotinib zeigten bei keiner der untersuchten Konzentration eine Kontraktionskraftverminderung.



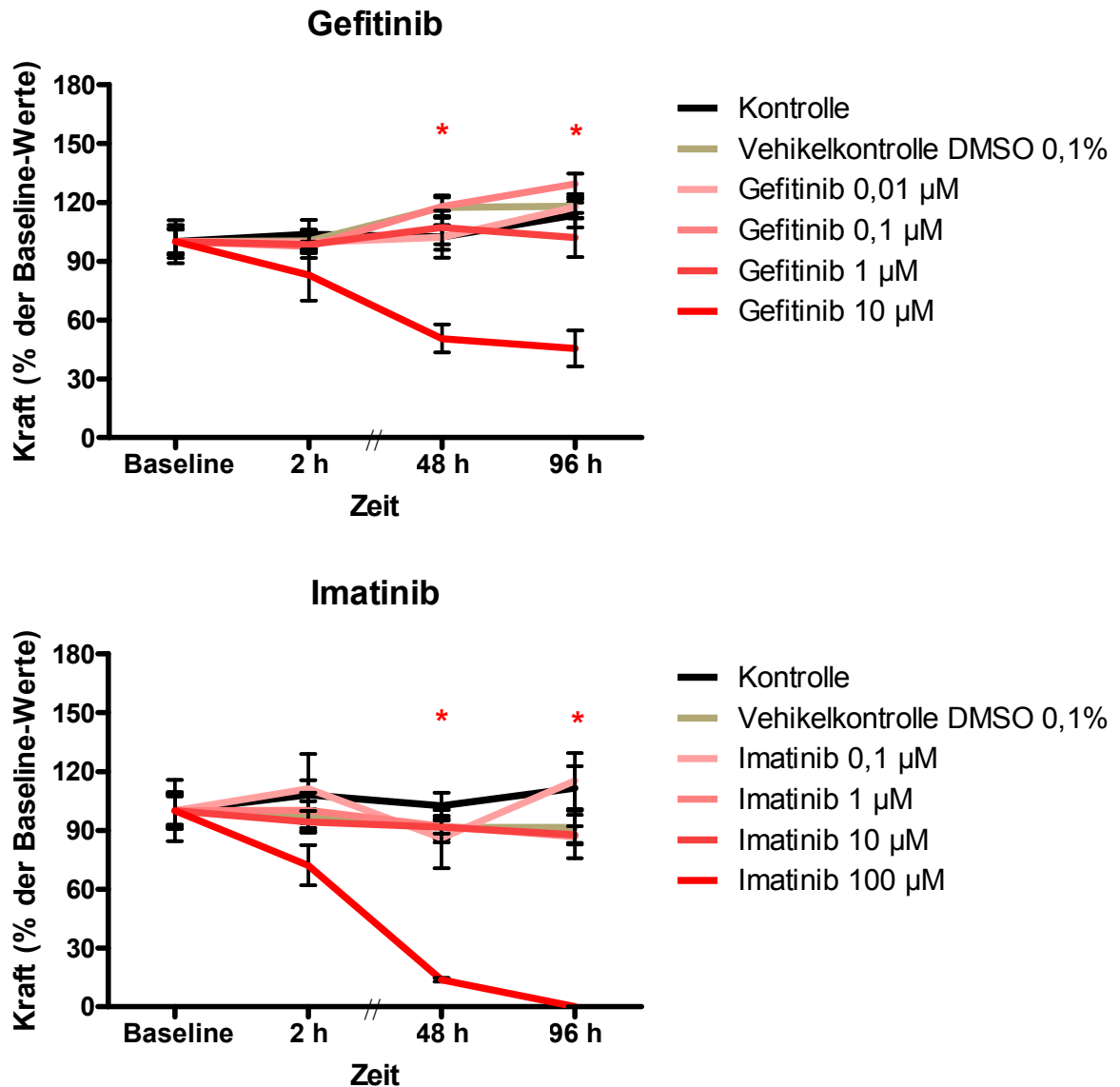
**Abb. 10: Darstellung der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung**

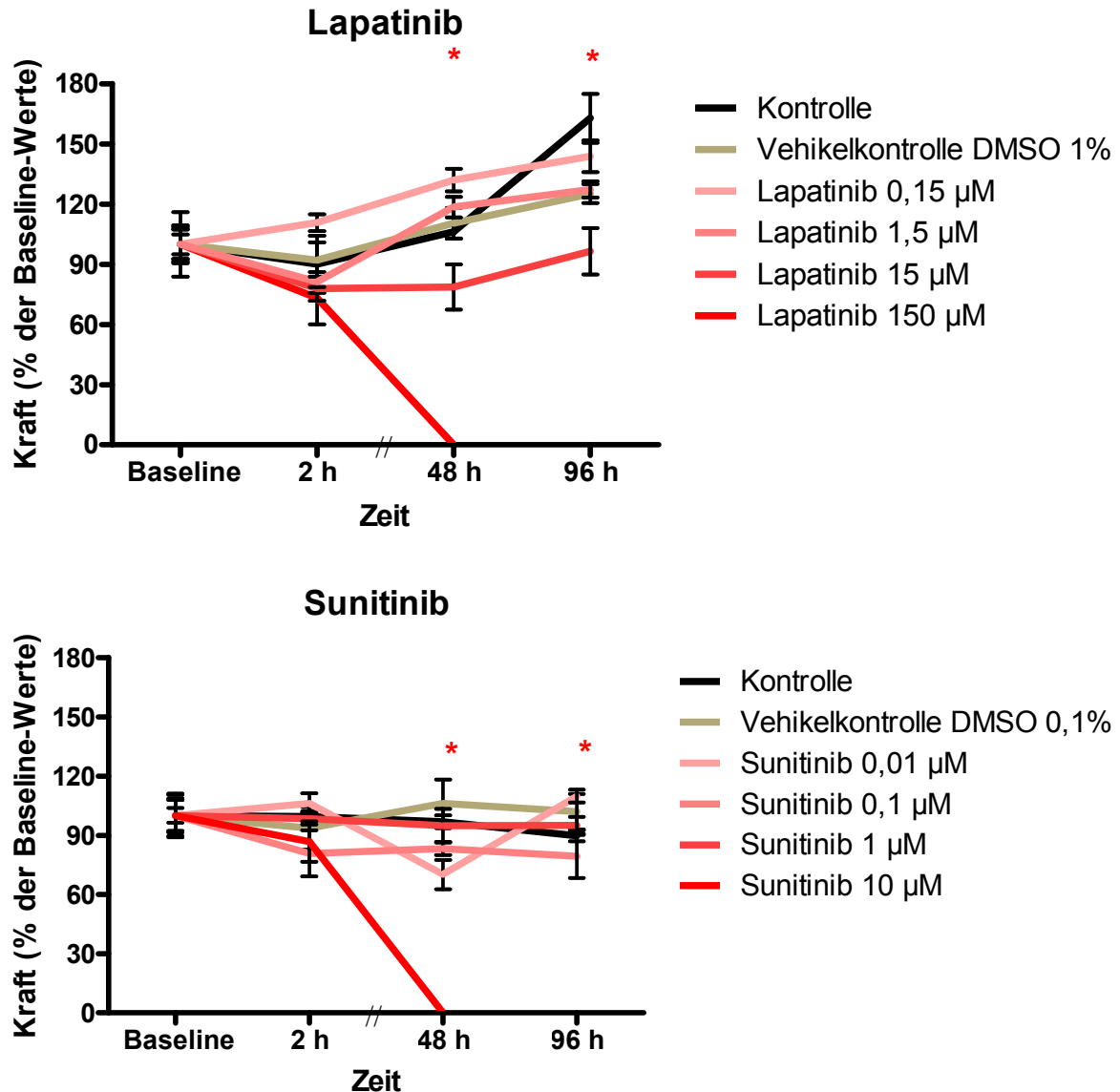
Dargestellt ist die Kraftentwicklung für Dasatinib und Erlotinib in Prozent des Baseline-Wertes (BL-Wert) zu den Messzeitpunkten 2 h, 48 h und 96 h (Standardabweichung:  $\pm$ -SEM;  $n = 4$ ; Students t-Test für ungepaarte Messungen, \*  $p < 0,05$  versus Baseline).

### 3.1.2 TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung

Gefitinib, Imatinib, Lapatinib und Sunitinib wiesen Veränderungen der Kontraktionskraft nach 48 und 96 h auf. In allen vier Fällen traf dies nur für die

höchste Konzentration zu, während alle anderen Konzentrationen keinen Unterschied zu den Vehikelkontrollen zeigten. Nach 48 h wiesen die FBMEs Kontraktionskraftverminderungen unter Gefitinib 10  $\mu\text{M}$  auf 50% und unter Imatinib auf 13% auf, während es unter Lapatinib 150  $\mu\text{M}$  und Sunitinib 10  $\mu\text{M}$  bereits zu einem vollständigen Kontraktionskraftverlust gekommen war. Nach 96 h zeigte sich dieser auch für Imatinib 100  $\mu\text{M}$ , wohingegen die Kontraktionskraftverminderung von Gefitinib 10  $\mu\text{M}$  mit 45% nahezu konstant blieb.





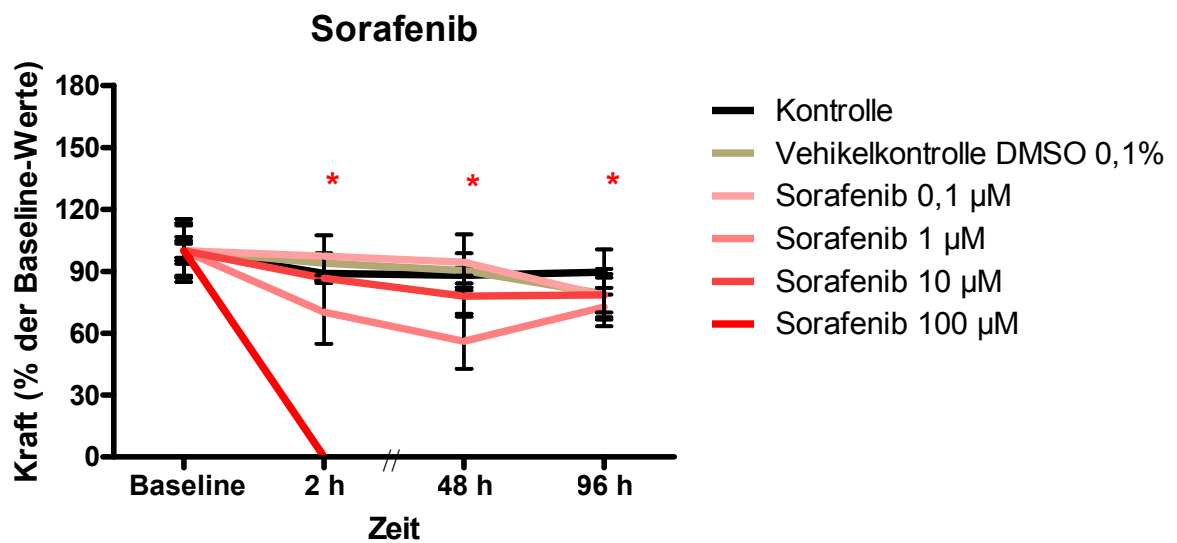
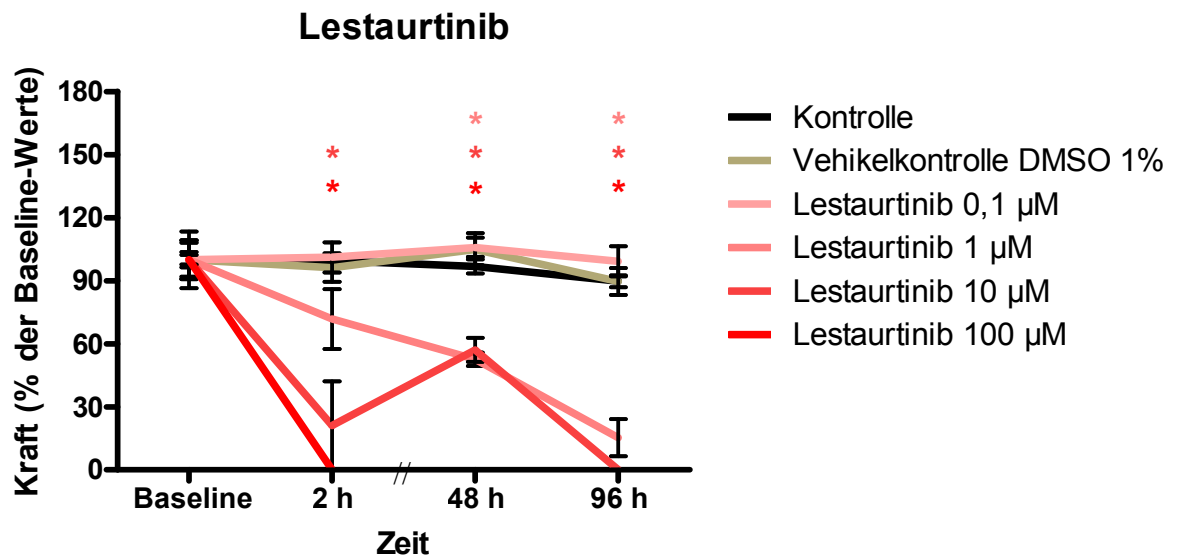
**Abb. 11: Darstellung der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung**

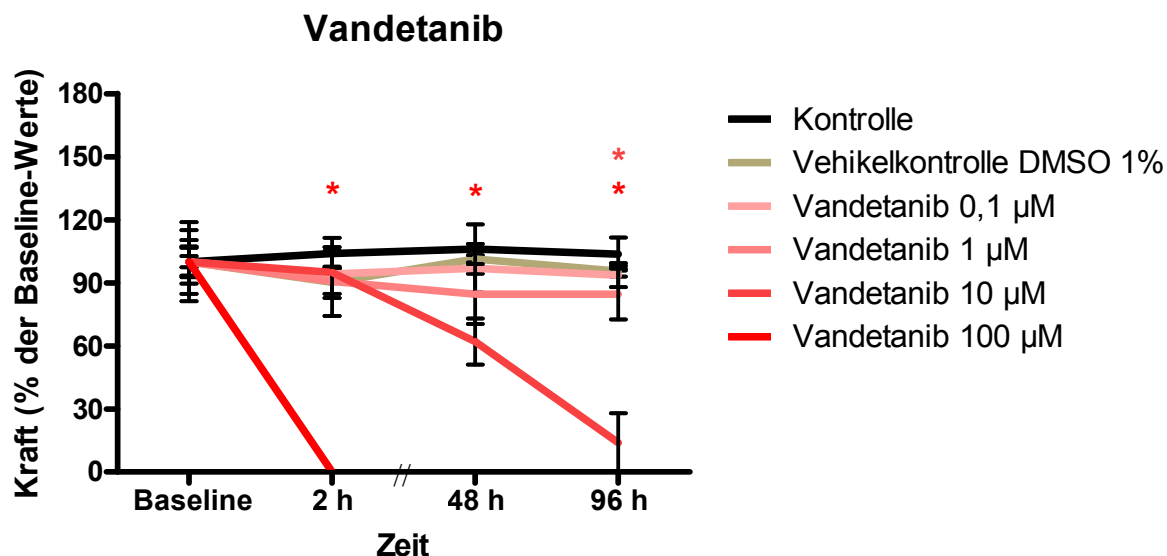
Nach 48 h wiesen die FBMEs unter Inkubation mit der höchsten Konzentration der TKIs Gefitinib, Imatinib, Lapatinib und Sunitinib eine Verminderung der Kontraktionskraft auf (Standardabweichung:  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ; Students t-Test für gepaarte Messungen, \*  $p < 0,05$  versus Baseline).

### 3.1.3 TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung

Lestaurtinib, Sorafenib und Vandetanib führten zu einer Reduktion der Kontraktionskraft nach 2 Stunden. Im Fall von Vandetanib 100  $\mu\text{M}$  wurde ein Abfall der Kontraktionskraft auf 0% nach 2 h und unter 10  $\mu\text{M}$  ein Abfall auf 14% nach 96 h beobachtet. Alle anderen Konzentrationen zeigten keine Veränderungen im Beobachtungszeitraum. Im Fall von Lestaurtinib 100  $\mu\text{M}$  wurde ein Abfall der Kontraktionskraft auf 0% und unter 10  $\mu\text{M}$  auf 21% nach 2 h nachgewiesen. Nach

48 h zeigte sich zusätzlich ein Abfall unter der 1  $\mu\text{M}$  Konzentration auf 53%. Die Kontraktionskraftverminderung erwies sich als progredient und fiel nach 96 h unter 10  $\mu\text{M}$  auf 0% und für 1  $\mu\text{M}$  auf 15%.





**Abb. 12: Darstellung der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung**

Nach 2 h wiesen die FBMEs unter Inkubation mit der höchsten Konzentration der TKIs Lestaurtinib, Sorafenib und Vandetanib keine Kontraktionskraft mehr auf. Ebenso zeigten niedrigere Konzentrationen von Lestaurtinib (1 µM, 10 µM) und Vandetanib (10 µM) eine Kontraktionskraftverminderung (Standardabweichung:  $\pm$  SEM; n = 4; Students t-Test für gepaarte Messungen, \*  $p < 0,05$  versus Baseline).

Abschließend zeigt Tabelle 5 einen Überblick des Verlaufes der Kontraktionskraftveränderungen aller neun TKIs.

| TKI                 | Baseline | Entwicklung der Kontraktionskraft nach |          |          |
|---------------------|----------|----------------------------------------|----------|----------|
|                     |          | 2h                                     | 48 h     | 96 h     |
| Erlotinib 100 µM    | 100%     | 72,60%                                 | 109,10%  | 105,20%  |
| Dasatinib 10 µM     | 100%     | 116,40%                                | 130,30%  | 131,70%  |
| Gefitinib 10 µM     | 100%     | 82,80%                                 | 50,50% * | 45,50% * |
| Imatinib 100 µM     | 100%     | 72%                                    | 13,70% * | 0% *     |
| Lapatinib 150 µM    | 100%     | 73,20%                                 | 0% *     | 0% *     |
| Sunitinib 10 µM     | 100%     | 86,70%                                 | 0% *     | 0% *     |
| Lestaurtinib 100 µM | 100%     | 0% *                                   | 0% *     | 0% *     |
| Lestaurtinib 10 µM  | 100%     | 21% *                                  | 57% *    | 0% *     |
| Lestaurtinib 1 µM   | 100%     | 71,80%                                 | 52,60% * | 15,40% * |
| Sorafenib 100 µM    | 100%     | 0% *                                   | 0% *     | 0% *     |
| Vandetanib 100 µM   | 100%     | 0% *                                   | 0% *     | 0% *     |
| Vandetanib 10 µM    | 100%     | 95%                                    | 62% *    | 14% *    |

**Tab. 5: Überblick des zeitlichen Verlaufes der Kontraktionskraftentwicklung aller TKIs**

Gezeigt sind die höchsten Konzentrationen der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung (Erlotinib 100 µM, Dasatinib 10 µM) sowie die Konzentrationen der weiteren TKIs, die mit

einer Kontraktionskraftverminderung einhergingen. Die Kraftentwicklung der FBMEs ist als Prozentsatz (%) der Baseline-Werte (BL-Wert) nach 2 h, 48 h und 96 h dargestellt (\*  $p < 0,05$  versus Baseline).

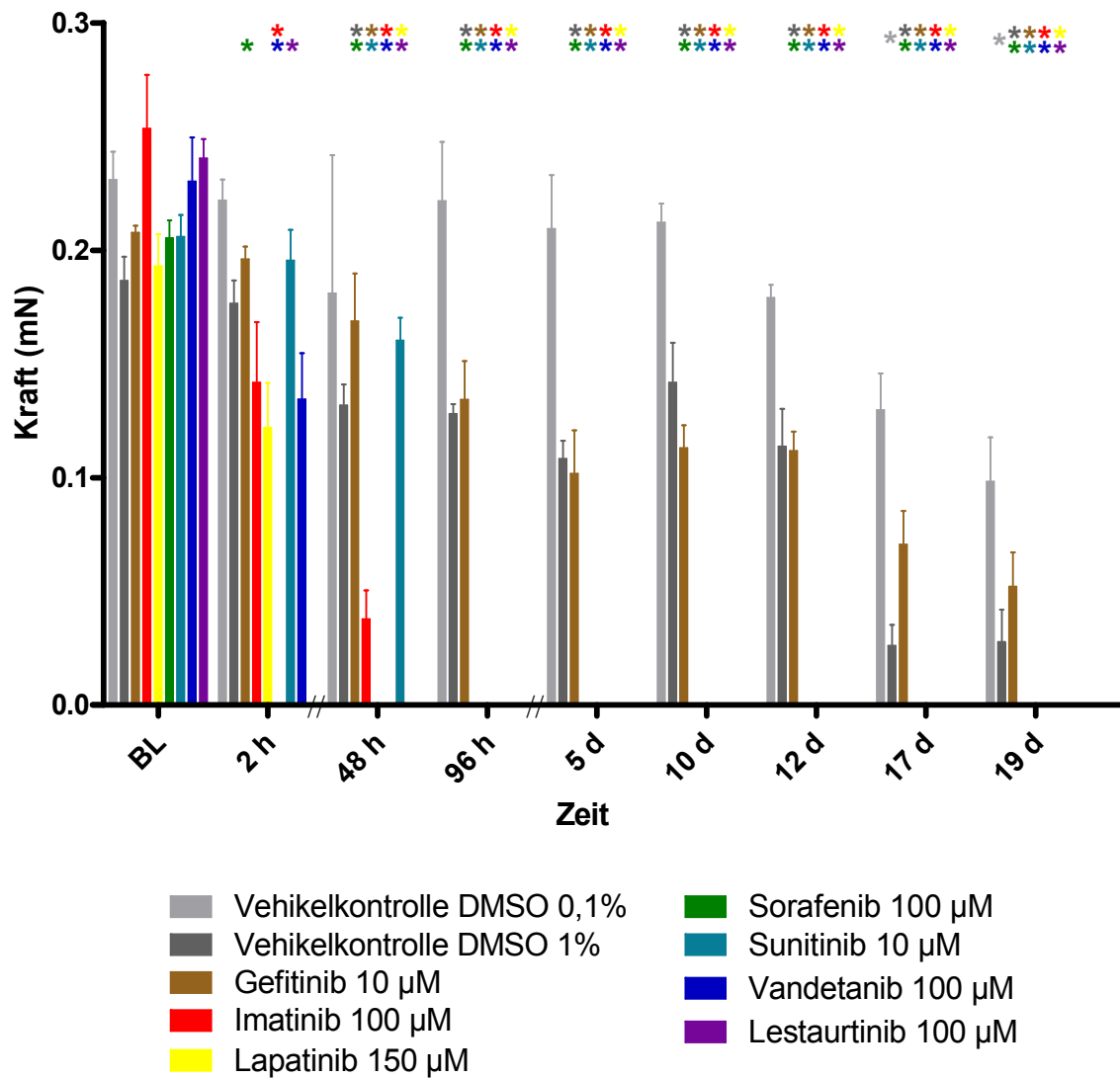
### **3.1.4 Reversibilität der Kontraktionskraftverminderung**

Die bisherige Analyse wirft zwei Fragen auf. Einerseits, ob die Kontraktionskraftverminderung reversibel ist, und andererseits, ob sie nach der 96-stündigen Inkubation noch weiter zunehmen würde.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde die 96-stündige Inkubationphase um eine 15-tägige Reversibilitätsphase erweitert. Für diese Fragestellung wurden die sieben Substanzen mit Kontraktionskraftverminderung nur in den Konzentrationen untersucht, die zuvor eine Verminderung gezeigt hatten. Bei den mitgeführten DMSO-Kontrollen erfolgte, ebenso wie bei den mit TKIs behandelten FBMEs, die Auswaschung der hinzugegebenen Substanz nach der 96-stündigen Inkubationsphase. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in zwei Teilen. Zum einen für Substanzen, bei denen keine Reversibilität der Kontraktionskraftverminderung beobachtet wurde (Abb. 13), zum anderen für Substanzen, für die eine (partielle) Reversibilität der Kontraktionskraftverminderung gesehen wurde (Abb. 14).

#### **3.1.4.1 TKIs mit irreversibler Kontraktionskraftverminderung**

Unter Lestaurtinib 100  $\mu\text{M}$ , Sorafenib 100  $\mu\text{M}$  und Vandetanib 100  $\mu\text{M}$  wurde nach 2 h, für Lapatinib 150  $\mu\text{M}$  nach 48 h und für Imatinib 100  $\mu\text{M}$  und Sunitinib 10  $\mu\text{M}$  ein Kontraktionskraftverlust nach 96 h festgestellt. Gefitinib 10  $\mu\text{M}$  zeigte eine Kontraktionskraftverminderung auf 81% nach 48 h und auf 65% nach 96 h. Während der anschließenden Reversibilitätsphase kam es nie zur Erholung oder Normalisierung der Kontraktilität, wenn es zuvor zu einem Verlust der Kontraktionskraft gekommen war. Auch die relativ milde Kontraktionskraftverminderung unter Gefitinib 10  $\mu\text{M}$  blieb in der Reversibilitätsphase (Kontraktionsverlust um 51% von 5 d bis 19 d) im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Kontraktionsverlust um 47% von 5 d bis 19 d) unverändert bestehen.



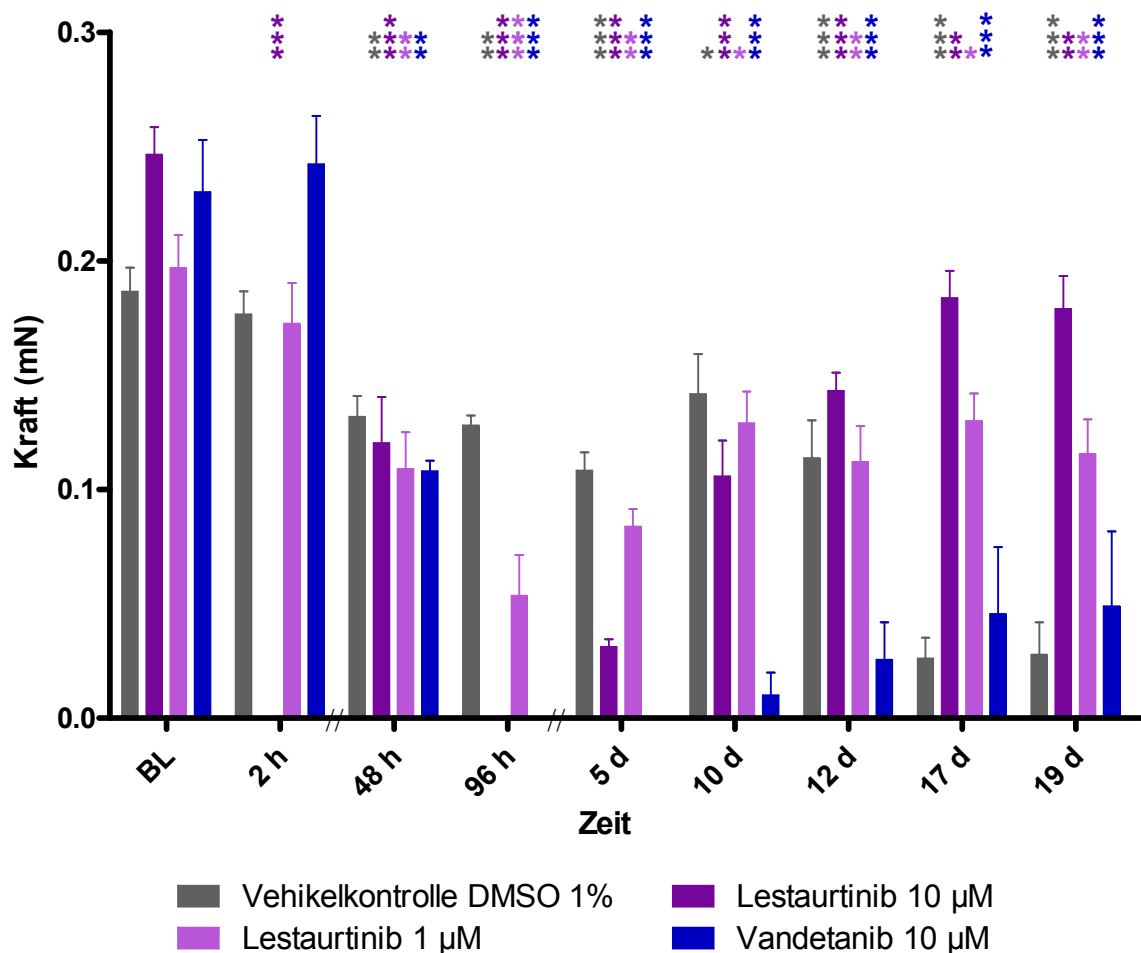
**Abb. 13: Untersuchung von TKIs mit irreversibler Kontraktionskraftverminderung**

Gezeigt ist die Kontraktionskraft der FBMEs in der Interventions- und Reversibilitätsphase (Abszisse: Zeit in h bzw. d; Ordinate: Kraftentwicklung in mN; Standardabweichung: +/- SEM; n = 4; Students t-Test für gepaarte Messungen, \* p<0,05 versus Baseline).

### 3.1.4.2 TKIs mit reversibler Kontraktionskraftverminderung

Bei zwei der neun TKIs wurde eine partielle Reversibilität der Kontraktionskraftverminderung beobachtet. Während es unter Lestaurtinib 1 µM nach 96 h zu einer Kontraktionskraftverminderung auf 27% kam, trat diese unter Lestaurtinib 10 µM bereits nach 48 h auf (49%) und ging nach 96 h in einen kompletten Verlust der Kontraktionskraft über. Nach einem Tag Auswaschen (5 d) hatte sich die Kraft unter Lestaurtinib 1 µM von 27% auf 43% der Ausgangslage, bei Lestaurtinib 10 µM von

0% auf 13% gesteigert. Dies nahm bis Tag 19 auf 59% bei 1  $\mu\text{M}$  und 73% bei 10  $\mu\text{M}$  zu. Unter Vandetanib 10  $\mu\text{M}$  kam es nach 96 h zu einem Kontraktionsverlust. Am 10. Tag der Inkubation unter Kontrollbedingungen zeigten die FBMEs unter Vandetanib 10  $\mu\text{M}$  wieder eine Kontraktionskraft von 4%. Sie stieg im Verlauf auf 21% an (19 d). Auffällig war die Kontraktionskraftverminderung unter der Vehikelkontrolle DMSO 1% nach 48 h und 96 h ( $p < 0,01$ ). Die Abbildung 14 verdeutlicht die von DMSO unabhängigen Veränderungen unter Lestaurtinib 1  $\mu\text{M}$  (96 h), 10  $\mu\text{M}$  (48 h) und Vandetanib 10  $\mu\text{M}$  (96 h), deren Signifikanzniveau bei  $p < 0,001$  liegt.

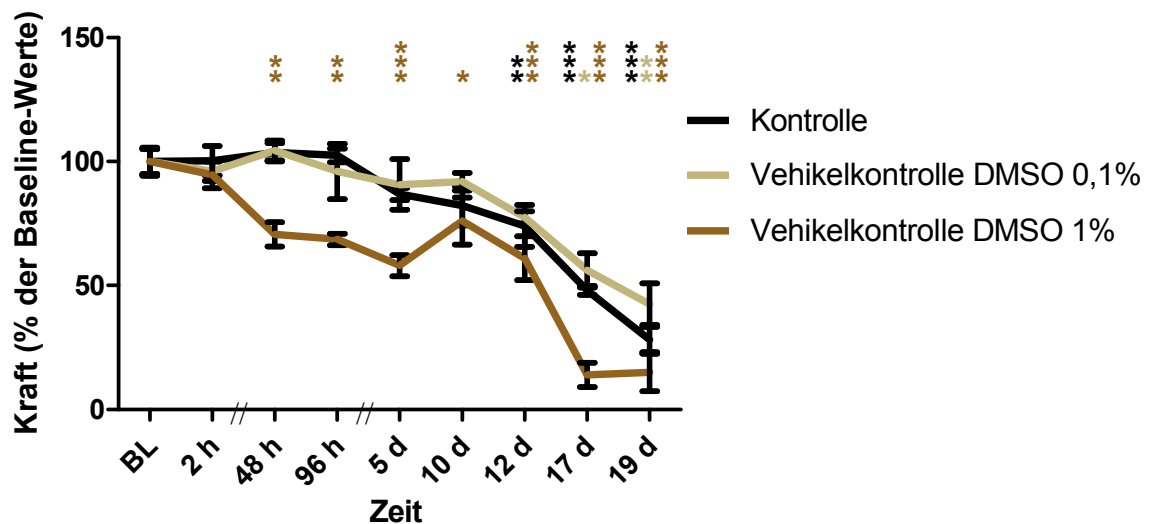


**Abb. 14: Untersuchung von TKIs mit reversibler Kontraktionskraftverminderung**

Dargestellt sind die TKIs mit einer reversiblen Kontraktionskraftverminderung. Nach einer 96-stündigen Inkubationsphase erfolgte eine Beobachtungsphase in Abwesenheit der TKIs oder DMSO (Vehikelkontrolle) für 15 Tage (Standardabweichung:  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ; Students t-Test für gepaarte Messungen, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  versus Baseline).

### 3.1.4.3 Unterschiede zwischen den Vehikelkontrollen

Da in den unter 3.1.4.1 dargestellten Versuchen eine Kontraktionskraftverminderung durch das Lösungsmittel DMSO in der 1%igen Konzentration auffiel, soll dieser Effekt genauer dargestellt werden. Abbildung 15 zeigt den Verlauf der Kontraktionskraft von unbehandelten FBMEs und solchen in Gegenwart von 0,1% oder 1% DMSO. Hierbei zeigte sich ein zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt der 1%igen DMSO Konzentration auf die Kontraktionskraft der FBMEs (Beginn nach 48 h). Die Abbildung 15 macht aber auch deutlich, dass es unter Kontrollbedingungen zu einer Abnahme der Kraft über die Zeit kommt und dass DMSO 0,1% keinen Effekt auf die Kraft im Vergleich zur Kontrolle hatte.



#### Abb. 15: Vergleich von Kontrolle und Vehikelkontrolle

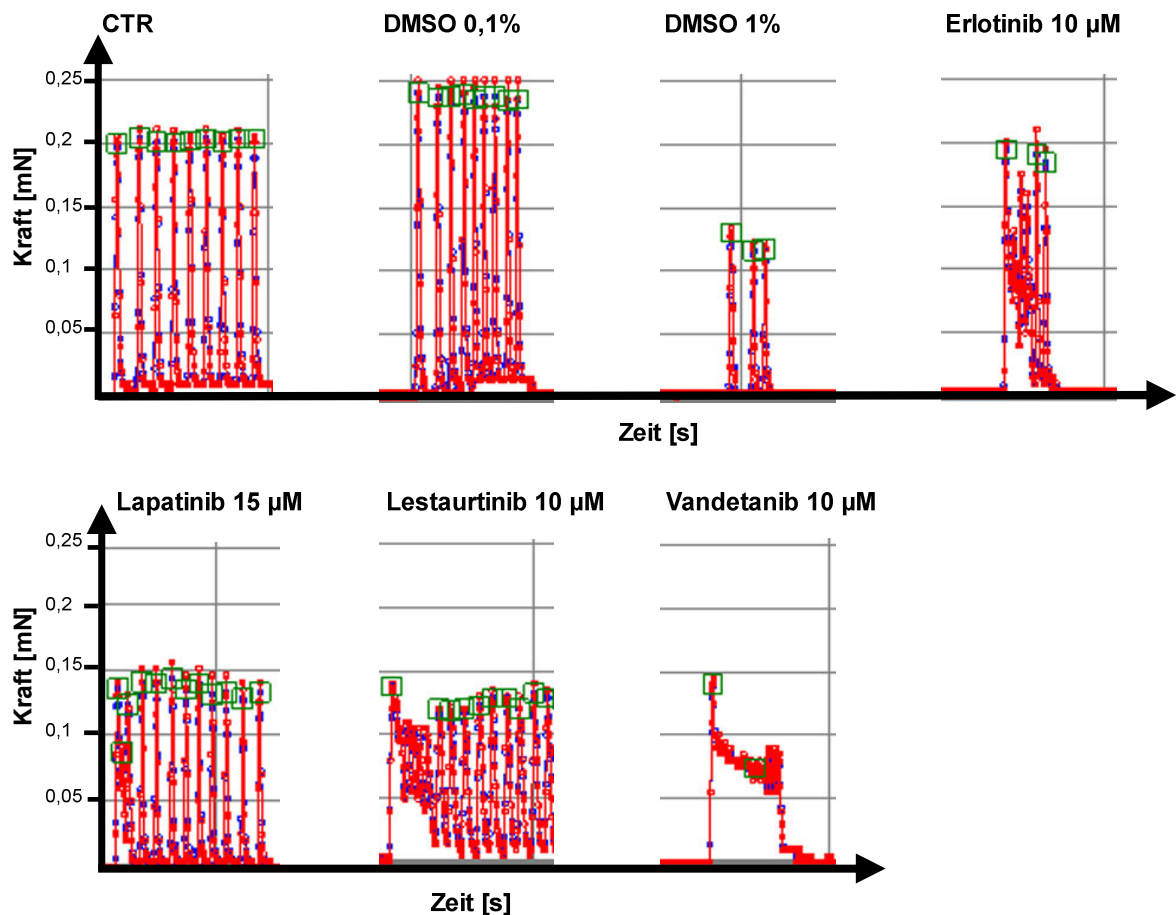
Dargestellt ist die Kraftentwicklung in Prozent vom BL-Wert der FBMEs unter Kontrollbedingungen, 0,1% und 1% DMSO (Vehikelkontrollen) (Abszisse: Zeit in h bzw. d; Ordinate: Kraftentwicklung in % vom BL-Wert; Standardabweichung:  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ; Students t-Test für gepaarte Messungen, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  versus Baseline).

### 3.1.5 Kontraktions- und Relaxationszeit

Die Kontraktions (T1)- und Relaxationszeit (T2) zeigen keinen Unterschied zwischen den Kontrollen und den Vehikelkontrollen (Abb. 16). Es wurde weder in der Interventionsphase noch in der Phase der Reversibilität eine Veränderung des Kontraktionsmusters beobachtet. Bei vier der neun ausgewählten TKIs zeigten sich Veränderungen des Kontraktionsmusters, woraufhin diese näher untersucht wurden.

### 3.1.5.1 Veränderungen der Kontraktions- und Relaxationszeit

Es wurde festgestellt, dass vier TKIs das Kontraktionsmuster auffällig veränderten. Die Veränderungen der FBMEs unter Erlotinib, Lapatinib, Lestaurtinib und Vandetanib waren charakterisiert durch eine deutlich verlängerte T2-Zeit bei unveränderter T1-Zeit. Die Veränderungen traten teilweise intermittierend zwischen normal geformten Kontraktionspeaks auf. Exemplarisch sind 10-sekündige Ausschnitte jeweils eines FBMEs der Kontrolle, der Vehikelkontrollen und der vier TKIs in der zweithöchsten Konzentration zum Zeitpunkt 48 h dargestellt (Abb. 16).



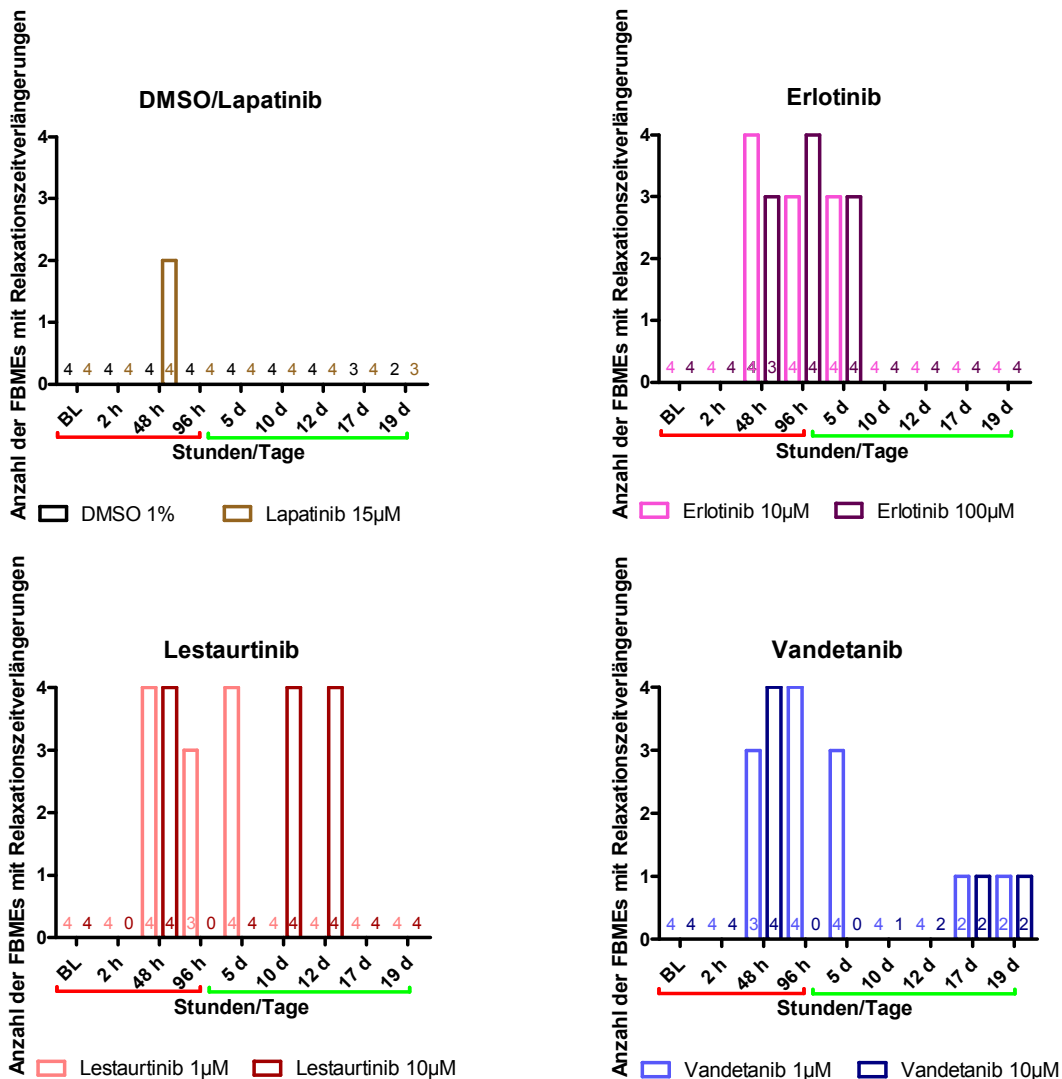
**Abb. 16: Kontraktionsmuster repräsentativer FBMEs der Kontrollen und der TKIs**

Gezeigt sind 10-sekündige (Originaldaten 60 s) Ausschnitte aus Kontraktionsmustern repräsentativer FBMEs zum Zeitpunkt 48 h der TKI-Inkubation (Abszisse: Zeit in s; Ordinate: Kraftentwicklung in mN).

### 3.1.5.2 Reversibilität der Veränderungen der Relaxationszeit

Das Auftreten verlängerter Relaxationszeiten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Konzentration der TKIs ist in Abbildung 17 dargestellt. Nicht abgebildete

Konzentrationen zeigten keine Relaxationszeitverlängerung. Hiernach bestand eine deutliche Abhängigkeit der Relaxationszeitverlängerung von der Inkubationszeit und der Konzentration der TKIs. Um zu überprüfen, ob diese Veränderungen reversibel waren, wurde wie in 3.1.4 beschrieben unter Kontrollbedingungen weiter inkubiert. Im Falle von Erlotinib, Lapatinib und Lestaurtinib waren diese Verlängerungen reversibel, im Falle von Vandetanib nicht (Abb. 17).



**Abb. 17: Häufigkeit und Reversibilität von Veränderungen des Kontraktionsmusters**

Die Graphik beschreibt für jeden Messzeitpunkt die Anzahl der kontrahierenden FBMEs (Zahlen im Säulendiagramm). Die Interventionsphase ist auf der Abszisse rot, die Phase der Reversibilität grün markiert (Abszisse: Zeit in h bzw. d; Ordinate: Anzahl der FBMEs, die eine Relaxationszeitverlängerung aufzeigten, n = 4).

Zusammengefasst führten alle hier aufgezeigten TKIs zumindest in der Interventionsphase zu einer Veränderung des Kontraktionsmusters, die bei keiner der Kontrollen beobachtet werden konnte. Auffällig war, dass diese Veränderungen nur unter TKIs auftraten, die in DMSO 1% gelöst waren. Lapatinib zeigte dabei weniger stark ausgeprägte und seltenere Veränderungen, die bereits in der Phase der Reversibilität nicht mehr auftraten. Eine Normalisierung des Kontraktionsmusters wurde für Erlotinib 10  $\mu$ M (10 d) und 100  $\mu$ M (10 d), für Vandetanib 1  $\mu$ M (10 d) und 10  $\mu$ M (12 d) sowie für Lestaurtinib 1  $\mu$ M (10 d) und 10  $\mu$ M (17 d) zu späteren Zeitpunkten beobachtet. Trotz der beschriebenen Normalisierung trat bei beiden Konzentrationen von Vandetanib zum Zeitpunkt 17 d und 19 d erneut eine Veränderung des Kontraktionsmusters auf, weshalb die Verlängerung der Relaxationszeit unter Vandetanib als nicht reversibel eingestuft wurde.

### 3.2 Histologie

Von den FBMEs unter Kontroll- und Interventionsbedingungen wurden nach 96-stündiger Inkubation Hämatoxylin-Eosin (H.E.)- und immunhistochemisch-gefärbte Paraffinschnitte angefertigt (siehe 2.2.4). Für die immunhistochemische Färbung wurde zum einen ein Antikörper verwendet, der gegen das sarkomerische Actin von Rattenkardiomyozyten gerichtet war. Mit dieser Färbung ließen sich Kardiomyozyten durch die typische Querstreifung identifizieren. Zum anderen wurde ein Antikörper gegen Connexin-43 verwendet. Dies ist ein wichtiger Bestandteil der *Gap Junctions*. In einem funktionellen Synzytium, wie es für eine gleichmäßige Kontraktion notwendig ist, ist dieses Protein essentiell.

#### 3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Repräsentative H.E.-Färbungen sind in Abbildung 13 dargestellt. Untersucht wurde neben den Kontrollen die höchste und zweithöchste Konzentration der TKIs. Dargestellt ist die höchste Konzentration. Die H.E.-Übersichtsfärbung der Kontrolle bzw. Vehikelkontrollen zeigte ein im Präparat nahezu gleichmäßig ausgebildetes Zellnetzwerk, zu erkennen durch die rosa-violette Färbung, welche sich von der Fibrinmatrix (hellrosa) abgrenzte. Die Zellkerne wurden blau gefärbt. Die meisten Zellen waren entlang der Kraftlinien lang ausgestreckt und miteinander verbunden.

Die Zahl runder, amorpher und dissoziiert voneinander in der Fibrinmatrix liegender Zellen war relativ gering.

### **3.2.1.1 Histologische Analyse der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung**

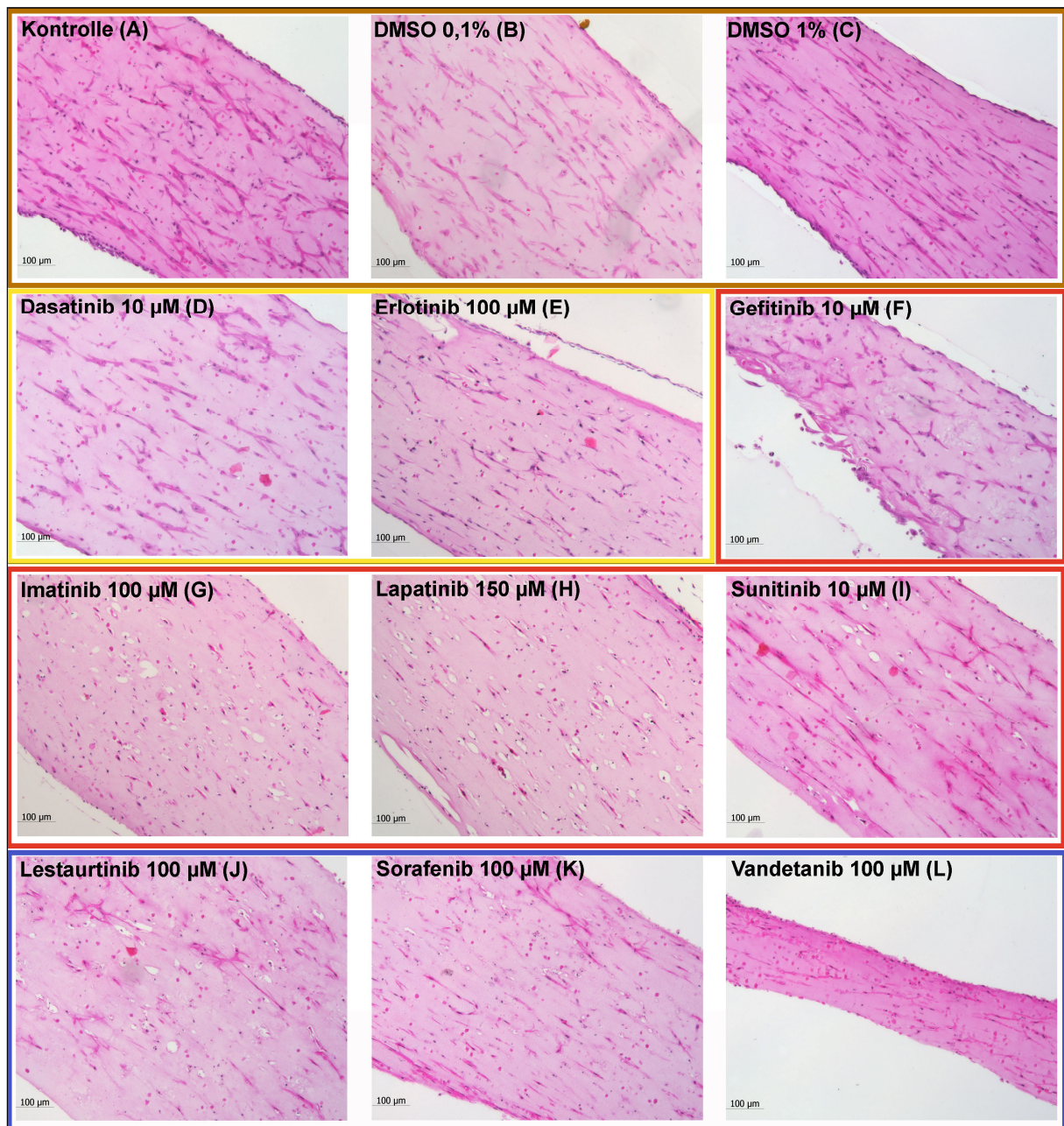
Die H.E.-Übersichtsfärbung unter Dasatinib zeigte ein gleichmäßig ausgebildetes Zellnetzwerk ähnlich den Kontrollen. Unter Erlotinib 100  $\mu$ M war die Zellstruktur insgesamt weniger dicht als bei den Kontrollen. Die Zahl runder, amorpher Zellen erschien nicht abweichend zu sein. Die Kardiomyozyten waren allerdings weniger lang ausgestreckt bzw. miteinander vernetzt. Die Ausrichtung der Zellen entlang der Kraftlinien war ähnlich den Kontrollen (Abb. 18).

### **3.2.1.2 Histologische Analyse der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung**

Die H.E.-Übersichtsfärbung machte deutlich, dass die Zellnetzwerkdichte des FBMEs unter den höchsten Konzentrationen von Lapatinib und Imatinib geringer war als in den Kontrollen. Die Zahl runder, amorpher und dissoziiert voneinander in der Fibrinmatrix liegender Zellen dominierte die Aufnahmen. Das Volumen des Zytosols der Kardiomyozyten war deutlich geringer. Anders verhielt es sich mit Sunitinib und insbesondere Gefitinib, wo klare Unterschiede zu den Kontrollen nicht erkennbar waren (Abb. 18). Die histologischen Präparate der nächstniedrigeren Konzentration aller vier TKIs zeigten diese Veränderungen nicht (nicht abgebildet).

### **3.2.1.3 Histologische Analyse der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung**

Für Lestaurtinib, Sorafenib und Vandetanib war das Verhältnis von langgestreckten und untereinander vernetzten Zellen deutlich zu amorphen und dissoziierten Zellen verschoben (Abb. 18). Dies war für Lestaurtinib auch schon in der zweithöchsten Konzentration (10  $\mu$ M) festzustellen (nicht gezeigt). Für Vandetanib und Sorafenib wurde diese Veränderung der Zellstruktur nur in der höchsten Konzentration festgestellt.



### Abb. 18: Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung

Dargestellt sind die H.E. Übersichtsfärbungen (10fache Vergrößerung) der FBMEs. Die farbliche Umrahmung bezieht sich auf folgende Einteilung:

|       |                                                                 |
|-------|-----------------------------------------------------------------|
| Braun | -Kontrolle (A) und Vehikelkontrollen (DMSO 0,1%, B; DMSO 1%, C) |
| Gelb  | -Keine Kontraktionskraftverminderung (D, E)                     |
| Rot   | -Verzögerte Kontraktionskraftverminderung (F, G, H, I)          |
| Blau  | -Akute Kontraktionskraftverminderung (J, K, L)                  |

### 3.2.2 Immunhistochemische Färbung gegen sarkomerisches Actin

Durch die H.E.-Färbung wurde die Zellstruktur beurteilt, jedoch war keine Differenzierung zwischen Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten möglich. Dies

ermöglichte die immunhistochemische Färbung gegen das sarkomerische Actin. Die Kardiomyozyten waren zu erkennen durch die dunkelbraun-rötliche Färbung, welche sich von der Fibrinmatrix abgrenzte. Die Zellkerne waren durch die Gegenfärbung blau-gräulich dargestellt. Im Folgenden sind Aufnahmen mit vierzigfacher Vergrößerung dargestellt, die die Querstreifung erkennen lassen (Abb. 19). Dargestellt sind wieder die Resultate für die höchsten Konzentrationen. Querstreifung war auch unter Kontrollbedingungen nicht in jeder Zelle zu sehen, die dunkelbraun-rötliche Anfärbung hingegen schon. Deswegen wurde sie allein als Beurteilungskriterium herangezogen. Abbildung 19 zeigt, dass zwischen Kontrolle und Vehikelkontrolle kein Unterschied bestand.

### **3.2.2.1 Histologische Analyse der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung**

Die 40fache Vergrößerung der Actin-Färbung zeigte für Dasatinib 10  $\mu\text{M}$  und Erlotinib 100  $\mu\text{M}$  keine Veränderungen (Abb. 19).

### **3.2.2.2 Histologische Analyse der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung**

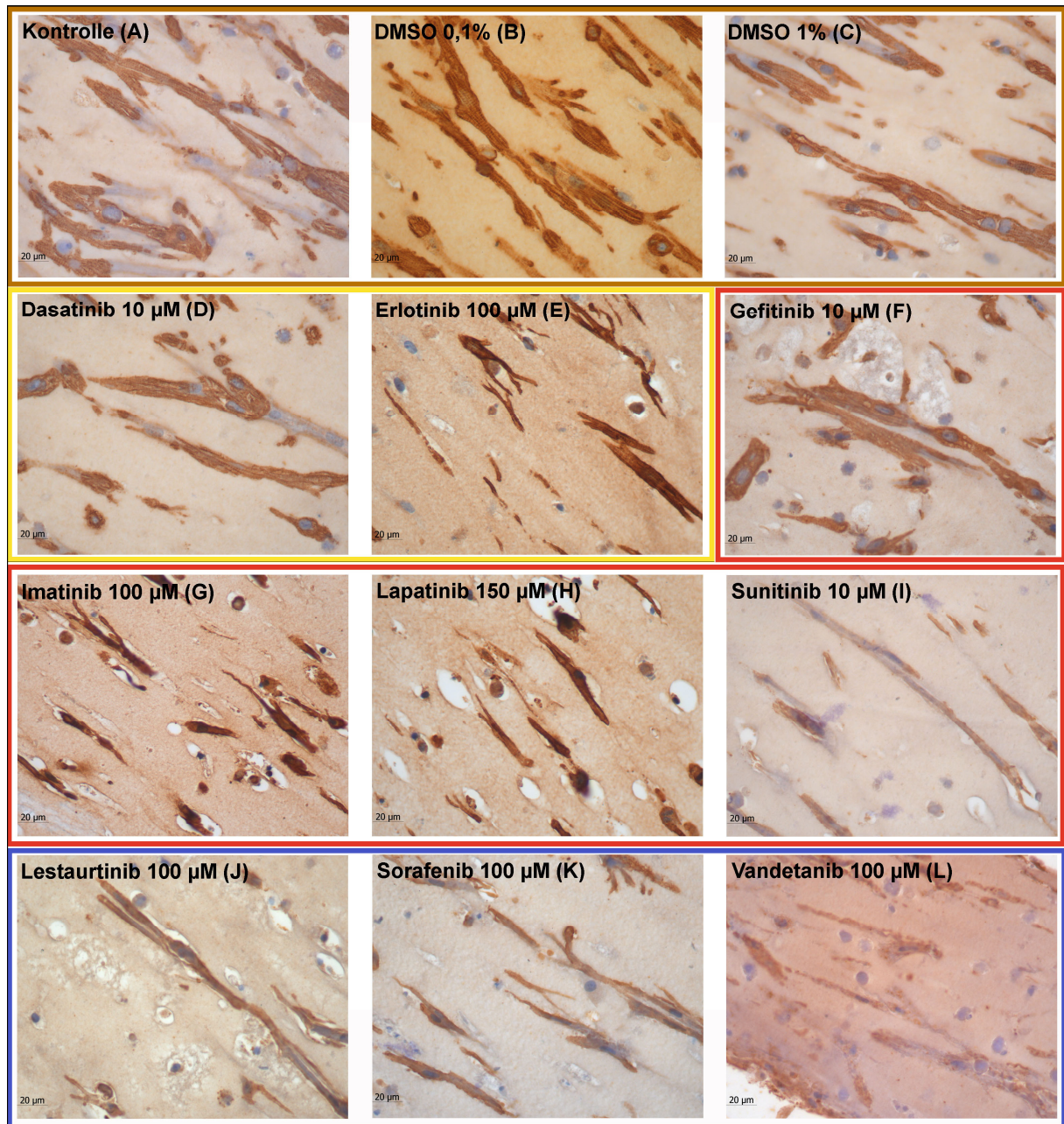
Die 40fache Vergrößerung der Actin-Färbung zeigte für Gefitinib keine Veränderung. Bei Imatinib 100  $\mu\text{M}$ , Lapatinib 150  $\mu\text{M}$  und Sunitinib 10  $\mu\text{M}$  war eine Verminderung des Zellplasmas bzw. der Myofibrillen klar zu erkennen (Abb. 19). Sowohl das Volumen der Kardiomyozyten als auch der Anteil an Myofibrillen im Zytosol erschien deutlich geringer. Die Verkleinerung des Zytoplasmas war in den Abbildungen durch einen weißen, Matrix- und zellfreien Saum um die Zellen zu erkennen. Ebenfalls waren die Zellkerne kleiner und weniger gut abgegrenzt (Abb. 19). Dies deutet auf einen Zelluntergang hin.

### **3.2.2.3 Histologische Analyse der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung**

Die 40fache Vergrößerung der Actin-Färbung zeigte für Lestaurtinib, Vandetanib und Sorafenib eine klare Verringerung der sarkomerischen Strukturen und des Zytoplasmas der FBMEs. Deshalb grenzte sich die Zelle von der Fibrinmatrix durch einen nicht gefärbten zell- und matrixlosen Saum ab (Abb. 19). Lestaurtinib und Vandetanib, im Gegensatz zu Sorafenib, ließen bereits unter der zweithöchsten

## Ergebnisse

Konzentration eine Verminderung des Zytosols vermuten, die jedoch nicht so eindeutig war (nicht abgebildet).



**Abb. 19: Detailansicht der immunhistochemischen Färbung gegen sarkomerisches Actin**

Dargestellt sind immunhistochemisch gegen das sarkomerische Actin gefärbte Paraffinschnitte in 40facher Vergrößerung. Die farbliche Umrahmung bezieht sich auf folgende Einteilung:

|       |                                                                 |
|-------|-----------------------------------------------------------------|
| Braun | -Kontrolle (A) und Vehikelkontrollen (DMSO 0,1%, B; DMSO 1%, C) |
| Gelb  | -Keine Kontraktionskraftverminderung (D, E)                     |
| Rot   | -Verzögerte Kontraktionskraftverminderung (F, G, H, I)          |
| Blau  | -Akute Kontraktionskraftverminderung (J, K, L)                  |

### **3.2.3 Immunhistochemische Färbung gegen Connexin-43**

Aufschluss über die Connexonverteilung sollte die immunhistochemische Übersichtsfärbung gegen Connexin-43 geben. Bei 40facher Vergrößerung ließen sich die Connexone darstellen. Die Anordnung der Connexinstruktur unterschied sich von der im nativen Herzen, wo Connexone normalerweise in Glanzstreifen gebündelt vorliegen. Im FBME zeigte sich Connexin-43 praktisch über die gesamte Zellmembran verteilt und stellte sich als relativ scharf begrenzte, bräunlich-orange und punktförmige Struktur dar. Das Zytosol der Kardiomyozyten war leicht bläulich gefärbt und grenzte sich von der Fibrinmatrix ab. Die Zellkerne waren blau gefärbt. Die Färbung zeigte sich umso ausgeprägter, je höher die Zelldichte im entsprechenden Bereich war. Auch hier ließ sich kein Unterschied zwischen Kontrolle und Vehikelkontrolle ausmachen (Abb. 20).

#### **3.2.3.1 Histologische Analyse der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung**

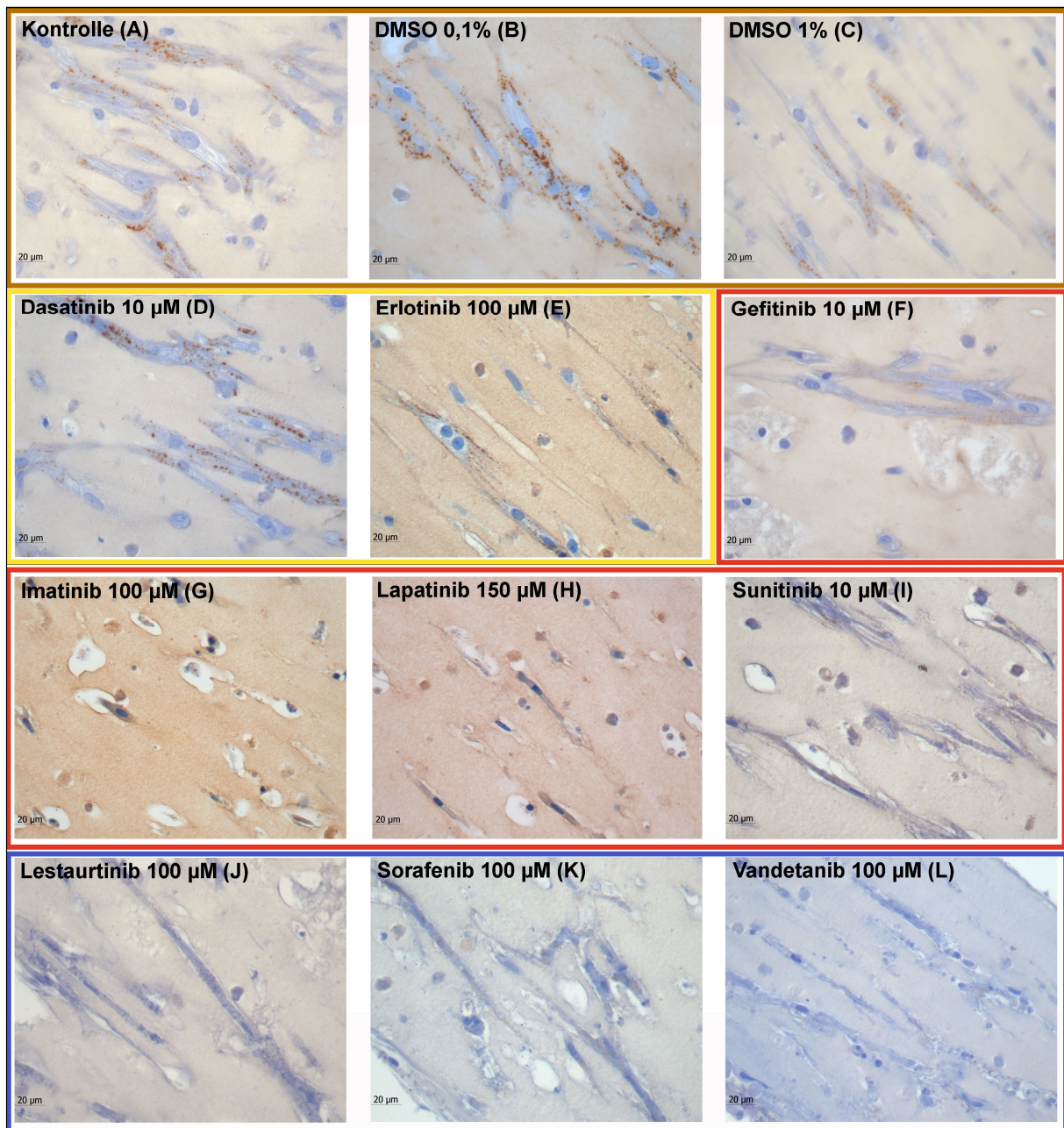
Die Anordnung der Connexinstrukturen war unter Dasatinib nicht von der der Kontrollen unterschiedlich. In Erlotinib-behandelten FBMEs waren dagegen deutlich weniger Connexin-43-positive Bereiche zu erkennen (Abb. 20).

#### **3.2.3.2 Histologische Analyse der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung**

Geordnete Connexinstrukturen waren unter Imatinib, Lapatinib und Sunitinib nicht zu erkennen. Dies spricht für einen vollständigen Verlust der *Gap Junctions*. Die Connexinstrukturen unter Gefitinib 10 µM schienen deutlich vermindert. Die übrigen Konzentrationen zeigten keine Abweichung zu den Kontrollen (nicht gezeigt).

#### **3.2.3.3 Histologische Analyse der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung**

Unter Lestaurtinib (100 µM), Sorafenib (100 µM) und Vandetanib (100 µM) konnten keine dunkelbraun-orange gefärbten Bestandteile der Connexone nachgewiesen werden (Abb. 20). Unter Sorafenib 10 µM wurden keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt (nicht gezeigt). Bei Lestaurtinib und Vandetanib 10 µM wurden zwar noch vereinzelt Bestandteile von Connexonen angefärbt, ein Unterschied zu den Kontrollen war jedoch deutlich zu erkennen (nicht gezeigt).



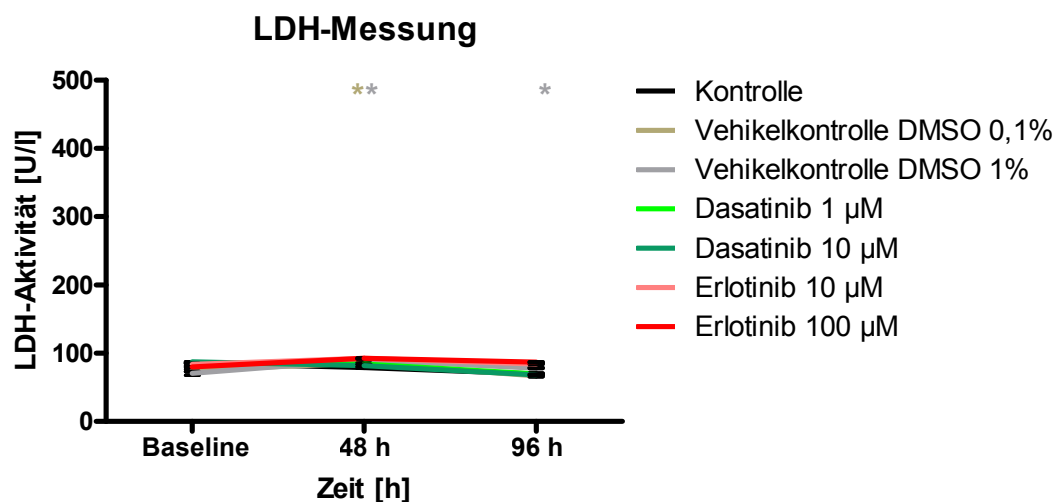
**Abb. 20: Detailsicht der immunhistochemischen Färbung gegen Connexin-43**  
 Dargestellt sind immunhistochemisch gegen Connexin-43 gefärbte Paraffinschnitte in 40facher Vergrößerung. Die farbliche Umrahmung bezieht sich auf folgende Einteilung:  
 Braun -Kontrolle (A) und Vehikelkontrollen (DMSO 0,1%, B und DMSO 1%, C)  
 Gelb -Keine Kontraktionskraftverminderung (D, E)  
 Rot -Verzögerte Kontraktionskraftverminderung (F, G, H, I)  
 Blau -Akute Kontraktionskraftverminderung (J, K, L)

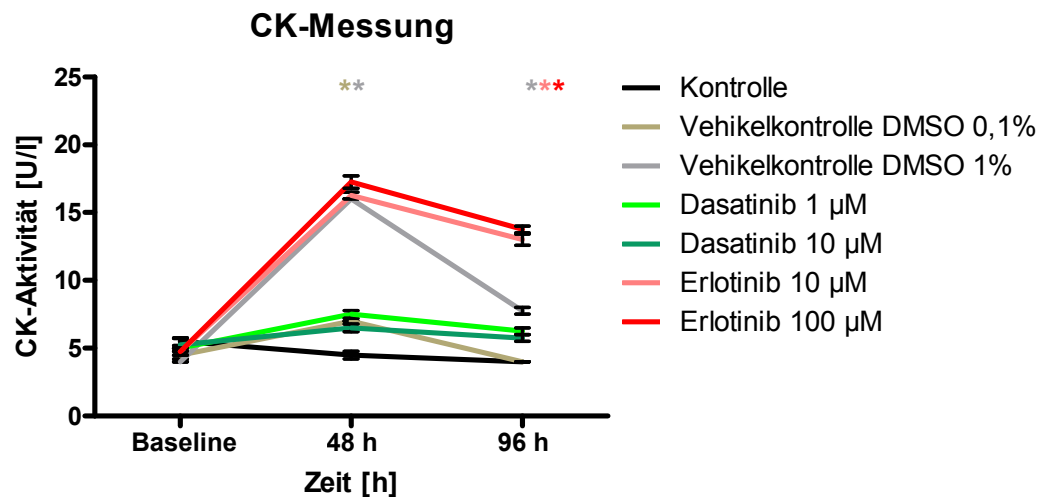
### 3.3 Klinische Chemie

Während der 96-stündigen Interventionsphase wurden beim Mediumwechsel Proben des Mediums entnommen (siehe 2.2.2.5), welche auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) und Kreatinkinase (CK) untersucht wurden. Da aufgrund des Protokolls der Zellpräparation ausgeschlossen werden konnte, dass in den FBMEs Skelettmuskelzellen enthalten waren, war die Gesamt-CK spezifisch für die Kardiomyozyten.

#### 3.3.1 Klinisch chemische Analyse der TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung

Beim Vergleich der unbehandelten Kontrolle und den Vehikelkontrollen fiel eine Erhöhung der CK- und LDH-Enzymaktivität in den Vehikelkontrollen auf. Die Vehikelkontrolle DMSO 0,1% zeigte nach 48 h eine leichte Erhöhung der LDH-Aktivität (1,1fach) sowie der CK-Aktivität (1,6fach). Unter DMSO 1% kam es zu einem mäßigen Anstieg der LDH-Aktivität nach 48 h (1,2fach) und nach 96 h (1,1fach). Eine deutliche Erhöhung der CK-Aktivität zeigte sich nach 48 h (3,6fach) und nach 96 h (1,9fach). Für die Beurteilung der TKIs stellen die Vehikelkontrollen die Bezugsgröße dar. Die LDH-Aktivität für Dasatinib und Erlotinib unterschied sich nicht von den Vehikelkontrollen. Dieses galt auch für die CK-Aktivität für Dasatinib. Divergierend hiervon zeigte sich für Erlotinib 100  $\mu$ M (1,8fach) und 10  $\mu$ M (1,7fach) eine erhöhte CK-Aktivität nach 96 h (Abb. 21).



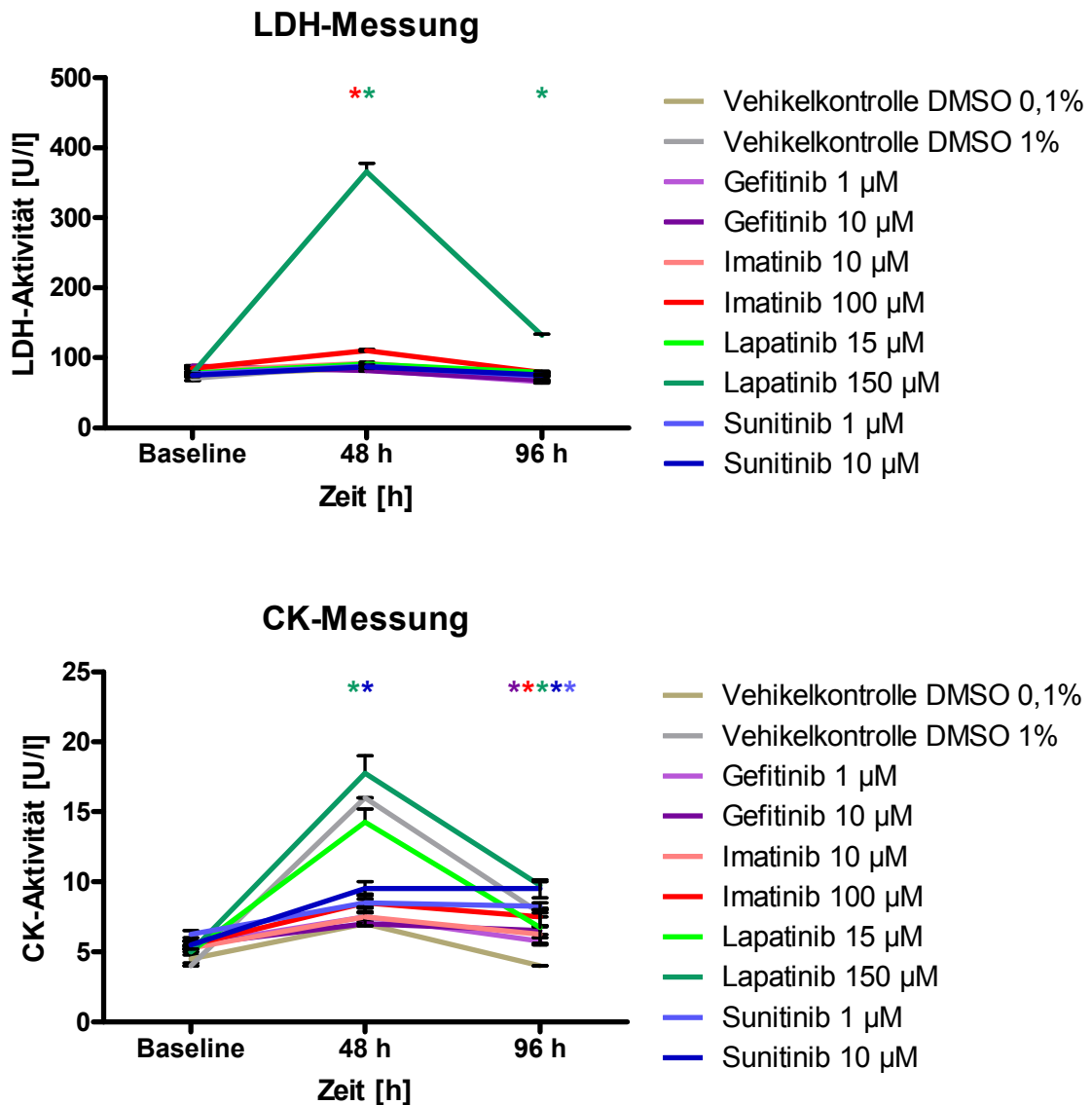


**Abb. 21: Darstellung der LDH- und CK-Aktivität für TKIs ohne Kontraktionskraftverminderung**

Gezeigt ist die LDH- und CK-Aktivität des Mediums zu den Zeitpunkten Baseline, 48 und 96 h. Signifikanzen wurden zu den Vehikelkontrollen bzw. im Fall der Vehikelkontrollen zur Kontrolle bestimmt (Abszisse: Zeit in Stunden (h); Ordinate: LDH- bzw. CK-Aktivität in Units/Liter (U/l); Standardabweichung:  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ; Students t-Test für gepaarte Messungen, \*  $p < 0,05$ ).

### 3.3.2 Klinisch chemische Analyse der TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung

Unter Gefitinib war die LDH-Aktivität nicht erhöht, aber die CK-Aktivität war unter 10 µM nach 96 h auf das 1,6fache erhöht. Die FBMEs unter Sunitinib wiesen ebenfalls keine Erhöhung der LDH-Aktivität auf, jedoch kam es unter Sunitinib 1 µM nach 96 h (2,1fach) und unter Sunitinib 10 µM bereits nach 48 h (1,4fache) sowie 96 h (2,4fach) zu einer Erhöhung der CK-Aktivität. Unter Imatinib 100 µM kam es nach 48 h (1,3fach) zu einem Anstieg der LDH-Aktivität und nach 96 h war sie wieder im Bereich des Baseline-Wertes. Der CK-Wert war erst nach 96 h (1,9fach) erhöht. Unter Lapatinib 150 µM kam es nach 48 h (4,1fach) zu einem Anstieg der LDH-Aktivität. Diese Erhöhung war zwar deutlich rückläufig, jedoch mit dem 1,7fachen nach 96 h immer noch nachweisbar. Die CK-Aktivität war nach 48 h (1,1fach) und 96 h (1,3fach) leicht erhöht. Obwohl die Messwerte der CK-Aktivität unter den TKIs nach 96 h im Vergleich zu 48 h nahezu konstant geblieben (Ausnahme Lapatinib 150 µM) waren, waren sie durch den stärkeren Abfall der Vehikelkontrolle signifikant.



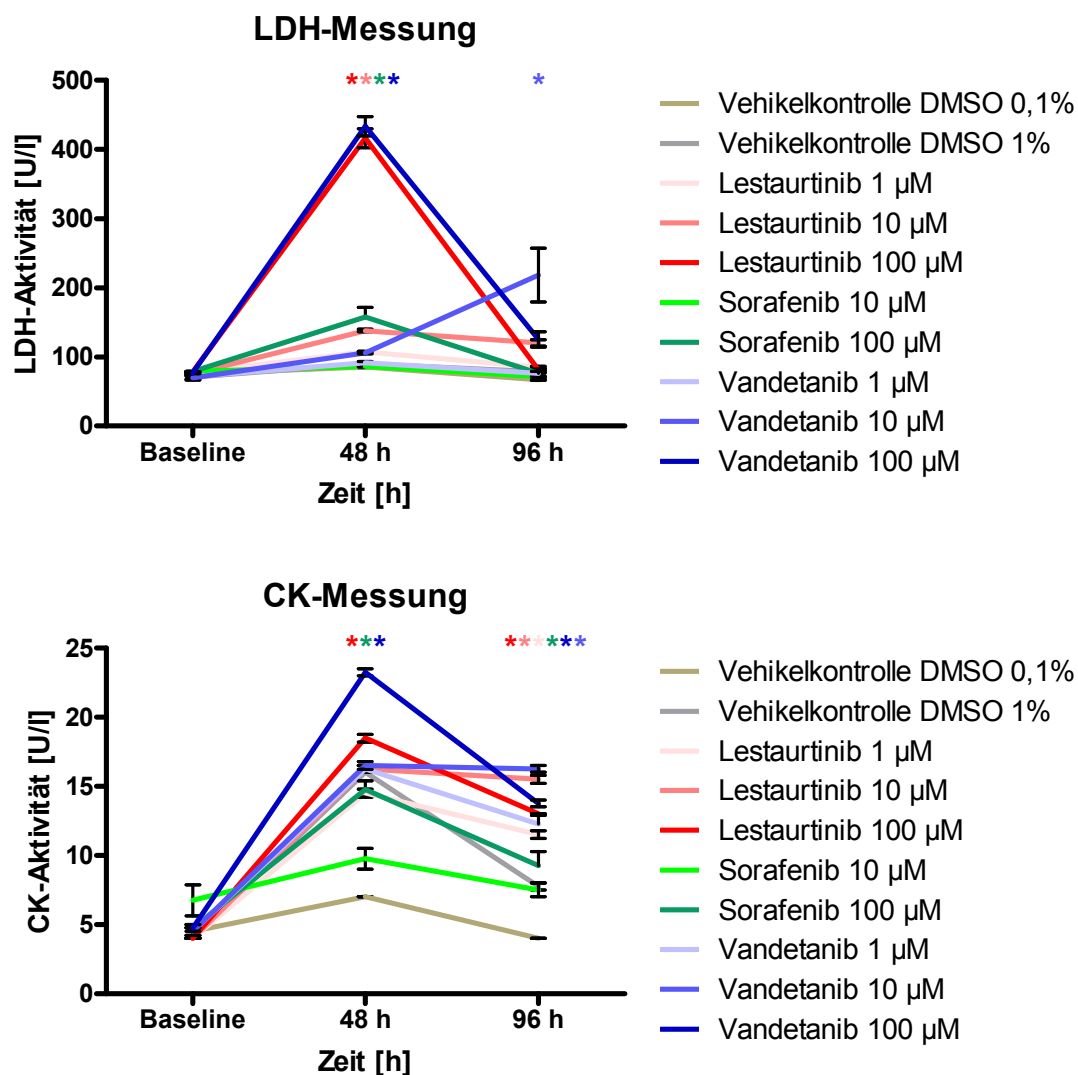
**Abb. 22: Darstellung der LDH- und CK-Aktivität für TKIs mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung**

Gezeigt ist die LDH- und CK-Aktivität des Mediums zu den Zeitpunkten Baseline, 48 und 96 h. Signifikanzen wurden zu den entsprechenden Vehikelkontrollen bestimmt (Standardabweichung:  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ; Students t-Test für gepaarte Messungen, \*  $p < 0,05$ ).

### 3.3.3 Klinisch chemische Analyse der TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung

Die FBMEs unter Sorafenib 100  $\mu\text{M}$  wiesen nach 48 h eine Erhöhung der LDH-Aktivität um das 1,8fach auf, welche nach 96 h nicht mehr nachweisbar war. Ebenfalls konnte eine Erhöhung der CK-Aktivität nach 48 h (2,1fache) und 96 h (2,3fache) beobachtet werden. Es zeigte sich ein Anstieg der LDH-Aktivität nach 48 h unter Lestaurtinib 10  $\mu\text{M}$  (1,5fach) und 100  $\mu\text{M}$  (4,6fach), jedoch keiner nach 96 h. Unter Lestaurtinib 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  wurde eine Erhöhung der CK-Aktivität nach 96 h

um das 1,5fach bzw. 2fache nachgewiesen. Unter Lestaurtinib 100  $\mu\text{M}$  kam es nach 48 h bzw. nach 96 h zu einer Erhöhung um das 1,2fach bzw. 1,7fache. Unter Vandetanib 10  $\mu\text{M}$  zeigte sich eine erhöhte LDH-Aktivität nach 96 h (2,8fache), wohingegen Vandetanib 100  $\mu\text{M}$  bereits nach 48 h eine Erhöhung um das 4,8fache aufwies. Eine Erhöhung der CK-Aktivität trat unter Vandetanib 10  $\mu\text{M}$  erst nach 96 h (2,1fache) auf. Diese war unter Vandetanib 100  $\mu\text{M}$  bereits nach 48 h (1,5fache) erhöht und stieg bis zum Zeitpunkt 96 h (1,8fache) an. Unter allen TKIs zeigte sich nach 96 h ein Abfall bzw. ein konstanter Messwert der CK-Aktivität im Vergleich zum Zeitpunkt 48 h.



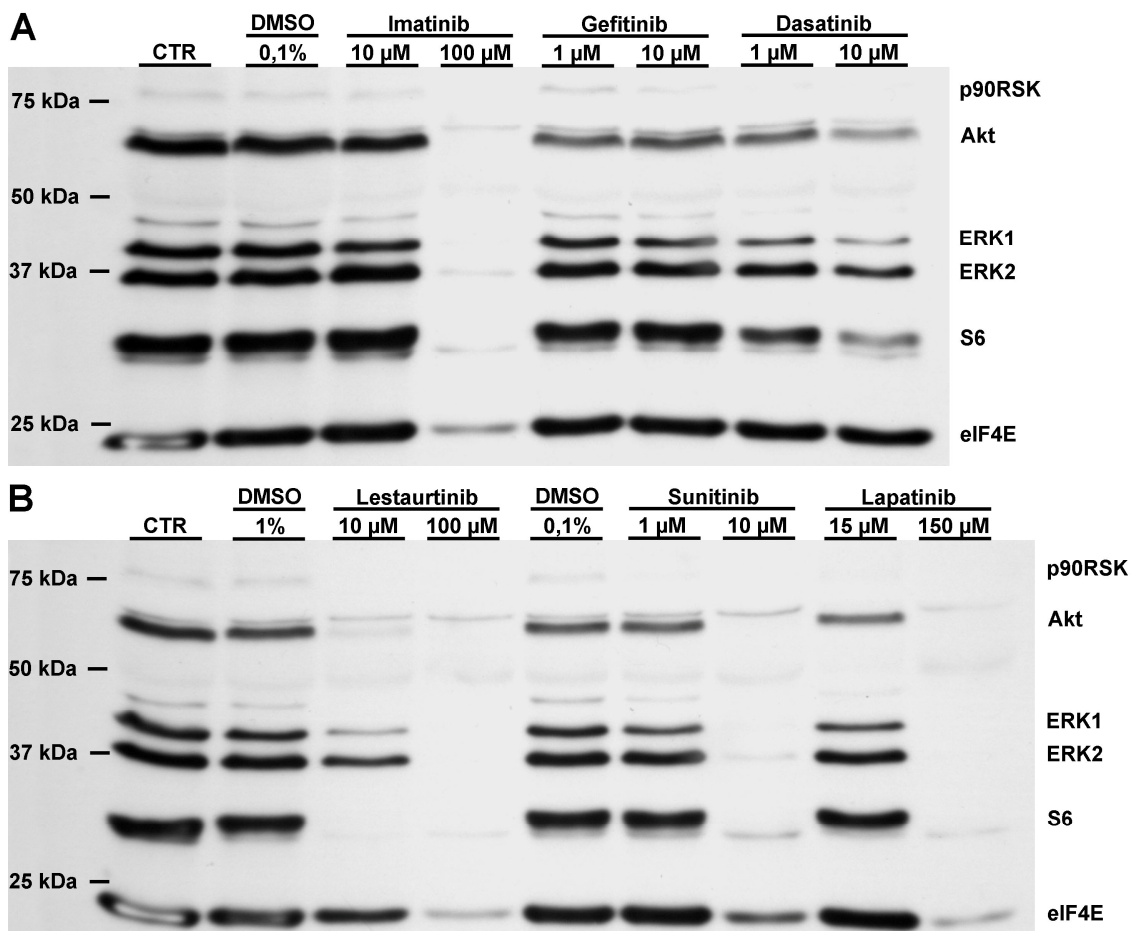
**Abb. 23: Darstellung der LDH- und CK-Aktivität für TKIs mit akuter Kontraktionskraftverminderung**

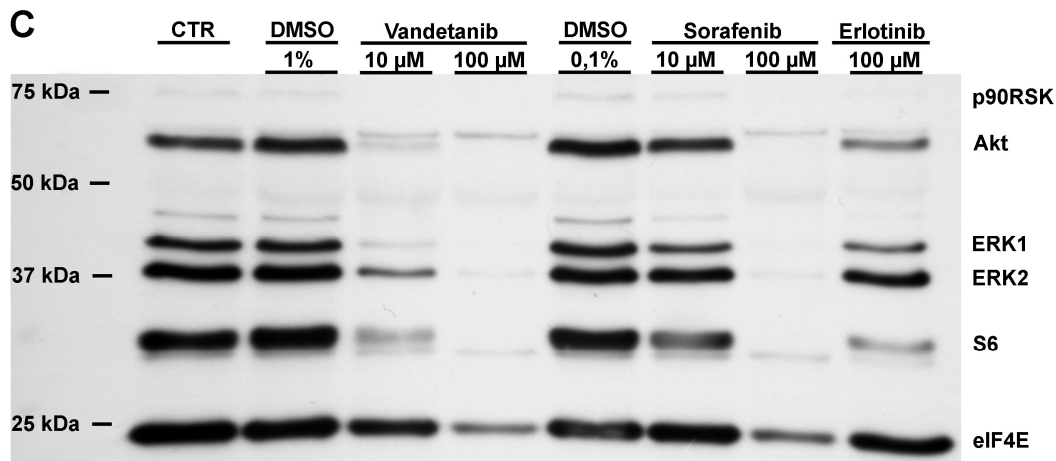
Gezeigt ist die LDH- und CK-Aktivität des Mediums zu den Zeitpunkten Baseline, 48, und 96 h. Signifikanzen wurden zu den entsprechenden Vehikelkontrollen bestimmt (Standardabweichung:  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ; Students t-Test für ungepaarte Messungen, \*  $p < 0,05$ ).

### 3.4 Westernblot

#### 3.4.1 Pathscan Antikörper-Cocktail

Für das Westernblot-Verfahren wurde initial ein Antikörper-Cocktail verwendet. Dieser ermöglicht die gleichzeitige Betrachtung ausschließlich der phosphorylierten Zustände der p90RSK, Akt, ERK1/2 und der S6 Kinase. Die Auswertung erfolgte in diesem wie in allen folgenden Blot-Analysen anhand jeweils eines biologischen Replikates je untersuchter Konzentration. Aus diesem Grund war keine statistische Auswertung möglich. Bei dem Antikörper-Cocktail diente der eukaryotische Initiationsfaktor 4E (eIF4E) als Ladekontrolle, der unabhängig von seinem Phosphorylierungszustand zur Darstellung kam. Er spiegelte deshalb die Proteinmenge wider, auf die eine Normalisierung der anderen Proteine erfolgte. Vorweggenommen werden muss, dass die Bande der p90RSK sogar bei den Kontrollen nur schwach ausgeprägt war, weshalb sie nicht zur Auswertung der Westernblots (Abb. 24) herangezogen wurde. Auf sie wird im Folgenden nicht näher eingegangen.





**Abb. 24: Westernblot-Analyse anhand des Pathscan Antikörper-Cocktails**

Dargestellt sind die Westernblot-Analysen der für 96 h inkubierten FBMEs. In einigen Fällen (z.B. Imatinib und Lestaurtinib 100  $\mu$ M) wurde eine deutliche Abschwächung der Ladekontrolle (eIF4E) festgestellt. Grund hierfür ist, dass die präanalytisch gemessene Gesamtproteinkonzentration wesentlich auf das extrazelluläre Protein (Fibrin) zurückzuführen ist und nicht auf das zelluläre Protein. Die mitgeführten Vehikelkontrollen wichen zu keinem Zeitpunkt von den ebenfalls mitgeführten Kontrollen ab und waren auch zwischen den Gelen konstant. Die Molekülgröße ist in Kilodalton (kDa) dem linken, die zugeordnete Kinase dem rechten Rand der Abbildung zu entnehmen.

Bei der Auswertung der Proteinextrakte der FBMEs ließen sich die Ergebnisse in drei Kategorien gliedern:

- (i) Es bestand kein Unterschied zu den Proteinextrakten der Kontroll-FBMEs.
- (ii) Es kam zu einer Signalabschwächung der Banden Akt, ERK1/2 und/oder der S6 Kinase ohne Abschwächung der Ladekontrolle (eIF4E).
- (iii) Es kam zu einer Signalabschwächung der Banden Akt, ERK1/2 und der S6 Kinase sowie der Ladekontrolle (eIF4E).

Eine Übersicht, welche TKIs in welche Kategorie einzuordnen waren, gibt Tabelle 6.

| TKI                                                      | Keine<br>Abschwächung<br>der Banden | Abschwächung der<br>Banden der<br>Phosphoproteine | Zusätzliche Abschwächung<br>der Banden der<br>Ladekontrolle (eIF4E) |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>TKI ohne Kontraktionskraftverminderung</b>            |                                     |                                                   |                                                                     |
| Dasatinib 1 µM                                           |                                     | Akt, ERK 1, S6 Kinase                             |                                                                     |
| Dasatinib 10 µM                                          |                                     | Akt, ERK 1, S6 Kinase                             |                                                                     |
| Erlotinib 100 µM                                         |                                     | Akt, ERK 1, S6 Kinase                             |                                                                     |
| <b>TKI mit verzögerter Kontraktionskraftverminderung</b> |                                     |                                                   |                                                                     |
| Gefitinib 1 µM                                           | X                                   |                                                   |                                                                     |
| Gefitinib 10 µM                                          | X                                   |                                                   |                                                                     |
| Imatinib 10 µM                                           | X                                   |                                                   |                                                                     |
| Imatinib 100 µM                                          |                                     | Akt, ERK 1/2, S6 Kinase                           | X                                                                   |
| Lapatinib 15 µM                                          | X                                   |                                                   |                                                                     |
| Lapatinib 150 µM                                         |                                     | Akt, ERK 1/2, S6 Kinase                           | X                                                                   |
| Sunitinib 1 µM                                           | X                                   |                                                   |                                                                     |
| Sunitinib 10 µM                                          |                                     | Akt, ERK 1/2, S6 Kinase                           | X                                                                   |
| <b>TKI mit akuter Kontraktionskraftverminderung</b>      |                                     |                                                   |                                                                     |
| Lestaurtinib 10 µM                                       |                                     | Akt, ERK 1, S6 Kinase                             |                                                                     |
| Lestaurtinib 100 µM                                      |                                     | Akt, ERK 1/2, S6 Kinase                           | X                                                                   |
| Sorafenib 10 µM                                          | X                                   |                                                   |                                                                     |
| Sorafenib 100 µM                                         |                                     | Akt, ERK 1/2, S6 Kinase                           | X                                                                   |
| Vandetanib 10 µM                                         |                                     | Akt, ERK 1, S6 Kinase                             |                                                                     |
| Vandetanib 100 µM                                        |                                     | Akt, ERK 1/2, S6 Kinase                           | X                                                                   |

**Tab. 6: Einordnung der TKIs anhand der Signalabschwächung im Westernblot-Verfahren**

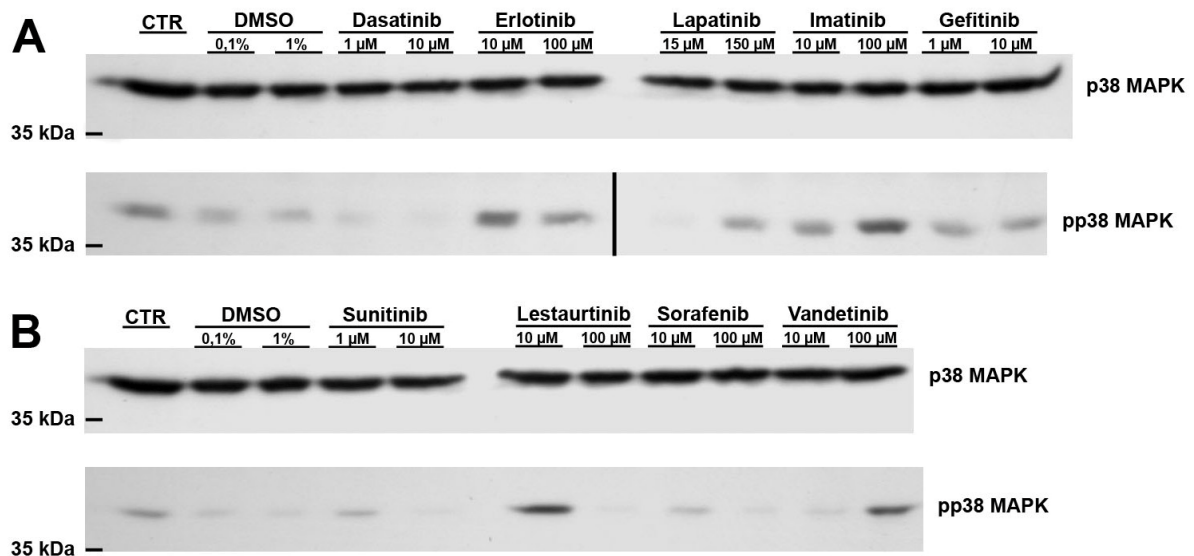
Dargestellt sind die neun TKIs in der höchsten und zweithöchsten Konzentration. Die Tabelle stellt die Signalabschwächung der Banden des Pathscan Antikörper-Cocktails im Westernblot dar. Die TKIs wurden anhand ihrer Auswirkung auf die Kontraktionskraft eingeteilt.

Im Falle einer Abschwächung der Banden der Phosphoproteine kam es stets zu einer deutlich geringeren Abschwächung der Bande von ERK2 im Vergleich zu ERK1. Keiner der TKIs gilt als direkter Inhibitor einer der drei genannten Kinasen (Akt, ERK1/2, S6 Kinase).

Es folgten weitere Westernblot-Analysen, um die Aktivität der *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) und der *microtubule associated protein 1 (MAP1) light chain 3 (LC3) kinase* zu bestimmen.

### 3.4.2 p38 MAPK

Der Einfluss der TKIs auf die p38 MAPK wurde nach 2-stündiger Inkubationszeit untersucht. Gemessen wurden zum einen das Gesamtprotein (p38 MAPK), zum anderen nur die phosphorylierte Form (pp38 MAPK).



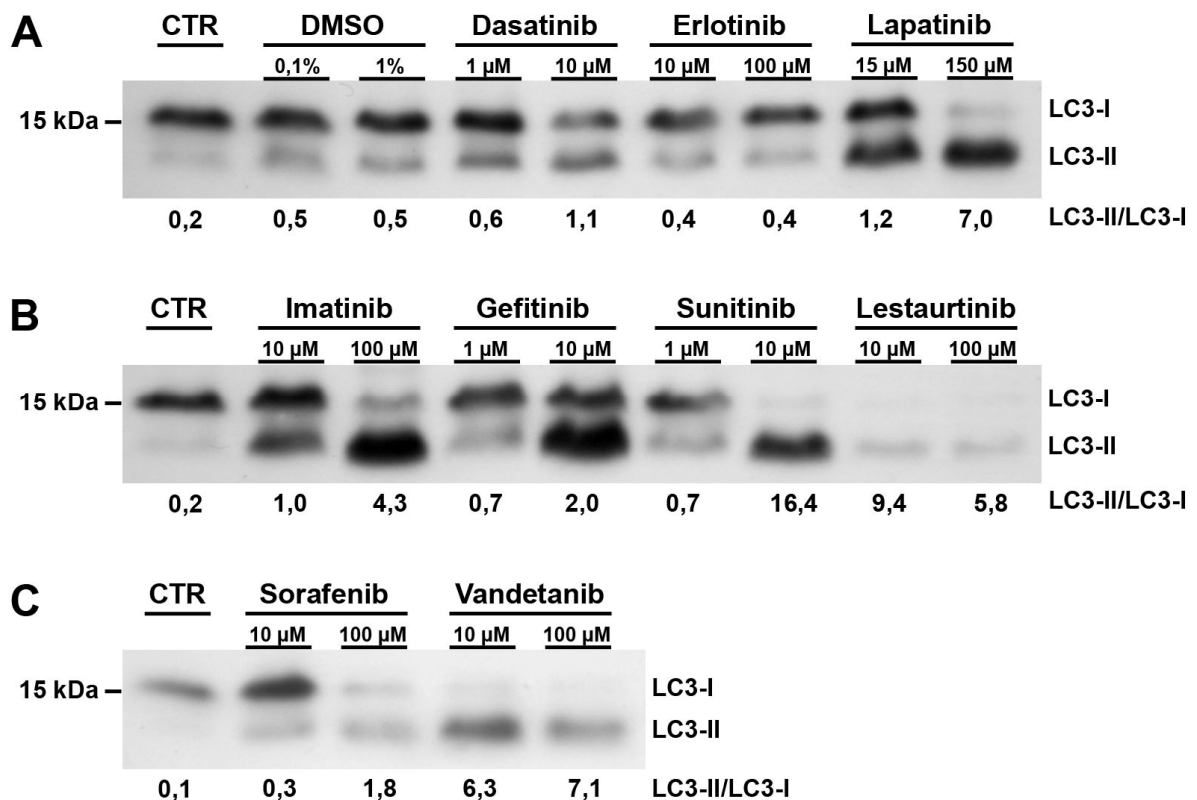
**Abb. 25: Analyse des Gesamtproteins sowie der phosphorylierten Form der p38 MAPK**

Gezeigt sind die Banden des Gesamtproteins (p38 MAPK) sowie die der phosphorylierten Form (pp38 MAPK). Die Banden der p38 MAPK wurden in A und B für alle TKIs gleichermaßen nachgewiesen. Eine konstante Beladung der Gele mit Protein sowie eine konstante Expression von p38 MAPK war daher anzunehmen. Die Molekülgröße ist in Kilodalton (kDa) dem linken, die zugeordnete Kinase dem rechten Rand der Abbildung zu entnehmen. Der unter dem Blot-Verfahren aufgetretene Versatz der Banden wurde durch Bildbearbeitung korrigiert und kenntlich gemacht (vertikaler Balken).

In A und B der Abbildung 25 zeigte sich für die FBMEs unter DMSO ein im Vergleich zur Kontrolle schwächeres Signal für pp38 MAPK. Unter Dasatinib, Sunitinib und Sorafenib zeigte sich eine verringerte Phosphorylierung. Eine stärkeres Signal für die pp38 MAPK wurde eindeutig für Erlotinib 100 μM, Imatinib 100 μM, Lestaurtinib 10 μM und Vandetanib 100 μM nachgewiesen. Eine Konzentrationsabhängigkeit war nur unter Imatinib und Vandetanib zu beobachten. Die Intensität der Banden unter Gefitinib und Lapatinib waren weit weniger unterschiedlich zu den Kontrollen als die der zuvor genannten TKIs. Unter Lapatinib war ein konzentrationsabhängiger Effekt zu vermuten.

### 3.4.3 LC3-II/LC3-I-Westernblot

Die LC3-Kinase ist ein wichtiger Bestandteil des Aktivierungsweges der Autophagie. Der Übergang von der zytoplasmatischen (LC3-I) zur kovalent an die Membran der Autophagosomen gebundenen Form (LC3-II) initiiert die Autophagie. Da diese Initiation mit einem veränderten Laufverhalten im Westernblot einhergeht, eignet sich der Quotient (LC3-II/LC3-I) als Indikator für die Autophagieaktivierung. Als Referenzwert diente der Quotient der Vehikelkontrollen. Dieser war für DMSO 0,1% (LC3-II/LC3-I = 0,5) und 1% (LC3-II/LC3-I = 0,5) im Vergleich zur Kontrolle (LC3-II/LC3-I = 0,2) leicht erhöht (Abb. 26). Für alle TKIs, die zu einer Abnahme der Kontraktionskraft führten, konnte eine deutliche Zunahme des LC3-II/LC3-I-Quotienten nachgewiesen werden (1,8-16,4). Hervorzuheben ist zusätzlich, dass es sich hierbei mit Ausnahme von Lestaurtinib um konzentrationsabhängige Veränderungen des LC3-II/LC3-I-Quotienten handelte.



**Abb. 26: Analyse der Autophagie anhand des LC3-II/LC3-I-Quotienten**

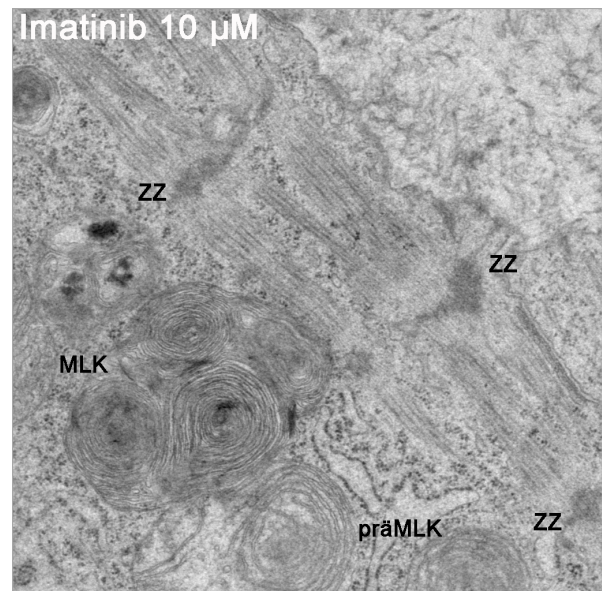
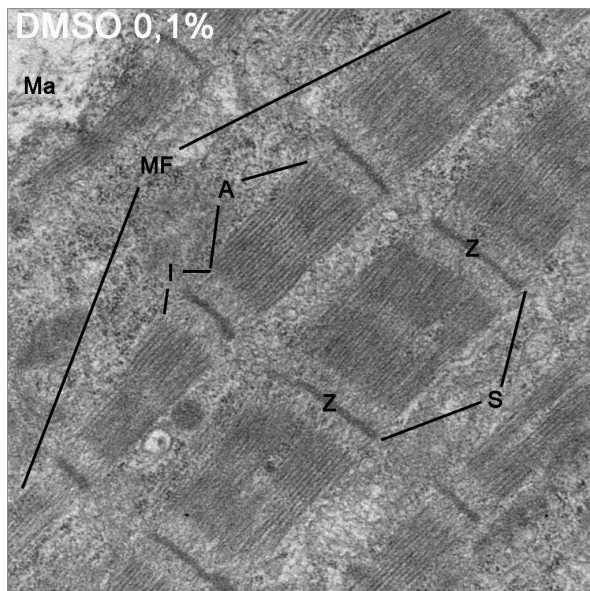
Dargestellt sind die Banden von LC3-I und LC3-II, deren Quotient als Maß für die Aktivierung der Autophagie herangezogen werden kann. Die Bandenstärke wurde densitometrisch ermittelt und die Quotienten errechnet. Untersucht wurde je ein gepooltes biologisches Replikat.

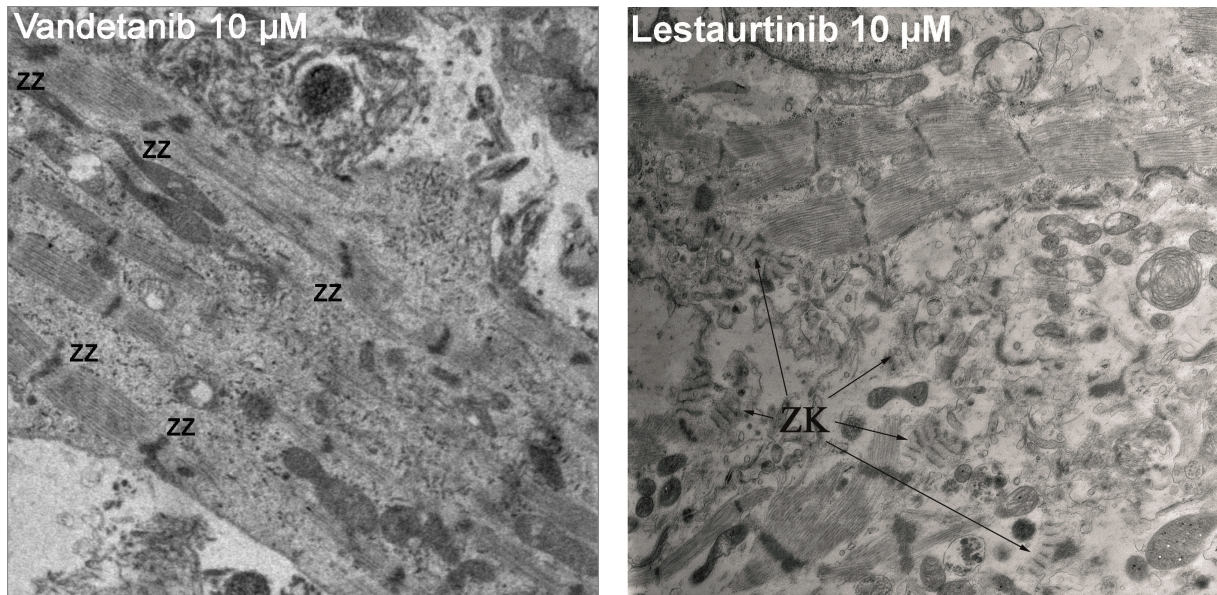
### 3.5 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde als Verfahren zur Beurteilung der Ultrastruktur der FBMEs gewählt. Sie ermöglichte unter anderem eine Betrachtung der Desmosomen, Mitochondrien und der Sarkomerstruktur. Zu diesem Zweck wurden zuerst Semidünnschnitte und anschließend Ultradünnschnitte von den FBMEs in Längsrichtung angefertigt. Die TKIs, die keine Kontraktionskraftverminderung zeigten (Dasatinib und Erlotinib), wurden in der höchsten Konzentration untersucht, während bei allen anderen die 10fach niedrigere Konzentration analysiert wurde.

#### 3.5.1 Kriterien der elektronenmikroskopischen Beurteilung

Die elektronenmikroskopische Beurteilung erfolgte nach folgenden Aspekten: Sarkomerstruktur, Z-Linie, Mitochondrien, Autophagie, Multilamelläre-Körperchen (MLKs) und Zebra-Körperchen (ZKs). Kriterien, die auf eine gute Sarkomerstruktur hindeuteten, waren das Auftreten von mehreren Sarkomerbündeln nebeneinander mit gut ausgebildeten anisotropen- und isotropen-Banden und paralleler Anordnung der Sarkomeruntereinheiten von benachbarten Bündeln. Des Weiteren ein gleichmäßiger Durchmesser innerhalb einer Z-Linie und die Gleichförmigkeit der Z-Linien in einem Präparat (Abb. 27, DMSO 0,1%).



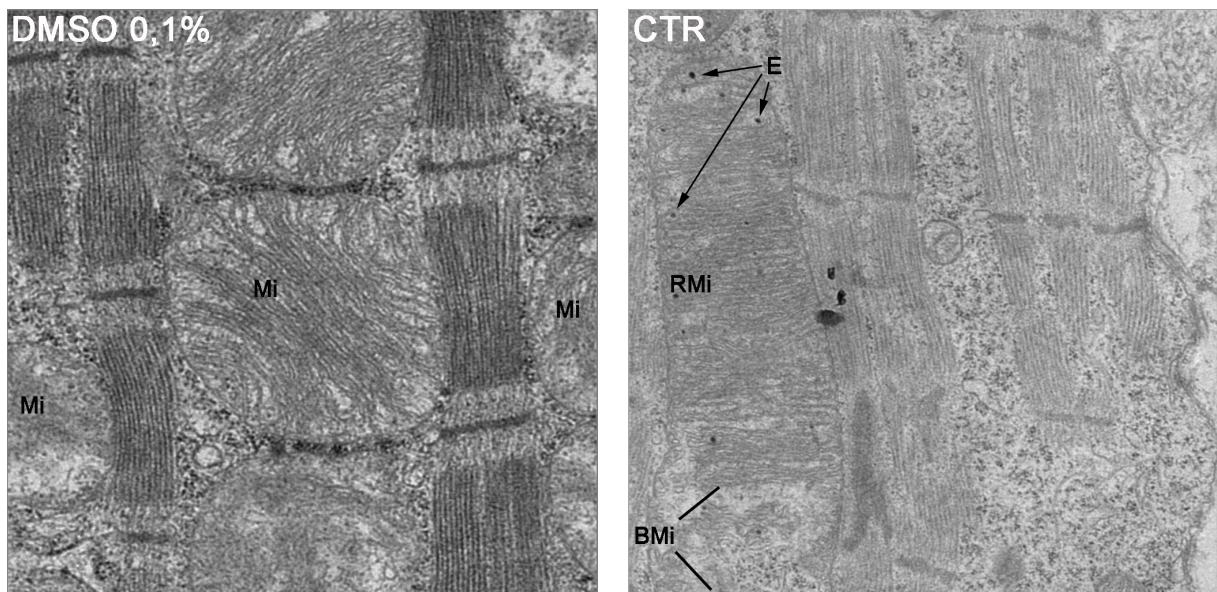


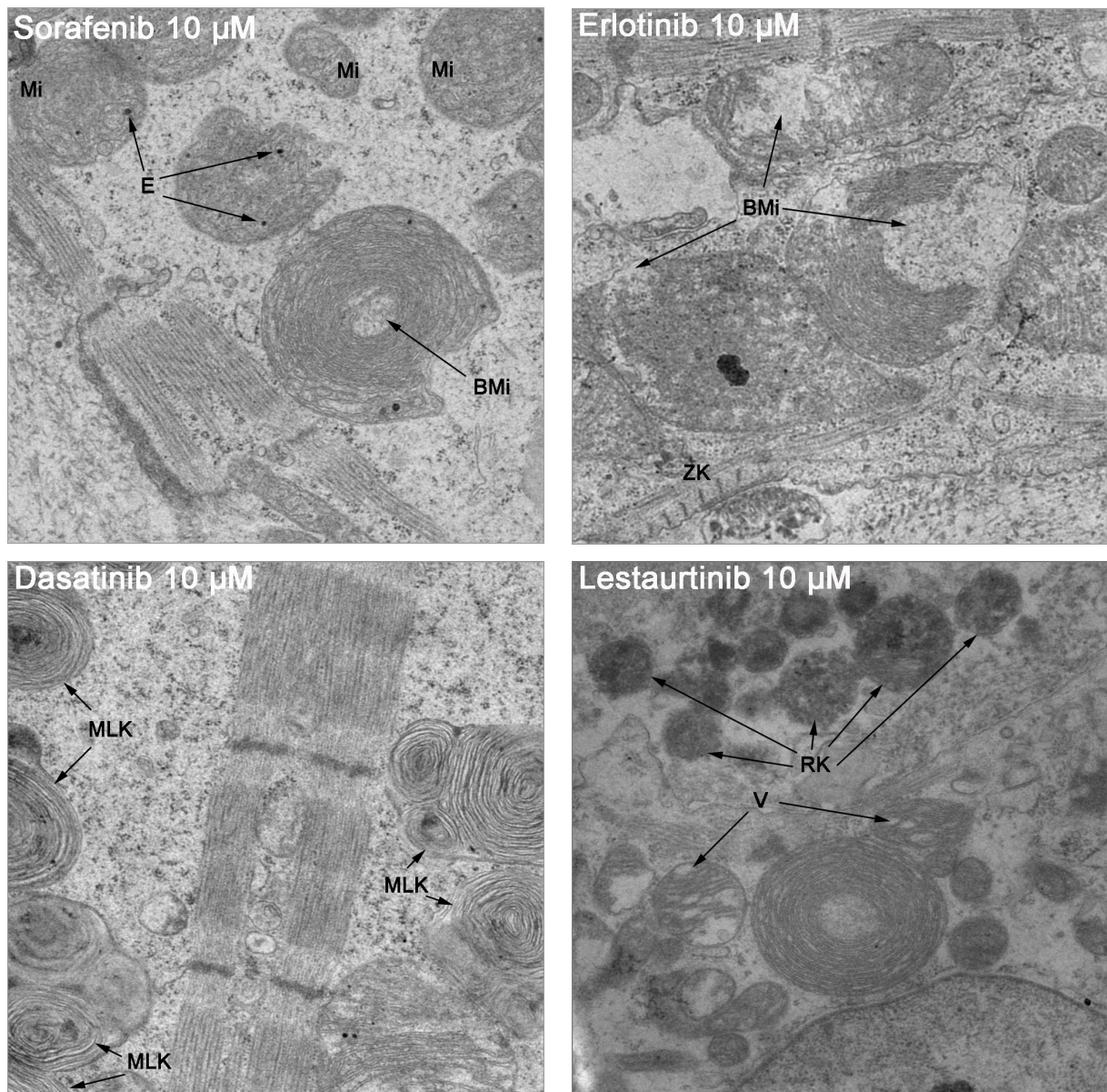
**Abb. 27: Darstellung der Sarkomerstruktur ausgewählter FBMEs**

Die exemplarisch gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die exzellente (DMSO 0,1%) Sarkomerstruktur sowie die Veränderungen unter dem Einfluss der TKIs.

Legende: Myofibrillen (MF), Sarkomer (S), anisotrope-Bande (A), isotrope-Bande (I), Z-Bande (Z), deutlich verbreiterte Z-Bande (ZZ), die Kardiomyozyten umgebene Fibrinmatrix (Ma), Multilamelläres-Körperchen (MLK), offenbar sich im Umbau zum MLK befindliche Mitochondrien (präMLK), Zebra-Körperchen (ZK)

Als Kriterien für eine geschädigte Struktur der Mitochondrien wurden Defekte der Binnenstruktur, Vakuolen und/oder elektronendichte Einschlusskörperchen gewertet. Zusätzlich wurde die Häufigkeit von MLKs (wahrscheinlich Degenerationsprodukte der Mitochondrien) und Autophagie beurteilt. In Abbildung 28 sind exemplarisch die Beurteilungskriterien veranschaulicht.





**Abb. 28: Überblick über mitochondriale Veränderungen und Autophagie anhand ausgewählter FBMEs**

Die Mitochondrien zeigten unter DMSO 0,1% eine exzellente Struktur, und die Häufigkeit von Autophagosomen war sehr niedrig. Exemplarisch sind die Veränderungen durch TKIs auf diese Parameter gezeigt.

Legende: Exzellente Mitochondrien (Mi), gestörte Binnenstruktur der Mitochondrien (BMi), elektronendichte Einschlüsse (E), Vakuolen (V), Riesenmitochondrien (RMi), Multilamelläres Körperchen (MLK), Zebra-Körperchen (ZK), Residualkörperchen (RK)

### 3.5.2 Zusammenfassung der elektronenmikroskopischen Beurteilung

Die Tabelle 7 fasst die elektronenmikroskopisch beobachteten Ergebnisse zusammen.

| Probe             | Sarkomere | Z-Bande | Mitochondrien | Autophagie | MLK  | ZK  |
|-------------------|-----------|---------|---------------|------------|------|-----|
| CTR               | ++        | +++     | +             | +          | +    | -   |
| DMSO 0,1%         | ++++      | ++++    | +++           | +          | -    | +   |
| Sorafenib 10 µM   | +         | ++      | ++            | +++        | +    | -   |
| Sunitinib 1 µM    | +         | ++      | ++            | ++         | +    | -   |
| Imatinib 10 µM    | ++        | +       | +             | +++        | ++   | -   |
| Dasatinib 10 µM   | ++        | ++      | -             | +++        | ++++ | -   |
| Gefitinib 1 µM    | ++        | +       | +             | +++        | -    | -   |
| DMSO 1%           | ++        | +++     | +             | +          | -    | -   |
| Erlotinib 100 µM  | -         | +       | -             | +++        | -    | +   |
| Vandetanib 10 µM  | -         | +       | +             | ++++       | +++  | -   |
| Lestaurinib 10 µM | +         | +       | +             | ++++       | +++  | +++ |
| Lapatinib 15 µM   | ++        | +       | +             | ++++       | +++  | -   |

| Legende | Qualität  | Quantität |
|---------|-----------|-----------|
| -       | Gering    | Fehlt     |
| +       | Mäßig     | Niedrig   |
| ++      | Gut       | Mäßig     |
| +++     | Sehr gut  | Hoch      |
| ++++    | Exzellent | Sehr hoch |

**Tab. 7: Übersicht der elektronenmikroskopischen Ergebnisse**

Dargestellt ist ein vereinfachter Überblick ausgewählter Veränderungen. Für jeden TKI wurde ein biologisches Replikat verwendet. Dieser Überblick basiert auf der Auswertung von Pradeep Luther.

Die Qualität der Sarkomerstruktur/Z-Bande war unter den Kontrollbedingungen unterschiedlich und insbesondere bei DMSO 0,1% sehr gut. Im Vergleich zu den

Vehikelkontrollen wurde bei allen TKIs eine deutlich schlechtere Sarkomerstruktur/Z-Bande beobachtet. Hervorzuheben ist die sehr schlechte Sarkomerstruktur bei Vandetanib und Erlotinib. Unter Lestaurtinib zeigte sich zusätzlich ein deutlich häufigeres Auftreten von Zebra-Körperchen bzw. Leptomeren (Abb. 27). Selten waren sie auch unter Erlotinib und DMSO 0,1% zu beobachten. Hierbei handelt es sich möglicherweise um degenerierte Sarkomere. Die Funktion von Zebra-Körperchen ist jedoch noch weitestgehend unklar (Dedkov et al. 2007). Sie kommen vereinzelt physiologisch im Herzen sowie in quergestreifter Muskulatur vor (Zierz & Jerusalem 2003).

Die Mitochondrienstruktur war ebenfalls besonders gut ausgeprägt unter 0,1% DMSO im Vergleich zu den anderen Kontrollen. Bei allen TKIs war die Mitochondrienstruktur deutlich schlechter und die Häufigkeit der MLKs (vermutlich eine Form der Mitochondriendegeneration) höher als bei den Kontrollen. Hervorzuheben ist die sehr schlechte Mitochondrienstruktur, kombiniert mit dem sehr häufigen Auftreten von MLKs bei Dasatinib. Die Autophagieaktivität wurde in den elektronenmikroskopischen Präparaten anhand der Häufigkeit von Autophagosomen bzw. Autophagolysosomen beurteilt. Hierbei stellte sich heraus, dass sie bei allen TKIs deutlich erhöht war. Hervorzuheben ist die sehr hohe Autophagieaktivität bei Lestaurtinib, Vandetanib und Lapatinib.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lassen einige Befunde eine spezifische Toxizität vermuten (Mitochondriendefekte bei Dasatinib, sarkomerische Degeneration bei Lestaurtinib). Bei den meisten anderen TKIs ergibt sich ein Bild aus sarkomerischer/mitochondrialer Degeneration und vermehrter Autophagie. Eine wichtige offene Frage in diesem Zusammenhang ist der primäre toxische Effekt. Kommt es durch vermehrtes Anfallen von dysfunktionellen sarkomerischen/mitochondrialen Strukturen zu einer Aktivierung der Autophagie oder ist eine unphysiologisch gesteigerte Autophagie die Ursache für eine sarkomerische/mitochondriale Schädigung?

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob es anhand von FBMEs aus neonatalen Rattenherzzellen möglich ist, die Kardiotoxizität von TKIs zu beschreiben und ob dieses *in vitro* Modell dazu beitragen kann, die TKI-vermittelte Kardiotoxizität besser zu verstehen. Hierfür wurden neun Kinaseinhibitoren untersucht. Klinisch ist für sieben von ihnen das Auftreten einer linksventrikulären Dysfunktion beschrieben worden (Chen et al. 2008; Eschenhagen et al. 2011). Ein Vergleich der gewonnenen Daten mit klinisch evaluierten Ergebnissen zur LVDF sollte eine Einordnung des Messsystems für die Beurteilung dieser Medikamentengruppe ermöglichen. Den Schwerpunkt der Analyse bildete die video-optische Bestimmung der Kontraktionskraft.

### 4.1 TKIs und Kardiotoxizität

Obwohl mittlerweile acht der neun TKIs zugelassen sind (Vandetanib ausschließlich durch die FDA), existiert nur für Sunitinib eine sichere klinische Datenlage, die die Kardiotoxizität eindeutig feststellt (Force & Kolaja 2011). Eine weitere groß angelegte Studie für Lapatinib erbrachte den Nachweis einer geringeren Kardiotoxizität (Perez et al. 2008). Die Patienten wurden allerdings zuvor mit Trastuzumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper behandelt, weshalb eine eindeutige Beurteilung von Lapatinib nicht möglich ist. Für alle übrigen zugelassenen TKIs existieren ausschließlich Fallstudien und Phase III-Studien limitierter Größe, mit denen eine präzise Beurteilung der linksventrikulären Funktion nicht möglich ist (Force & Kolaja 2011). Mit größerer Wahrscheinlichkeit wird die Kardiotoxizität vieler TKIs eher unterschätzt. Gründe hierfür sind:

- (i) Patienten mit kardiovaskulären Komorbiditäten, die naturgemäß für kardiale UAWs empfänglicher sind, werden von den Studien ausgeschlossen (Force et al. 2007).
- (ii) Die Studien umfassen einen zu kurzen Zeitraum, um langfristige Nebenwirkungen zu erfassen (Force et al. 2007).
- (iii) Innerhalb der Studien ist bisher keine systematische Untersuchung der kardialen Pumpfunktion durchgeführt worden (Force & Kolaja 2011).

Die in der Einleitung zu jedem Medikament dargestellten kardialen Nebenwirkungen machen deutlich, welche Rolle die Kardiotoxizität für die Zulassung solcher Medikamente spielt. Der Mechanismus der TKI-vermittelten LVDF ist unklar und derzeitige Einschätzungen gehen davon aus, dass es sich nicht um einen einheitlichen Mechanismus handelt (Force et al. 2007).

### **4.2 Korrelation der klinischen Kardiotoxizität (LVDF) und den Ergebnissen der *in vitro* Screening-Plattform**

Zur Klärung der Frage, ob es mit Hilfe von FBMEs aus neonatalen Rattenkardiomyozyten als *in vitro* Modell möglich ist, kardiotoxische Effekte darzustellen, wurde ein multimodales Auswertungssystem gewählt, in dem neben der Kontraktionskraft histologische, enzymchemische und proteinbiochemische Parameter evaluiert wurden. Die Planung beinhaltete auch die Untersuchung hoher Konzentrationen, um die möglicherweise geringe Empfindlichkeit des Messsystems gegenüber TKI-bedingten Effekten, die unter klinischen Bedingungen teilweise erst nach Monaten bis Jahren auftreten (Orphanos et al. 2009), sichtbar zu machen. Neben der kürzeren Dauer des Beobachtungszeitraums sind andere Gründe zu nennen, die eine geringere Empfindlichkeit des Messsystems bedingen. Im Modell werden neonatale Rattenherzzellen verwendet, wohingegen die klinischen Untersuchungen am Menschen durchgeführt wurden. Das glukosehaltige Zellkulturmedium, in dem Zellen vermehrt Glykolyse betreiben, macht sie weniger anfällig für oxidativen Stress, einen möglichen Mechanismus der TKI-vermittelten Kardiotoxizität (Force & Kolaja 2011). Aufgrund der hohen Lipophilie (Tab. 2) und der geringen Löslichkeit der TKIs in wässrigen Lösungen musste bei einigen TKIs die Konzentration des Vehikels (DMSO) auf 1% eingestellt werden, damit der Versuchsaufbau umgesetzt werden konnte. Dadurch wurde für Erlotinib, Lapatinib und Vandetanib nur eine maximale Konzentration im Bereich des 10-100fachen von  $C_{\max}$  erzielt. Für Lestaurtinib war trotz dieser Anpassung nur eine  $C_{\max}$  im Bereich des 1-10fachen zu erreichen. Obwohl diese uneinheitliche Auswahl an Konzentrationen bestand, ergab die Analyse der FBMEs interessante Korrelationen zwischen dem Auftreten von LVDF unter klinischen Bedingungen und den Testparametern im FBME Messsystem. Als Parameter haben sich die Befunde in Tabelle 8 herauskristallisiert.

| TKI          | LVDF | FBME-<br>Kontraktivität ↓ | Autophagie<br>im WB | LDH | EM                                                                   |
|--------------|------|---------------------------|---------------------|-----|----------------------------------------------------------------------|
| Gefitinib    |      | X                         | X                   |     | Autophagie↑<br>Sarkomere↓                                            |
| Erlotinib    |      |                           |                     |     | Autophagie↑<br>Sarkomere↓                                            |
| Lapatinib    | X    | X                         | XX                  | X   | <b>Autophagie↑↑</b><br>Sarkomere↓                                    |
| Imatinib     | X    | X                         | X                   | X   | Autophagie↑<br>Sarkomere↓                                            |
| Dasatinib    | X    |                           |                     |     | <b>Mitochondriale<br/>Dysfunktion/<br/>Autophagie↑</b><br>Sarkomere↓ |
| Sunitinib    | X    | X                         | XX                  |     | Autophagie↑<br>Sarkomere↓                                            |
| Sorafenib    | X    | X                         | X                   | X   | Autophagie↑<br>Sarkomere↓                                            |
| Vandetanib   | X    | X                         | XX                  | X   | <b>Autophagie↑↑</b><br>Sarkomere↓                                    |
| Lestaurtinib | X    | X                         | XX                  | X   | <b>Zebra-<br/>Körperchen</b><br><b>Autophagie↑↑</b><br>Sarkomere↓    |

**Tab. 8: Zusammenschau der aussagekräftigen Parameter zur Evaluation des Messsystems**

Dargestellt sind die wesentlichen Befunde, die mit dem klinischen Auftreten der LVDF korrelieren. Besondere elektronenmikroskopische Befunde sind hervorgehoben. WB, Westernblot; LDH, Laktatdehydrogenase; EM, Elektronenmikroskopie

Während die Kontraktivität, die Autophagie im Westernblot (LC3-Ratio) und die Veränderungen der LDH-Konzentration gut zu quantifizieren sind, fällt dies für die elektronenmikroskopischen Veränderungen schwer. Die Auswahl der Beurteilungskriterien fiel daher auf im Vergleich zu den Kontrollen eindeutige Veränderungen. In den folgenden Abschnitten wird auf Tabelle 8 näher eingegangen.

#### 4.2.1 Kontraktivität

Die Eingangsuntersuchung stellte die Beurteilung der Kontraktivität dar. Hierbei zeigte sich ein Verlust in Gegenwart von allen TKIs, die im klinischen Gebrauch mit einer LVDF assoziiert sind, mit Ausnahme von Dasatinib. Auf der anderen Seite traten verminderte Kontraktionskräfte auch in Gegenwart von Gefitinib auf, ohne dass für

diesen Wirkstoff eine LVDF beschrieben wäre (Tab. 8). Ergänzt wurden die Kontraktilitätsmessungen durch die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand. Tyrosinkinase-Inhibitoren, die eine Verminderung der Kontraktionskraft bewirken, führten zum großen Teil (mit Ausnahme von Gefitinib und Sunitinib) auch zu einer Freisetzung von LDH. Diese Korrelation deutet darauf hin, dass die Verminderung der Kontraktionskraft durch einen zytotoxischen Effekt hervorgerufen wurde. Die Messung der CK ergibt in diesem Zusammenhang keinen weiteren Aufschluss, da sie sich als zu empfindlich darstellt und nicht mit der Verminderung der Kontraktionskraft korreliert. Die LDH-Freisetzung ist mit großer Wahrscheinlichkeit Folge des Zelltods. Allerdings suggeriert die Kinetik der LDH-Freisetzung einen zytotoxischen Effekt bereits nach 48 und nicht nach 96 h. Eine mögliche Schlussfolgerung aus dieser Beobachtung ist, dass der Zeitpunkt für die weiteren Analysen (Histologie, Elektronenmikroskopie, Westernblot-Verfahren) retrospektiv nicht optimal gewählt worden ist. Eine Besonderheit, auf die noch weiter eingegangen werden soll, ist das Sistieren der spontanen Kontraktionen innerhalb von 2 Stunden unter Lestaurtinib, Sorafenib und Vandetanib. Dies könnte ein Hinweis für einen besonders potenten kardiotoxischen Effekt sein, allerdings wurde unter Sunitinib, welcher als besonders kardiotoxischer TKI eingestuft wurde (Orphanos et al. 2009), kein solcher Effekt beobachtet. Vielmehr spricht die Beobachtung dafür, dass in diesen Fällen ein Signalweg moduliert wurde, der kardiomyozytäre Kontraktilität inhibiert. Ein spezieller Signalweg, der hierfür verantwortlich sein könnte, ist nicht bekannt. Auffällig war allerdings die Ähnlichkeit der Kinetik des Kontraktilitätsverlustes in unseren Versuchen und in einer 2005 veröffentlichten Studie. Hierin untersuchten Bernstein et al. (2005) die kardioprotektive Wirkung von beta-2-Rezeptoren. Der Vergleich zwischen Wildtyp-Kontrollen und *Knock-out*-Mäusen für den beta-1- bzw. beta-2-Rezeptor zeigte, dass die beta-2-*Knock-out*-Mäuse nach einer Doxorubicin-Intervention (15 mg/kg KG) innerhalb von 30 Minuten an einem kardiogenen Schock starben. Funktionell konnte dieses mit einer 20fachen Steigerung der p38 MAPK in Verbindung gebracht werden. Durch Behandlung mit dem p38 MAPK-Inhibitor SB-203580 wurde dieser Effekt aufgehoben. Ähnliche Beobachtungen an Wildtyp-Mäusen unter der Behandlung mit dem selektiven beta-2-Antagonisten ICI-118,551 bestätigten die Ergebnisse. Die molekularen Mechanismen, wie durch die Aktivierung des beta-2-Rezeptors eine Verminderung der p38 MAPK-Aktivität und damit die kardioprotektive Wirkung

bewirkt wird, bleiben im Unklaren (Bernstein et al. 2005). Aufgrund der Ähnlichkeit der zeitlichen Zusammenhänge mit der beobachteten Kontraktionskraftverminderung durch Lestaurtinib, Sorafenib und Vandetanib wurde untersucht, ob eine vermehrte Aktivität der p38 MAPK nachweisbar ist. Gegen die These des beta-2-Rezeptor-vermittelten Kontraktilitätsverlustes spricht, dass sich das Ausmaß der Kontraktionskraftverminderung unter Gabe von Doxorubicin in Anwesenheit eines TKIs nicht veränderte. Einen Einfluss von Doxorubicin konnte in der Studie von Bernstein et al. (2005) hingegen gezeigt werden. Die Ergebnisse des pp38 MAPK-Westernblots zeigten, dass eine Zunahme der aktivierten Form mit diesen drei TKIs nicht eindeutig assoziiert war. Während unter Vandetanib eine konzentrationsabhängige Zunahme der phosphorylierten p38 MAPK vermutet werden kann, zeigte sich dieses Bild unter Sorafenib und Lestaurtinib nicht. Auf der anderen Seite wurde eine substantielle Verstärkung des Signals für die pp38 MAPK unter Imatinib und Erlotinib nach zweistündiger Inkubation beobachtet. Diese führten nicht zu einer akuten Verminderung der Kontraktilität. Zusammenfassend ist eine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK teilweise zu beobachten, stellt jedoch höchstwahrscheinlich nicht den Mechanismus dar, der für den schnellen Abfall der Kontraktionskraft verantwortlich ist.

### **4.2.2 Beurteilung der histologischen und elektronenmikroskopischen Ergebnisse**

Für die histologische Beurteilung der FBMEs (H&E,  $\alpha$ -Actinin, Connexin-43) wurden die Effekte der höchsten Konzentration der TKIs beurteilt. Die deutlich schlechtere zelluläre Struktur für Imatinib, Lapatinib, Lestaurtinib, Sorafenib und Vandetanib unterstreicht die zytotoxische Wirkung dieser TKIs. Damit findet sich hier ein morphologisches Korrelat für den Anstieg der LDH-Aktivität im Überstand. Bemerkenswert ist, dass für Sunitinib und Gefitinib histologisch keine substantielle Zytotoxizität und kein LDH-Anstieg nachgewiesen werden konnte. Insgesamt gaben die histologischen Aufnahmen allerdings nur einen sehr oberflächlichen Eindruck von der Zellstruktur, sodass die Aussagekraft dieser Untersuchung eingeschränkt ist. Eine detailliertere Analyse war durch die elektronenmikroskopische Analyse möglich. Hierbei wurde eine sarkomerische Degeneration mit schlechter Ausbildung der A- und I-Banden sowie der Z-Linien beobachtet. Weitere Befunde waren mitochondriale

Schädigungen und eine gesteigerte Autophagie. Diese Veränderungen waren prinzipiell für alle TKIs nachweisbar, wobei graduelle Unterschiede bestanden (Tab. 7), die aber nicht auf einen spezifischen primären Effekt schließen lassen. Hiervon ausgenommen waren die sehr häufigen mitochondrialen Veränderungen mit Ausbildung von Multilammelären-Körperchen (MLK) unter Lapatinib, Vandetanib, Lestaurtinib und insbesondere Dasatinib und die sarkomerische Degeneration mit Auftreten von Zebra-Körperchen unter Lestaurtinib. Das Auftreten von MLKs ist nicht ganz einfach zu interpretieren, da sie unter physiologischen wie unter pathologischen Bedingungen auftreten können (Schmitz & Müller 1991). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten MLKs sind wahrscheinlich degenerative Formen von Mitochondrien. Es kann eine gewisse Korrelation zwischen dem Auftreten von MLKs und Autophagie vermutet werden (Tab. 7). Dass das Auftreten von MLKs nicht mit einer erhöhten Autophagie (Daten des LC3-Westernblots) oder einer Kontraktionskraftverminderung einhergehen muss, zeigt sich allerdings unter Dasatinib. Dort treten keine Veränderung der Kontraktilität oder Erhöhungen der LC3-II/I-Ratio auf.

Wie bereits erwähnt, ist über die Funktion der Zebra-Körperchen (ZKs) wenig bekannt und ihr Vorkommen in adultem Gewebe sehr selten (Dedkov et al. 2007). Sie sind vereinzelt bei einigen neuromuskulären Erkrankungen beschrieben (Zierz & Jerusalem 2003), treten z.B. auch beim Morbus Fabry auf (Tabira et al. 1974) oder stellen eine eigene Erkrankungsentität (Zebra-Körperchen-Myopathie) dar (Zierz & Jerusalem 2003). Die Studie von Dedkov et al. (2007) legt einen Zusammenhang des Auftretens von ZKs und der Myofibrillogenese nahe. In einem Infarktmodell an Ratten zeigte sich dort im Grenzbereich des Infarktes eine erhöhte Dichte an ZKs. Eine Assoziation von ZK-Auftreten und kardialen Remodeling wurde vermutet, wohingegen ein direkter Übergang von ZKs zu Myofibrillen nicht beobachtet werden konnte. In degenerierenden Kardiomyozyten wurden hingegen keine ZKs gefunden. In diesem Zusammenhang interessant ist die Reversibilität der Kontraktionskraftverminderung unter Lestaurtinib und dem Auftreten der ZKs. Diese Reversibilität wurde zwar unter Vandetanib ebenfalls beobachtet (hierunter wurden keine ZKs beobachtet), war jedoch nicht so deutlich wie unter Lestaurtinib. Sollten ZKs für die Myofibrillogenese und damit die Kontraktilität eine Rolle spielen, dann wären die Beobachtungen unter Lestaurtinib hiermit gut übereinzubringen. Zu

berücksichtigen ist, dass in *in vitro* Modellen unter bestimmten Bedingungen (Zellkontakt mit künstlichem Substrat, Verlust interzellulärer Kontakte, fehlende Vaskularisation sowie neurohumorale Kontrolle) das artifizielle Auftreten von ZKs beobachtet wurde (Dedkov et al. 2007). Dieses vermindert die Aussagekraft des Modells bezüglich der ZKs, erklärt jedoch nicht den Unterschied von Lestaurtinib zu den übrigen TKIs.

### 4.2.3 Beurteilung der Autophagie

Autophagie ist neben dem Ubiquitin-Proteasom-System ein Mechanismus, mit dem die Zelle Proteine und Organellen abbaut. Sie ist unter anderem für den Erhalt des Gleichgewichts zwischen Produktions- und Abbauprozessen sowie die Anpassung an Stresssituationen (Kroemer & Levine 2008) verantwortlich. Ihre Modulation spielt eine wichtige Rolle in der Onkogenese (Kroemer & Levine 2008; Mizushima et al. 2008). Die starke Aktivierung der Autophagie in der Elektronenmikroskopie war der primäre Anhalt, diesen Befund weiter zu untersuchen. Um dies zu erhärten, wurden Westernblot-Analysen von zwei Konzentrationen jedes TKIs untersucht. Als Marker der Aktivierung der Autophagie diente die Steigerung der LC3-II/I-Ratio. Die Westernblot-Analyse zeigte, dass sieben der neun TKIs eine substantielle konzentrationsabhängige Steigerung der Autophagie aufwiesen. Interessanterweise fallen die sieben TKIs mit der stärksten Steigerung der Autophagie genau mit denen zusammen, für die eine Verminderung der Kontraktilität gemessen wurde. Diese Korrelation wirft die Frage auf, ob eine Steigerung der Autophagie per se in der Lage ist, die Kontraktilität zu vermindern, oder ob die vermehrte Autophagie vielmehr durch vermehrtes Anfallen von dysfunktionellen Mitochondrien und/oder sarkomerischen Proteinen verursacht ist. Ebenfalls bleibt ungeklärt, ob die Zunahme biochemischer (LC3-II/I Ratio) und morphologischer Parameter der Autophagie (Autophagosomen) auf eine primäre Aktivierung der Autophagie oder aber auf eine Hemmung des Abbaus der Autophagosomen und damit letztlich eine Hemmung des Autophagie-Flusses zurückgeht. Der lysosomale Verdau geht nämlich mit dem Abbau von LC3-II einher, sodass deutlich wird, dass die LC3-II/I-Ratio nur die Anzahl der Autophagosomen widerspiegelt (Mizushima et al. 2010). Dies ist wichtig, da eine Blockade des Verdau sowie der Fusion von Autophagosom und Lysosom somit ebenfalls zu einer Erhöhung der LC3-Ratio führen würde. Erzielt werden kann dies

beispielsweise durch Chloroquin, Bafilomycin A1 oder Pepstatin A (Tanida et al. 2005). Der Einfluss der TKIs auf wichtige Regulatoren der Initiation der Autophagie (Abb. 2) lässt zumindest die Steigerung der Autophagie als Ursache der Zunahme wahrscheinlicher erscheinen. Diese Frage könnte beispielsweise durch die Bestimmung des Autophagie-Flusses mittels einer Inhibition durch Bafilomycin A1 beantwortet werden. Unter Lestaurtinib sowie Sorafenib 100  $\mu$ M zeigten sich im Vergleich zu den anderen TKIs deutlich schwächere Signale sowohl von LC3-I als auch LC3-II. Eine mögliche Ursache könnte eine *Upstream*-Blockade z.B. durch PI3K-Inhibition darstellen (Mizushima et al. 2010). Eine andere wäre, dass eine Induktion der Autophagie über einen längeren Zeitraum (mehr als 2 h) mit einer Verminderung von LC3-II einhergehen kann (Mizushima & Yoshimori 2007). Dies zeigt, wie schwierig eine eindeutige Interpretation dieser Ergebnisse ist.

### 4.2.4 Fazit

Insgesamt stellt sich heraus, dass keiner der gemessenen Parameter als alleiniger Marker mit der Schwere der LVDF im klinischen Einsatz exakt übereinstimmt. Dennoch konnte ein Kontraktionskraftverlust für die meisten TKIs gezeigt werden, die auch klinisch zumindest im Verdacht stehen, einen Einfluss auf die linksventrikuläre Pumpfunktion auszuüben. Untermauert werden die Daten der Kontraktionsverminderung durch die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der LDH und insbesondere durch die Westernblot-Ergebnisse der LC3-II/I-Ratio. Ein falsch-positives Ergebnis zeigte sich unter Gefitinib, das zu einer Kontraktionskraftverminderung führte, aber im klinischen Einsatz bisher nicht mit einer LVDF assoziiert war. Einschränkend lässt sich in diesem Zusammenhang das Argument anfügen, dass unter Gefitinib nur eine Verminderung und kein vollständiger Verlust der Kontraktionskraft festgestellt wurde. Ein falsch-negatives Ergebnis zeigte sich unter Dasatinib. Dies ist interessant, da die Inhibition der ABL-Kinase zumindest teilweise für die kardialen Nebenwirkungen unter Imatinib verantwortlich zu sein scheint (Fernández et al. 2007) und es sich bei Dasatinib um einen 325fach potenteren Inhibitor der ABL-Kinase handelt (Kantarjian et al. 2010). Als Erklärung wäre eine veränderte ABL-Kinase, ein abweichender Mechanismus der Kardiotoxizität von Ratte und Mensch oder ein zu kurzer Untersuchungszeitraum vorstellbar. Zusätzlich ist zu bedenken, dass Dasatinib im therapeutischen

Konzentrationsbereich wesentlich mehr Kinasen inhibiert als Imatinib (Karaman et al. 2008). Im Falle von Dasatinib könnte die Klärung des Ursprungs der MLK von gesondertem Interesse sein. Ihr Auftreten konnte in keinem anderen FBME in ähnlichem Ausmaß beobachtet werden. Deutet man die MLKs als einen Hinweis für einen toxischen Effekt durch Degeneration der Mitochondrien, wäre für Dasatinib ein Versuchsaufbau über einen längeren Zeitraum durchaus sinnvoll, da bei einem längeren Beobachtungszeitraum eine Kontraktionskraftverminderung beobachtet werden könnte, die bisher nicht beschrieben worden ist.

In der Zusammenschau der Befunde stellt sich die Frage, ob die Zunahme der Autophagie ein primäres Ereignis ist, das zu einer Schädigung von Sarkomeren und Mitochondrien führt, oder ob die vermehrte Autophagie die Folge einer Zunahme an dysfunktionalen sarkomerischen Proteinen und Mitochondrien ist. Die Vermutung, dass aktivierte und/oder gestörte Autophagie zur Kardiotoxizität einiger TKIs beitragen könnte, wird durch Veröffentlichungen, die die Modulation von Autophagie als ein Wirkmechanismus der TKIs diskutierten (Ullén et al. 2010; Huang et al. 2011), unterstützt. Um die Aussagekraft des *in vitro* Modells für die Untersuchung von TKIs weiter zu verbessern, könnte die Evaluation neuer zusätzlicher Parameter (z.B. kardiales Troponin T, Zellhypertrophie) von Nutzen sein. Das größte Potential zur Validierung der Messergebnisse bietet sicherlich die Kombination mehrerer Parameter sowie der Einsatz unterschiedlicher Kardiomyozyten, inklusive Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen. Dieses Modell ist möglicherweise auch besser geeignet, proarrhythmische Effekte von TKIs zu erfassen. Hierfür sind Modelle aus Rattenherzzellen nicht gut geeignet, da proarrhythmische Effekte häufig über Ionenkanalinteraktionen vermittelt werden und hier sehr große Unterschiede zwischen Menschen und Ratten/Mäusen bestehen (Nerbonne & Kass 2005).

### **4.3 Der Vergleich mit anderen *in vitro* und *in vivo* Modellen**

Die präklinische Evaluation kardiotoxischer Wirkungen von Arzneimitteln ist nach wie vor schwierig. Das Zusammenspiel aus biologischen Unterschieden zwischen den Spezies (Mensch und Tier), Betrachtung kardialer Funktionen des Herzgewebes *in vitro* und unphysiologische Stimuli bzw. Verhältnisse (Zellkulturmedium, 3-D-Matrix

bzw. Einzellkonglomerate etc.) machen eine direkte Übertragbarkeit auf den Menschen sowie die Feststellung klarer Ursache-Wirkungs-Beziehungen schwierig. Für biomedizinische Testverfahren gilt als ideale Komposition die Verbindung aus hoher Durchsatzrate (*high throughput*) und großer Informationsdichte durch die gleichzeitige Bestimmung vieler Parameter (*high content, multi-parameter*). Zusätzlich ist es wünschenswert, physiologische oder physiologie-nahe Parameter zu messen, da diese eine leichtere Interpretation der Messergebnisse erlauben. Eine Annäherung an diese ideale Kombination ist insbesondere im Falle TKI-vermittelter Kardiotoxizität wünschenswert, wo kein einheitlicher Mechanismus der Toxizität vermutet wird (Force et al. 2007). Eine wichtige typische Einschränkung von *in vitro* Testsystemen für Kardiotoxizität ist die Schwierigkeit, Kombinationen von physiologischen Parametern über Tage bis Wochen unter standardisierten Bedingungen zu messen (z.B. 2-D-Kulturen von primären Kardiomyozyten, Piper et al. 1988). An diesem Punkt setzt das FBME-Messsystem an, das die Möglichkeit bietet, neben der Kontraktionskraft weitere (histologische, enzymchemische und proteinbiochemische) Parameter (*high content, multi-parameter*) über Wochen zu analysieren. Durch das 24-Well Format ist ein akzeptabler Durchsatz erreicht worden, jedoch handelt es sich im biomedizinischen Sinne noch nicht um eine hohe Durchsatzrate. Zusätzlich bietet es die Perspektive, humane Kardiomyozyten für toxikologische Untersuchungen zu verwenden (Zimmermann & Eschenhagen 2007, Schaaf 2011).

Alternativ bzw. ergänzend zu den *in vitro* Testsystemen kommen präklinische *in vivo* Systeme als Toxizitätsmodell zur Anwendung. Vorteilhaft ist die Berücksichtigung des Arzneistoffmetabolismus (auch wenn es hier Unterschiede zum Menschen gibt), des Herzens als ganzes Organ sowie der sich nicht primär auf das Herz auswirkenden (z.B. Arteriosklerose, Bluthochdruck) Kardiotoxizität. Nachteilig ist, dass der gesamte Organismus über viele Kompensationsmechanismen verfügt, die die Interpretation der Messergebnisse erschweren, und es liegt in der Natur der Sache begründet, dass keine *in vivo* Testsysteme mit menschlichem Myokard zur Verfügung stehen. Wie bei allen präklinischen *in vivo* Verfahren ist deren Anwendbarkeit auf den Menschen aufgrund der Unterschiede der Spezies eingeschränkt. Trotzdem können viele, im Menschen medikamentös induzierte, Ereignisse auch im Tiermodell nachgewiesen werden. In einer Studie mit 36 für den

Menschen kardiovaskulär toxischen Medikamenten konnte eine Übereinstimmung zwischen Tier (Nager und Nicht-Nager) und Mensch in ca. 80% der Fälle aufgezeigt werden. Nager erwiesen sich im Vergleich zu anderen höheren Säugern als weniger geeignet. So liegt die Übereinstimmung in dieser Studie für alle 150 getesteten Medikamente und alle untersuchten toxischen Effekte bei ca. 71%. Nicht-Nagetiere alleine weisen eine Übereinstimmung in 63% der Fälle auf, während es bei Nagetieren nur 43% sind (Olson et al. 2000). Diese geringere Konkordanzrate ist am ehesten durch die Distanz zwischen Nagetieren, höheren Säugetieren und Menschen in der Phylogenese zu erklären. Daran wird deutlich, wie wichtig die Auswahl des Organismus für die Prädiktion der toxischen Effekte ist. Umso wichtiger scheint die Findung aussagekräftiger *in vivo* und *in vitro* Testverfahren, die zusammengenommen eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität bedingen. Ein Modell, das in den letzten 10 Jahren vermehrten Zulauf erfährt, ist das des Zebrafisches. Evolutionär bestehen zwischen Fisch und Säuger größere Differenzen, zumal der Fisch nicht über Lungen, Prostata, Haut und Brustdrüsen verfügt. Neben diesen vermeintlichen Unterschieden bzw. Nachteilen bietet das Modell des Zebrafisches jedoch insbesondere im kardiovaskulären Bereich einige Vorteile. Die Transparenz des Fisches ermöglicht eine direkte Beobachtung von Herzfunktion, Frequenz, Rhythmus und Zirkulation (Kari et al. 2007). Da die Fischembryos auch ohne intakte Zirkulation ca. eine Woche überleben können, macht es sie für den Einsatz von anti- bzw. proangiogenetischen Medikamenten interessant (Chan et al. 2002; Seng et al. 2004). Des Weiteren zeigte eine Studie mit 10 für die Kardiotoxizität gut charakterisierten Medikamenten eine hohe Konkordanzrate zwischen Fisch und Mensch (Langheinrich et al. 2003). Dies bietet gute Voraussetzungen für die präklinische Analyse vermeintlich kardiotoxischer Substanzen wie beispielsweise TKIs. In der Studie von Cheng et al. (2011) wird das Potential dieses Modells für die Evaluation der TKIs hervorgehoben. So konnten Hypothesen über den kardiotoxischen Mechanismus einzelner TKIs aufgestellt werden und klinisch-toxische von nicht-toxischen TKIs unterschieden werden. Weiterer wichtige Aspekte sind, dass Haltung sowie Zucht kostengünstig sind und das Verfahren gut automatisierbar ist (Kari et al. 2007).

Eine große Herausforderung für die Zukunft wird sein, aussagekräftige *in vitro* und *in vivo* Screening-Plattformen zu etablieren. Die Kombination aus beidem hat das

Potential, Tierversuche einzusparen und gleichzeitig für den Menschen eine höhere Sicherheit in der Medikamentenentwicklung zu gewährleisten.

### 4.4 Ausblick

Die Weiterentwicklung präklinischer Testsysteme (*in vitro* wie *in vivo*) dient zum einem dem Einsparen von Tierversuchen, zum anderen sollen UAWs frühzeitig in der Medikamentenentwicklung erkannt werden, wodurch die Sicherheit für den Menschen verbessert wird. Aufgrund der schwerwiegenden Folgen hat die frühe Detektion von kardialen UAWs einen hohen Stellenwert in der Entwicklung neuer Medikamente, jedoch sind die Möglichkeiten präklinischer Testsysteme bis heute relativ limitiert. Das von Hansen et al. (2010) entwickelte Messsystem kann als Bindeglied zwischen einfachen, meist sensitiveren, *in vitro* Systemen (z.B. *human ether-a-go-go related gene*-überexprimierende HEK 293 Zellen) und komplexeren *in vivo* Modellen (Nagetier, Großtier oder Zebrafisch) betrachtet werden. Seine Aussagekraft bzw. Limitation für die Analyse von TKIs ist Thema dieser Arbeit gewesen. Es konnten einige Parameter im FBME-Messsystem identifiziert werden, die mit dem Auftreten von LVDF korrelieren. Damit ist die Basis geschaffen, um weitere Untersuchungen vorzunehmen. Nächste Schritte werden sein, die molekularen Ursachen für die beschriebenen Effekte zu identifizieren. Hier sind in erster Linie Zeitreihen notwendig, um den initialen toxischen Effekt am FBME-System darzustellen. Der Wirkungsmechanismus der TKIs legt die Vermutung nahe, dass die toxischen Effekte auf einer Inhibition von Kinasen basieren. Daher wäre eine interessante weitere Untersuchung eine Phosphoproteomanalyse, die dazu beitragen könnte, die Kinasekandidaten zu identifizieren, deren Inhibition mit einem Kontraktilitätsverlust einhergeht. Möglicherweise bietet in diesem Zusammenhang ein FBME-Messsystem aus humanen Kardiomyozyten (z.B. aus iPS-Zellen) auch einen Vorteil. Ob die Verwendung humaner Kardiomyozyten die erhoffte Korrelation klinischer Ergebnisse bzw. die entsprechende Aussagekraft hat, bleibt aber offen.

## 5 Zusammenfassung

Tyrosinkinase-Inhibitoren stellen neue und selektivere Krebsmedikamente dar als die bisherigen Chemotherapeutika. Trotz ihrer höheren Selektivität sind die Mechanismen ihrer Wirkung und Nebenwirkungen im Detail noch nicht geklärt. Viele von ihnen weisen kardiovaskuläre UAWs auf, denen wahrscheinlich kein einheitlicher Wirkungsmechanismus zugrunde liegt. Unter den kardiovaskulären Nebenwirkungen tritt die LVDF sehr häufig auf. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob anhand eines Fibrin-basierten mini-EHT (FBME)-Messsystems die klinische LVDF detektiert werden kann und ob dies dazu beitragen kann, den Wirkmechanismus besser zu verstehen. Dazu wurden FBMEs mit TKIs in vier unterschiedlichen Konzentrationen über einen Zeitraum von 96 Stunden inkubiert.

Die kontraktile Parameter wurden mit einem video-optischen Messsystem analysiert. Zusätzlich Aussagen wurden durch mikroskopische-, klinisch-chemische- und Proteinexpressionsanalysen ermöglicht. Folgende Ergebnisse liegen vor:

- (i) Die Kontraktionskraftverminderung im FBME-System konnte für die meisten (6/7) kardiotoxischen TKIs nachgewiesen werden. Von zwei TKIs ohne Assoziation mit LVDF führte eines zu einer Kontraktionskraftverminderung im FBME-System.
- (ii) Das Auftreten der Kontraktionskraftverminderung im FBME-System korrelierte sehr gut mit der Aktivierung der Autophagie (LC3-II/I-Ratio).
- (iii) Als mögliche Ursache für die Autophagie zeigte sich eine, in den elektronenmikroskopischen Analysen unterschiedlich ausgeprägte, sarkomerische und mitochondriale Degeneration. Die stark aktivierte Autophagie konnte durch den Nachweis von Autophago(lyso)somen bestätigt werden. Die vermehrte LDH-Aktivität im Zellkulturmedium legt die Vermutung nahe, dass es sekundär zu einer Zelllyse kam.

Die Beobachtung von sarkomerischer und mitochondrialer Schädigung und gesteigerter Autophagie wirft die Frage auf, welcher dieser beiden Mechanismen der primär toxisch ist. Zusätzlich schließt sich an die Ergebnisse dieser Arbeit die Frage an, welcher molekulare Mechanismus, das heißt die Hemmung welcher Kinasen, für die Kontraktionskraftverminderung verantwortlich ist und ob diese Ergebnisse in

FBMEs aus humanen iPS-Zell-FBMEs reproduziert werden können. Die gute Korrelation zwischen dem Auftreten von LVDF und einem Kontraktionsverlust im FBME-System verdeutlicht das Potential dieses Messsystems.

## 6 Summary

Tyrosin kinase inhibitors (TKI) represent a new group of more selective anticancer drugs. Their mechanism of action and side effects are not fully understood. Despite their selectivity many of them lead to unwanted cardiovascular effects especially left ventricular dysfunction (LVD). A uniform mechanism causing these effects does not seem to exist. This doctoral thesis deals with the question whether LVD of tyrosin kinase inhibitors is detectable by the fibrin-based mini-EHT (FBME)-system and whether this test setup could contribute to the understanding of the underlying mechanism. Therefore the FBMEs were incubated in four different concentrations of TKIs for 96 hours. The analyses of the contractile parameter by a video-optical measurement system were extended by microscopical studies, clinical chemistry- and protein expression-analyses with following conclusions:

- (i) A contractile force decrement was observed in most of the TKI-treated FBMEs (6/7) with known cardiotoxicity. One out of two non-cardiotoxic TKIs also led to decline of contractility.
- (ii) The appearance of contractile force decrementation in the FBME-system correlates very well with the activation of autophagy (LC3-II/I-ratio).
- (iii) A potential reason for increased autophagy in electromicroscopical analyses revealed a variable degree of sarcomeric and mitochondrial degeneration. The high activity of autophagy was also suggested by the high frequency of autophago(lyso)soms. The increased LDH activity in cell culture medium is suggesting secondary cell lyses.

The appearance of sarcomeric and mitochondrial degeneration and the upregulation of autophagy is raising the question which of these potentially toxic events is primary. Future experiments should address which cell signaling pathways or specific kinases are primarily involved in the negative inotropic effects of some of the TKIs. Another interesting aspect is the question if these data can be reproduced in human IPS-cell-FBMEs.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akker, N.M.S. Van den, Winkel, L.C.J., Nisancioglu, M.H., Maas, S., Wisse, L.J., Armulik, A., Poelmann, R.E., Lie-Venema, H., Betsholtz, C. & Gittenberger-de Groot, A.C., 2008. PDGF-B signaling is important for murine cardiac development: its role in developing atrioventricular valves, coronaries, and cardiac innervation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(2), pp.494–503. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18213589> [Accessed March 29, 2012].
- Anjum, R. & Blenis, J., 2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(10), pp.747–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813292> [Accessed June 10, 2011].
- Atallah, E., Durand, J.-B., Kantarjian, H. & Cortes, J., 2007. Congestive heart failure is a rare event in patients receiving imatinib therapy. *Blood*, 110(4), pp.1233–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449798> [Accessed December 12, 2010].
- Barry, S.P., Townsend, P.A., Latchman, D.S. & Stephanou, A., 2007. Role of the JAK-STAT pathway in myocardial injury. *Trends in molecular medicine*, 13(2), pp.82–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194625> [Accessed March 27, 2012].
- Bello, C.L., Mulay, M., Huang, X., Patyna, S., Dinolfo, M., Levine, S., Vugt, A. Van, Toh, M., Baum, C. & Rosen, L., 2009. Electrocardiographic characterization of the QTc interval in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic-pharmacodynamic evaluation of sunitinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(22), pp.7045–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19903787> [Accessed June 10, 2011].
- Bernstein, D., Fajardo, G., Zhao, M., Urashima, T., Powers, J., Berry, G. & Kobilka, B.K., 2005. Differential cardioprotective/cardiotoxic effects mediated by beta-adrenergic receptor subtypes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(6), pp.H2441–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040722> [Accessed January 22, 2012].
- Bezjak, A., Tu, D., Seymour, L., Clark, G., Trajkovic, A., Zukin, M., Ayoub, J., Lago, S., Albuquerque Ribeiro, R. de, Gerogianni, A., Cyjon, A., Noble, J., Laberge, F., Chan, R.T.-T., et al., 2006. Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: quality of life analysis of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(24), pp.3831–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921034> [Accessed June 3, 2011].
- Bian, W., Liao, B., Badie, N. & Bursac, N., 2009. Mesoscopic hydrogel molding to control the 3D geometry of bioartificial muscle tissues. *Nature protocols*, 4(10),

- pp.1522–34. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2924624&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 27, 2012].
- Bjarnegård, M., Enge, M., Norlin, J., Gustafsdottir, S., Fredriksson, S., Abramsson, A., Takemoto, M., Gustafsson, E., Fässler, R. & Betsholtz, C., 2004. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development (Cambridge, England)*, 131(8), pp.1847–57. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084468> [Accessed March 28, 2012].
- Boer, R. de, Humblet, Y., Wolf, J., Nogová, L., Ruffert, K., Milenkova, T., Smith, R., Godwood, A. & Vansteenkiste, J., 2009. An open-label study of vandetanib with pemetrexed in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 20(3), pp.486–91. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088171> [Accessed February 11, 2012].
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D. & Yuan, Junying, 2005. A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5711), pp.935–9. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705855> [Accessed March 28, 2012].
- Brave, M., Goodman, V., Kaminskas, E., Farrell, A., Timmer, W., Pope, S., Harapanhalli, R., Saber, H., Morse, D., Bullock, J., Men, A., Noory, C., Ramchandani, R., Kenna, L., et al., 2008. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(2), pp.352–9. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18223208> [Accessed September 11, 2010].
- Burris, H. a, Taylor, C.W., Jones, S.F., Koch, K.M., Versola, M.J., Arya, N., Fleming, R. a, Smith, D. a, Pandite, L., Spector, N. & Wilding, G., 2009. A phase I and pharmacokinetic study of oral lapatinib administered once or twice daily in patients with solid malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(21), pp.6702–8. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19825948> [Accessed January 14, 2011].
- Caporali, A. & Emanuelli, C., 2009. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiological reviews*, 89(1), pp.279–308. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2836529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 16, 2011].
- Cappuzzo, F., Ciuleanu, T., Stelmakh, L., Cienas, S., Szczésna, A., Juhász, E., Esteban, E., Molinier, O., Brugger, W., Melezínek, I., Klingelschmitt, G., Klughammer, B. & Giaccone, G., 2010. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *The lancet oncology*, 11(6), pp.521–529. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493771>.

- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), pp.932–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355210> [Accessed March 28, 2012].
- Carrier, R.L., Papadaki, M., Rupnick, M., Schoen, F.J., Bursac, N., Langer, R., Freed, L.E. & Vunjak-Novakovic, G., 1999. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnology and bioengineering*, 64(5), pp.580–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404238> [Accessed March 27, 2012].
- Chan, J., Bayliss, P.E., Wood, J.M. & Roberts, T.M., 2002. Dissection of angiogenic signaling in zebrafish using a chemical genetic approach. *Cancer cell*, 1(3), pp.257–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086862> [Accessed January 3, 2013].
- Chen, M.H., Kerkelä, R. & Force, T., 2008. Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation*, 118(1), pp.84–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2735334&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/2735334&rendertype=abstract> [Accessed May 19, 2011].
- Cheng, H. & Force, T., 2010. Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circulation research*, 106(1), pp.21–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056943> [Accessed May 16, 2011].
- Cheng, H., Kari, Gabor, Dicker, A.P., Rodeck, Ulrich, Koch, W.J. & Force, T., 2011. A novel preclinical strategy for identifying cardiotoxic kinase inhibitors and mechanisms of cardiotoxicity. *Circulation research*, 109(12), pp.1401–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998323> [Accessed January 20, 2012].
- Cheong, H., Lu, C., Lindsten, T. & Thompson, C.B., 2012. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nature biotechnology*, 30(7), pp.671–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2285> [Accessed November 9, 2012].
- Chintalgattu, V., Ai, D., Langley, R.R., Zhang, J., Bankson, J.A., Shih, T.L., Reddy, A.K., Coombes, K.R., Daher, I.N., Pati, S., Patel, S.S., Pocius, J.S., Taffet, G.E., Buja, L.M., et al., 2010. Cardiomyocyte PDGFR-beta signaling is an essential component of the mouse cardiac response to load-induced stress. *The Journal of clinical investigation*, 120(2), pp.472–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2810076&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/2810076&rendertype=abstract> [Accessed March 28, 2012].
- Choueiri, T.K., Schutz, F. a B., Je, Y., Rosenberg, J.E. & Bellmunt, J., 2010. Risk of arterial thromboembolic events with sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(13), pp.2280–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351323>.

- Chu, T.F., Rupnick, M. a, Kerkela, R., Dallabrida, S.M., Zurakowski, D., Nguyen, L., Woulfe, K., Pravda, E., Cassiola, F., Desai, J., George, S., Morgan, J. a, Harris, D.M., Ismail, N.S., et al., 2007. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet*, 370(9604), pp.2011–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2643085&tool=pmcencetrez&rendertype=abstract> [Accessed June 3, 2011].
- Chu, T.F., Rupnick, M.A., Kerkela, R., Dallabrida, S.M., Zurakowski, D., Nguyen, L., Woulfe, K., Pravda, E., Cassiola, F., Desai, J., George, S., Morgan, J.A., Harris, D.M., Ismail, N.S., et al., 2007. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet*, 370(9604), pp.2011–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2643085&tool=pmcencetrez&rendertype=abstract> [Accessed March 29, 2012].
- Crone, S. a, Zhao, Y.-Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K.L., Chen, Ju, Kahn, R., Condorelli, G., Ross, J., Chien, K.R. & Lee, K.-F., 2002. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nature medicine*, 8(5), pp.459–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11984589> [Accessed March 29, 2012].
- Cuello, F., Bardswell, S.C., Haworth, R.S., Ehler, E., Sadayappan, S., Kentish, J.C. & Avkiran, M., 2011. Novel role for p90 ribosomal S6 kinase in the regulation of cardiac myofilament phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 286(7), pp.5300–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3037642&tool=pmcencetrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2011].
- Dedkov, E.I., Stadnikov, A. a, Russell, M.W. & Borisov, A.B., 2007. Formation of leptofibrils is associated with remodelling of muscle cells and myofibrillogenesis in the border zone of myocardial infarction. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 38(6), pp.659–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015018> [Accessed December 30, 2012].
- Demetri, G.D., Oosterom, A.T. van, Garrett, C.R., Blackstein, M.E., Shah, M.H., Verweij, J., McArthur, G., Judson, I.R., Heinrich, M.C., Morgan, J.A., Desai, J., Fletcher, C.D., George, S., Bello, C.L., et al., 2006. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet*, 368(9544), pp.1329–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046465> [Accessed April 16, 2011].
- Demetri, G.D., Russo, P. Lo, MacPherson, I.R.J., Wang, D., Morgan, J. a, Brunton, V.G., Paliwal, P., Agrawal, S., Voi, M. & Evans, T.R.J., 2009. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(19), pp.6232–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789325> [Accessed August 5, 2010].
- Dutta, D., Calvani, R., Bernabei, R., Leeuwenburgh, C. & Marzetti, E., 2012. Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *Circulation research*, 110(8), pp.1125–38.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22499902> [Accessed December 28, 2012].

Erp, N.P. van, Gelderblom, H. & Guchelaar, H.-J., 2009. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer treatment reviews*, 35(8), pp.692–706. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733976> [Accessed November 1, 2010].

Eschenhagen, T., Fink, C., Remmers, U., Scholz, H., Wattchow, J., Weil, J., Zimmermann, W.-H., Dohmen, H.H., Schäfer, H., Bishopric, N., Wakatsuki, T. & Elson, E.L., 1997. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(8), pp.683–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9240969> [Accessed March 27, 2012].

Eschenhagen, T., Force, T., Ewer, M.S., Keulenaer, G.W. de, Suter, T.M., Anker, S.D., Avkiran, M., Azambuja, E. de, Balligand, J.-L., Brutsaert, D.L., Condorelli, G., Hansen, A., Heymans, S., Hill, J. a, et al., 2011. Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European journal of heart failure : journal of the Working Group on Heart Failure of the European Society of Cardiology*, 13(1), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169385> [Accessed March 24, 2011].

Faivre, S., Delbaldo, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N., Bello, C., Deprimo, S., Brega, N., Massimini, G., Armand, J.-P., Scigalla, P. & Raymond, E., 2006. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(1), pp.25–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314617> [Accessed May 26, 2011].

Fernández, A., Sanguino, A., Peng, Z., Ozturk, E., Chen, Jianping, Crespo, A., Wulf, S., Shavrin, A., Qin, C., Ma, J., Trent, Jonathan, Lin, Y., Han, Hee-dong, Mangala, L.S., et al., 2007. An anticancer C-Kit kinase inhibitor is reengineered to make it more active and less cardiotoxic. *The Journal of clinical investigation*, 117(12), pp.4044–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2104494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 11, 2010].

Ferrarini, M., Arsic, N., Recchia, F. a, Zentilin, L., Zacchigna, S., Xu, X., Linke, A., Giacca, M. & Hintze, T.H., 2006. Adeno-associated virus-mediated transduction of VEGF165 improves cardiac tissue viability and functional recovery after permanent coronary occlusion in conscious dogs. *Circulation research*, 98(7), pp.954–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543500> [Accessed March 29, 2012].

Force, T. & Kolaja, K.L., 2011a. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nature Reviews Drug*

- Discovery*, 10(2), pp.111–126. Available at:  
<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nrd3252> [Accessed February 2, 2011].
- Force, T. & Kolaja, K.L., 2011b. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(2), pp.111–26. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21283106> [Accessed July 21, 2011].
- Force, T., Krause, D.S. & Etten, R.A. Van, 2007. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nature reviews. Cancer*, 7(5), pp.332–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17457301>.
- French, K.J., Coatney, R.W., Renninger, J.P., Hu, C.X., Gales, T.L., Zhao, S., Storck, L.M., Davis, C.B., McSurdy-Freed, J., Chen, E. & Frazier, K.S., 2010. Differences in effects on myocardium and mitochondria by angiogenic inhibitors suggest separate mechanisms of cardiotoxicity. *Toxicologic pathology*, 38(5), pp.691–702. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616376> [Accessed April 11, 2011].
- Geyer, C.E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C.G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., Skarlos, D., Campone, M., Davidson, N., Berger, M., et al., 2006. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*, 355(26), pp.2733–43. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192538> [Accessed November 24, 2010].
- Ghoreschi, K., Laurence, A. & O'Shea, J.J., 2009. Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? *Nature immunology*, 10(4), pp.356–60. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2758543&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [Accessed March 29, 2012].
- Gordon, M.S., Matei, D., Aghajanian, C., Matulonis, U. a, Brewer, M., Fleming, G.F., Hainsworth, J.D., Garcia, A. a, Pegram, M.D., Schilder, R.J., Cohn, D.E., Roman, L., Derynck, M.K., Ng, K., et al., 2006. Clinical activity of pertuzumab (rhuMAb 2C4), a HER dimerization inhibitor, in advanced ovarian cancer: potential predictive relationship with tumor HER2 activation status. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(26), pp.4324–32. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16896006> [Accessed March 29, 2012].
- Hansen, A., Eder, A., Bönstrup, M., Flato, M., Mewe, M., Schaaf, S., Aksehirlioglu, B., Schwörer, A., Uebeler, J. & Eschenhagen, T., 2010. Development of a Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue. *Circulation research*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448218>.
- Hasinoff, B.B. & Patel, D., 2010. Mechanisms of myocyte cytotoxicity induced by the multikinase inhibitor sorafenib. *Cardiovascular toxicology*, 10(1), pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915982> [Accessed May 26, 2011].



- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3245247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 29, 2012].
- Huang, Y., Khait, L. & Birla, R.K., 2007. Contractile three-dimensional bioengineered heart muscle for myocardial regeneration. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 80(3), pp.719–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17154158> [Accessed March 27, 2012].
- Iyer, R., Evans, A.E., Qi, X., Ho, R., Minturn, J.E., Zhao, H., Balamuth, N., Maris, J.M. & Brodeur, G.M., 2010. Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(5), pp.1478–85. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2831131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2011].
- Izumiya, Y., Shiojima, I., Sato, K., Sawyer, D.B., Colucci, W.S. & Walsh, K., 2006. Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. *Hypertension*, 47(5), pp.887–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3132898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 28, 2012].
- Kane, R.C., Farrell, A.T., Madabushi, R., Booth, B., Chattopadhyay, S., Sridhara, R., Justice, R. & Pazdur, R., 2009. Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *The oncologist*, 14(1), pp.95–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144678> [Accessed June 3, 2011].
- Kane, R.C., Farrell, A.T., Saber, H., Tang, S., Williams, G., Jee, J.M., Liang, C., Booth, B., Chidambaram, N., Morse, D., Sridhara, R., Garvey, P., Justice, R. & Pazdur, R., 2006. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(24), pp.7271–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17189398> [Accessed June 3, 2011].
- Kantarjian, H., Shah, N.P., Hochhaus, A., Cortes, J., Shah, S., Ayala, M., Moiraghi, B., Shen, Z., Mayer, J., Pasquini, R., Nakamae, H., Huguet, F., Boqué, C., Chuah, C., et al., 2010. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 362(24), pp.2260–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525995> [Accessed July 31, 2010].
- Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J.P., Lockhart, D.J., et al., 2008. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology*, 26(1), pp.127–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18183025> [Accessed December 10, 2012].
- Kari, G, Rodeck, U & Dicker, A.P., 2007. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical pharmacology and therapeutics*,

82(1), pp.70–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17495877> [Accessed January 22, 2012].

Karpanen, T., Bry, M., Ollila, H.M., Seppänen-Laakso, T., Liimatta, E., Leskinen, H., Kivelä, R., Helkamaa, T., Merentie, M., Jeltsch, M., Paavonen, K., Andersson, L.C., Mervaala, E., Hassinen, I.E., et al., 2008. Overexpression of vascular endothelial growth factor-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy. *Circulation research*, 103(9), pp.1018–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762522&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 29, 2012].

Kaushik, S. & Cuervo, A.M., 2012. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in cell biology*, 22(8), pp.407–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748206> [Accessed December 28, 2012].

Kerkela, R., Woulfe, K.C., Durand, J.-B., Vagnozzi, R., Kramer, D., Chu, T.F., Beahm, C., Chen, M.H. & Force, T., 2009. Sunitinib-induced cardiotoxicity is mediated by off-target inhibition of AMP-activated protein kinase. *Clinical and translational science*, 2(1), pp.15–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2011].

Kerkelä, R., Grazette, L., Yacobi, R., Iliescu, C., Patten, R., Beahm, C., Walters, B., Shevtsov, S., Pesant, S., Clubb, F.J., Rosenzweig, A., Salomon, R.N., Etten, R. a Van, Alroy, J., et al., 2006. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nature medicine*, 12(8), pp.908–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862153> [Accessed November 24, 2010].

Keulenaer, G.W. De, Doggen, K. & Lemmens, K., 2010. The vulnerability of the heart as a pluricellular paracrine organ: lessons from unexpected triggers of heart failure in targeted ErbB2 anticancer therapy. *Circulation research*, 106(1), pp.35–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056944> [Accessed September 23, 2010].

Khakoo, A.Y., Kassiotis, C.M., Tannir, N., Plana, J.C., Halushka, M., Bickford, C., Trent, Jon, Champion, J.C., Durand, J.-B. & Lenihan, D.J., 2008. Heart failure associated with sunitinib malate: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer*, 112(11), pp.2500–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18386829> [Accessed April 10, 2011].

Kohlhuber, F., Rogers, N.C., Watling, D., Feng, J., Guschin, D., Briscoe, J., Witthuhn, B.A., Kotenko, S. V, Pestka, S., Stark, G.R., Ihle, J.N. & Kerr, I.M., 1997. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Molecular and cellular biology*, 17(2), pp.695–706. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231795&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 29, 2012].

- Krause, D.S. & Etten, R. a Van, 2005. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *The New England journal of medicine*, 353(2), pp.172–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014887> [Accessed March 27, 2012].
- Kroemer, G. & Levine, B., 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(12), pp.1004–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2727358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 28, 2012].
- Kuramochi, Y., Guo, X. & Sawyer, D.B., 2006. Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 41(2), pp.228–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1847613&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 27, 2011].
- Langheinrich, U., Vacun, G. & Wagner, T., 2003. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. *Toxicology and applied pharmacology*, 193(3), pp.370–82. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15367566> [Accessed January 3, 2013].
- Leo, A. Di, Gomez, H.L., Aziz, Z., Zvirbule, Z., Bines, J., Arbushites, M.C., Guerrero, S.F., Koehler, M., Oliva, C., Stein, S.H., Williams, L.S., Dering, J., Finn, R.S. & Press, M.F., 2008. Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first-line treatment for metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(34), pp.5544–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2651098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 14, 2011].
- Levis, M., Ravandi, F., Wang, E.S., Baer, M.R., Perl, A., Coutre, S., Erba, H., Stuart, R.K., Baccarani, M., Cripe, L.D., Tallman, M.S., Meloni, G., Godley, L. a., Langston, a. a., et al., 2011. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood*, pp.3294–3301. Available at: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-08-301796> [Accessed January 27, 2011].
- Lombardo, L.J., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., Barrish, J.C., Behnia, K., Castaneda, S., Cornelius, L.A.M., Das, J., Doweiko, A.M., Fairchild, C., Hunt, J.T., Inigo, I., Johnston, K., et al., 2004. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)- piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4- ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *Journal of medicinal chemistry*, 47(27), pp.6658–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15615512> [Accessed March 28, 2012].
- Lorenzo, G. Di, Autorino, R., Bruni, G., Cartenì, G., Ricevuto, E., Tudini, M., Ficorella, C., Romano, C., Aieta, M., Giordano, A., Giuliano, M., Gonnella, A., Nunzio, C.

- De, Rizzo, M., et al., 2009. Cardiovascular toxicity following sunitinib therapy in metastatic renal cell carcinoma: a multicenter analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 20(9), pp.1535–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474115> [Accessed June 10, 2011].
- Mardjuadi, F., Medioni, J., Kerger, J., D'Hondt, L., Canon, J.-L., Duck, L., Musuamba, F., Oudard, Stephane, Clausse, M., Moxhon, A. & Machiels, J.-P., 2012. Phase I study of sorafenib in combination with docetaxel and prednisone in chemo-naïve patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 70(2), pp.293–303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752248> [Accessed January 9, 2013].
- Marshall, J.L., Kindler, H., Deeken, J., Bhargava, P., Vogelzang, N.J., Rizvi, N., Luhtala, T., Boylan, S., Dordal, M., Robertson, P., Hawkins, M.J. & Ratain, M.J., 2005. Phase I trial of orally administered CEP-701, a novel neurotrophin receptor-linked tyrosine kinase inhibitor. *Investigational new drugs*, 23(1), pp.31–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528978> [Accessed June 14, 2011].
- May, D., Gilon, D., Djonov, V., Itin, A., Lazarus, A., Gordon, O., Rosenberger, C. & Keshet, E., 2008. Transgenic system for conditional induction and rescue of chronic myocardial hibernation provides insights into genomic programs of hibernation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), pp.282–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2224202&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [Accessed March 28, 2012].
- Mellor, H.R., Bell, A.R., Valentin, J.-P. & Roberts, R.R. a, 2011. Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 120(1), pp.14–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177772> [Accessed May 26, 2011].
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. & Klionsky, D.J., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), pp.1069–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2670399&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [Accessed October 29, 2012].
- Mizushima, N. & Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), pp.542–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611390> [Accessed November 14, 2012].
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B., 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3), pp.313–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852113&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [Accessed October 29, 2012].
- Mok, T.S., Wu, Y., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Ohe, Y.,

- Yang, J., Chewaskulyong, B., et al., 2009. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England journal of medicine*, 361(10), pp.947–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19692680>.
- Moore, M., Hirte, H.W., Siu, L., Oza, A., Hotte, S.J., Petrenciuc, O., Cihon, F., Lathia, C. & Schwartz, B., 2005. Phase I study to determine the safety and pharmacokinetics of the novel Raf kinase and VEGFR inhibitor BAY 43-9006, administered for 28 days on/7 days off in patients with advanced, refractory solid tumors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(10), pp.1688–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006586> [Accessed May 26, 2011].
- Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Rixe, O., Oudard, Stéphane, Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S.T., Chen, I., Bycott, P.W., Baum, C.M. & Figlin, R.A., 2007. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*, 356(2), pp.115–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215529> [Accessed July 21, 2010].
- Murray, P.J., 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(5), pp.2623–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312100> [Accessed March 29, 2012].
- Nerbonne, J.M. & Kass, R.S., 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews*, 85(4), pp.1205–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183911> [Accessed January 22, 2012].
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monroe, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Deun, K. Van, Smith, P., Berger, B. & Heller, A., 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 32(1), pp.56–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029269> [Accessed January 22, 2012].
- Orphanos, G.S., Ioannidis, G.N. & Ardavanis, A.G., 2009. Cardiotoxicity induced by tyrosine kinase inhibitors. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 48(7), pp.964–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734999> [Accessed December 27, 2012].
- Ozcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S., Hübner, N., Chien, K.R., Birchmeier, C. & Garratt, A.N., 2002. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), pp.8880–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=124392&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 29, 2012].
- O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., et al., 2003. Imatinib compared with interferon

- and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 348(11), pp.994–1004. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12637609> [Accessed December 13, 2010].
- Peng, B., Hayes, M., Resta, D., Racine-Poon, A., Druker, B.J., Talpaz, M., Sawyers, C.L., Rosamilia, M., Ford, J., Lloyd, P. & Capdeville, R., 2004. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(5), pp.935–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990650> [Accessed February 24, 2011].
- Perez, E.A., Koehler, M., Byrne, J., Preston, A.J., Rappold, E. & Ewer, M.S., 2008. Cardiac safety of lapatinib: pooled analysis of 3689 patients enrolled in clinical trials. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 83(6), pp.679–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533085> [Accessed May 30, 2011].
- Piper, H.M., Jacobson, S.L. & Schwartz, P., 1988. Determinants of cardiomyocyte development in long-term primary culture. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 20(9), pp.825–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3230587> [Accessed January 3, 2013].
- Prados, M.D., Lamborn, K.R., Chang, S., Burton, E., Butowski, N., Malec, M., Kapadia, A., Rabbitt, J., Page, M.S., Fedoroff, A., Xie, D. & Kelley, S.K., 2006. Phase 1 study of erlotinib HCl alone and combined with temozolomide in patients with stable or recurrent malignant glioma. *Neuro-oncology*, 8(1), pp.67–78. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1871925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Raza, A., Franklin, M.J. & Dudek, A.Z., 2010. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *American journal of hematology*, 85(8), pp.593–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20540157> [Accessed August 30, 2010].
- Rhodin, J.A. & Fujita, H., 1989. Capillary growth in the mesentery of normal young rats. Intravital video and electron microscope analyses. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 21(1), pp.1–34. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=6652106> [Accessed March 28, 2012].
- Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., Hu, Y., Tan, Z., Stokes, M., Sullivan, L., et al., 2007. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*, 131(6), pp.1190–203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083107> [Accessed March 28, 2012].
- Ron, D., 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *The Journal of clinical investigation*, 110(10), pp.1383–8. Available at:
-

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=151821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 28, 2012].
- Sano, M., Minamino, T., Toko, H., Miyauchi, H., Orimo, M., Qin, Y., Akazawa, H., Tateno, K., Kayama, Y., Harada, M., Shimizu, I., Asahara, T., Hamada, H., Tomita, S., et al., 2007. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*, 446(7134), pp.444–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334357> [Accessed March 28, 2012].
- Santos, F.P.S., Kantarjian, Hagop M, Jain, N., Manshouri, T., Thomas, D. a, Garcia-Manero, G., Kennedy, D., Estrov, Z., Cortes, J. & Verstovsek, S., 2010. Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood*, 115(6), pp.1131–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008298> [Accessed June 16, 2011].
- Schmitz, G. & Müller, G., 1991. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *Journal of lipid research*, 32(10), pp.1539–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1797938> [Accessed December 5, 2011].
- Schwartzberg, L.S., Schwarzberg, L.S., Franco, S.X., Florance, A., O'Rourke, L., Maltzman, J. & Johnston, S., 2010. Lapatinib plus letrozole as first-line therapy for HER-2+ hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *The oncologist*, 15(2), pp.122–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156908> [Accessed December 9, 2010].
- Seng, W.L., Eng, K., Lee, J. & McGrath, P., 2004. Use of a monoclonal antibody specific for activated endothelial cells to quantitate angiogenesis in vivo in zebrafish after drug treatment. *Angiogenesis*, 7(3), pp.243–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609079> [Accessed January 3, 2013].
- Shahbazian, D., Roux, P.P., Mieulet, V., Cohen, M.S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.W.B., Blenis, J., Pende, M. & Sonenberg, N., 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *The EMBO journal*, 25(12), pp.2781–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1500846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 2, 2012].
- Shapira-Schweitzer, K., Habib, M., Gepstein, L. & Seliktar, D., 2009. A photopolymerizable hydrogel for 3-D culture of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and rat neonatal cardiac cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(2), pp.213–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027751> [Accessed March 27, 2012].
- Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., Kikuchi, A., Umezu, M. & Okano, T., 2002. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circulation research*, 90(3), p.e40. Available at:

- <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/hh0302.105722> [Accessed March 27, 2012].
- Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R., Colucci, W.S. & Walsh, K., 2005. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *The Journal of clinical investigation*, 115(8), pp.2108–18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1180541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 28, 2012].
- Smith, B Douglas, Levis, Mark, Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K.M., Dausen, T., Allebach, J. & Small, Donald, 2004. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 103(10), pp.3669–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726387> [Accessed June 19, 2011].
- Spector, N.L., Yarden, Y., Smith, B., Lyass, L., Trusk, P., Pry, K., Hill, J.E., Xia, W., Seger, R. & Bacus, S.S., 2007. Activation of AMP-activated protein kinase by human EGF receptor 2/EGF receptor tyrosine kinase inhibitor protects cardiac cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), pp.10607–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1965560&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 29, 2012].
- Swaishland, H.C., Ranson, M., Smith, R.P., Leadbetter, J., Laight, A., McKillop, D. & Wild, M.J., 2005. Pharmacokinetic drug interactions of gefitinib with rifampicin, itraconazole and metoprolol. *Clinical pharmacokinetics*, 44(10), pp.1067–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176119>.
- Tabira, T., Goto, I., Kuroiwa, Y. & Kikuchi, M., 1974. Neuropathological and biochemical studies in Fabry's disease. *Acta neuropathologica*, 30(4), pp.345–54. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00697017> [Accessed January 2, 2013].
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. & Kominami, E., 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1(2), pp.84–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16874052> [Accessed November 28, 2012].
- Tolcher, A.W., Appleman, L.J., Shapiro, G.I., Mita, A.C., Cihon, Frank, Mazzu, A. & Sundaresan, P.R., 2011. A phase I open-label study evaluating the cardiovascular safety of sorafenib in patients with advanced cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 67(4), pp.751–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3064895&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 10, 2011].
- Ullén, A., Farnebo, M., Thyrell, L., Mahmoudi, S., Kharaziha, P., Lennartsson, L., Grandér, D., Panaretakis, T. & Nilsson, S., 2010. Sorafenib induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells in vitro. *International journal of oncology*,

- 37(1), pp.15–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20514392> [Accessed December 29, 2012].
- Vandenburgh, H., Shansky, J., Benesch-Lee, F., Barbata, V., Reid, J., Thorrez, L., Valentini, R. & Crawford, G., 2008. Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. *Muscle & nerve*, 37(4), pp.438–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18236465> [Accessed February 28, 2011].
- Walsh, K. & Shiojima, I., 2007. Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), pp.3176–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2045631&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 29, 2012].
- Wang, C.-H., Anderson, N., Li, S.-H., Szmitko, P.E., Cherng, W.-J., Fedak, P.W.M., Fazel, S., Li, R.-K., Yau, T.M., Weisel, R.D., Stanford, W.L. & Verma, S., 2006. Stem cell factor deficiency is vasculoprotective: unraveling a new therapeutic potential of imatinib mesylate. *Circulation research*, 99(6), pp.617–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931795> [Accessed March 28, 2012].
- Webster, K. a, Discher, D.J. & Bishopric, N.H., 1993. Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry*, 268(22), pp.16852–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8344964> [Accessed March 29, 2012].
- Wedge, S.R., Ogilvie, D.J., Dukes, M., Kendrew, J., Chester, R., Jackson, J.A., Boffey, S.J., Valentine, P.J., Curwen, J.O., Musgrove, H.L., Graham, G.A., Hughes, G.D., Thomas, A.P., Stokes, E.S.E., et al., 2002. ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer research*, 62(16), pp.4645–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183421> [Accessed June 23, 2011].
- Will, Y., Dykens, J. a, Nadanaciva, S., Hirakawa, B., Jamieson, J., Marroquin, L.D., Hynes, J., Patyna, S. & Jessen, B. a, 2008. Effect of the multitargeted tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, sunitinib, and sorafenib on mitochondrial function in isolated rat heart mitochondria and H9c2 cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 106(1), pp.153–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664550> [Accessed July 29, 2010].
- Xu, Z., Cang, S., Yang, T. & Liu, D., 2009. Cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia therapy. *Hematology Reports (formerly Hematology Reviews)*, 1(1), pp.17–21. Available at: <http://www.pagepress.org/journals/index.php/hr/article/view/4> [Accessed May 19, 2011].
- Xuan, Y.T., Guo, Y., Han, Hui, Zhu, Y. & Bolli, R., 2001. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), pp.9050–5.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55371&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 29, 2012].

Yamaura, G., Turoczi, T., Yamamoto, F., Siddiqui, M. a Q., Maulik, N. & Das, D.K., 2003. STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(2), pp.H476–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860560> [Accessed June 14, 2011].

Zentilin, L., Puligadda, U., Lionetti, V., Zacchigna, S., Collesi, C., Pattarini, L., Ruozi, G., Camporesi, S., Sinagra, G., Pepe, M., Recchia, F. a & Giacca, M., 2010. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(5), pp.1467–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20019242> [Accessed October 21, 2010].

Zhang, K. & Kaufman, R.J., 2004. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 279(25), pp.25935–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15070890> [Accessed March 28, 2012].

Zhu, X., Stergiopoulos, K. & Wu, S., 2009. Risk of hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: systematic review and meta-analysis. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 48(1), pp.9–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752081> [Accessed June 10, 2011].

Zimmermann, W.-H. & Eschenhagen, T., 2007. Embryonic stem cells for cardiac muscle engineering. *Trends in cardiovascular medicine*, 17(4), pp.134–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482096> [Accessed May 26, 2011].

Zimmermann, W.-H., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Didié, M., Münzel, F., Heubach, J.F., Kostin, S., Neuhuber, W.L. & Eschenhagen, T., 2002. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circulation research*, 90(2), pp.223–30. Available at: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/hh0202.103644> [Accessed March 27, 2012].

## Bücher und andere Quellen

- **Draft Consensus guideline.** The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals (S7B; 2005). Zugriff über: [www.ich.org](http://www.ich.org)

- **Dietel et al. 2009:** Harrisons Innere Medizin, Dt. Ausgabe der 17. Auflage Band 2, ABW Wissenschaftsverlag 2009, ISBN: 978-3-86541-310-9
- **Zierz & Jerusalem 2003:** Muskelerkrankungen, Dt. Ausgabe der 3. neu bearbeiteten Auflage, Thieme Verlag 2003, ISBN 3-13-567803-2
- **Dissertation:**
  - **Schaaf 2011:** Künstliche Herzgewebe aus humanen embryonalen Stammzellen als Testsystem für Arzneistoffe. Pharmazeutisch chemische Dissertation, Universität Hamburg.
- **Internetseiten:**
  - 1 <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/To-desursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html?nn=50808>  
(Zugriff: März 2012)
  - 2 [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/022405s000lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/022405s000lbl.pdf) (Zugriff: Juni 2011)
  - 3 <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM235092.pdf>  
(Zugriff: Juni 2011)
  - 4 [http://books.google.de/books?id=b61ArwGVU0QC&pg=PA477&lpg=PA477&dq=lestaurtinib+half&source=bl&ots=ZNEUb4rj8\\_&sig=zVqcUqLQJlrGJ8hDFhGCiN6k\\_pY&hl=de&sa=X&ei=W\\_ovT4fDFYmr0QXglsWtCA&sqi=2&ved=0CDQQ6AEwAQ#v=onepage&q=lestaurtinib%20half&f=false](http://books.google.de/books?id=b61ArwGVU0QC&pg=PA477&lpg=PA477&dq=lestaurtinib+half&source=bl&ots=ZNEUb4rj8_&sig=zVqcUqLQJlrGJ8hDFhGCiN6k_pY&hl=de&sa=X&ei=W_ovT4fDFYmr0QXglsWtCA&sqi=2&ved=0CDQQ6AEwAQ#v=onepage&q=lestaurtinib%20half&f=false)  
(Zugriff: Januar 2012)
  - 5 <http://www.cellsignal.com/pathways/angiogenesis.jsp> (Zugriff: Mai 2011)
  - 6 [http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/gleevec\\_tabs.pdf](http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/gleevec_tabs.pdf)  
(Zugriff: Mai 2011)
  - 7 [http://packageinserts.bms.com/pi/pi\\_sprycel.pdf](http://packageinserts.bms.com/pi/pi_sprycel.pdf) (Zugriff: Mai 2011)
  - 8 Fachinfo für Sorafenib (Zugriff: Mai 2011)
  - 9 <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-services/Applications/Drug-Discovery/DD-Misc/Drug-Discovery-Posters.html#Kinases>  
(Zugriff: Juni 2011)
  - 10 <http://www.drugcite.com/?q=LESTAURTINIB&s=&a=2> (Zugriff: März 2012)
  - 11 [http://packageinserts.bms.com/pi/pi\\_sprycel.pdf](http://packageinserts.bms.com/pi/pi_sprycel.pdf) (Zugriff: April 2012)

## 8 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen. Zum einen für die Vergabe der Promotionsarbeit und die optimalen Arbeitsbedingungen und zum anderen dafür, dass er mir eine Promotion bei Dr. Arne Hansen nahegelegt hat. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für die intensive Betreuung über die letzten Jahre. Ich hätte mir wohl kaum einen besseren und menschlicheren Betreuer wünschen können. Ich wusste ihn und seine Unterstützung stets hinter mir und danke ihm für seine Geduld. Für mich war die Promotion unter ihm *haargenau* die richtige Entscheidung.

Ohne die AG Hansen wäre das ganze Projekt nicht umsetzbar gewesen, weshalb ihr mindestens ebensoviel Dank gebührt. June, Marianne und Thomas danke ich für die wöchentlichen Zellpräparationen und Thomas im Speziellen für sein stets offenes Ohr, seine Anstrengungen beim Westernblot und für die viele Gesprächszeit, in der wir beide dasselbe meinten und trotzdem minutenlang aneinander vorbeigeredet haben. Alex und Sebastian danke ich für ihre Erfahrung und ihre stete Bereitschaft, diese weiterzugeben. Das praktische Knowhow von Alex hat vieles leichter gemacht und ohne Sebastians technische Hilfe (GraphPad, Mendeley etc.) wäre ich wohl beim Schreiben verzweifelt. Ingra danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihre lebenswerte Art und ihre zahlreichen Aliquots. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen des Instituts, die mich auf meinem Weg begleitet haben, für ihre Mitmenschlichkeit, das exzellente Arbeitsklima und für die Zeit, die wir außerhalb des Instituts miteinander zugebracht haben. Unvergessen sind Betriebsausflug, Weihnachtsfeiern, das Tippspiel und die Pillendreher. Explizit erwähnt seien noch Angelikas Kuchenmontage und ihre erfrischend fröhliche Art, ohne die mir so mancher Arbeitstag (insbesondere die Samstage) schwerer von der Hand gegangen wäre. Silke danke ich für die netten Gespräche, ob nun in der Küche oder beim Schockgefrieren der FBMEs im flüssigen Stickstoff. Außerhalb des Instituts gilt mein Dank dem Institut für Neuropathologie und dort insbesondere Sandra Deutsch und Dr. Melanie Neumann, die sich für mich und meine Belange immer viel Zeit genommen haben. Für seine elektronenmikroskopische Expertise danke ich Pradeep Luther, der für das Vorankommen dieser Arbeit wichtigen Anstoß gegeben hat.

Meiner Freundin Hannah danke ich für den Rückhalt und die Liebe, die sie mir gibt, für ihre Rücksicht, wenn ich mal wieder 6 Tage in der Woche im Institut verbracht

habe und dann genervt nach Hause kam und nicht zuletzt für ihre Geduld beim Korrigieren meiner Arbeit. Für die wirklich letzte Korrektur, trotzdem er so wenig freie Zeit hat, danke ich meinem Onkel Jo.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, auf die ich mich immer verlassen kann, und zum Abschluss bei meinen Eltern. Ihr habt mich immer unterstützt, mir ein Gespür für das Gute mitgegeben und mich zu dem gemacht, was ich bin. Ich danke euch!

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis und Si-Einheiten

| Abkürzungen       |                                                                                                         |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3-MA              | 3-Methyladenin                                                                                          |
| A                 | Ampere                                                                                                  |
| A-Bande           | anisotrope-Bande                                                                                        |
| Abb               | Abbildung                                                                                               |
| ABL1/2            | Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1/2                                                      |
| Ad                | Addieren, auffüllen auf                                                                                 |
| ADP               | Adenosindiphosphat                                                                                      |
| AKT               | Proteinkinase B                                                                                         |
| AML               | Acute myeloid leukemia, akute myeloische Leukämie                                                       |
| AMP               | Adenosinmonophosphat                                                                                    |
| AMPK              | 5' AMP-activated protein kinase                                                                         |
| Aqua a.i.         | Aqua ad iniectabilia                                                                                    |
| ASK               | Apoptosis signal-regulating kinase                                                                      |
| Atg               | Autophagy-related protein                                                                               |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                                                                     |
| B-ALL             | B-cell acute lymphoblastic leukaemia, akute lymphatische B-Zell Leukämie                                |
| B-Raf             | B-(rapidly growing fibrosarcoma)                                                                        |
| BCL-XL            | B-cell lymphoma-extra large                                                                             |
| BCR               | Breakpoint cluster region                                                                               |
| BDM               | 2,3-Butan-Dion Monoxim                                                                                  |
| Becn1             | Beclin-1                                                                                                |
| BL                | Baseline                                                                                                |
| BSA               | Bovines Serumalbumin, Rinderalbumin                                                                     |
| C-Kit             | Stammzellfaktor-Rezeptor                                                                                |
| C-Raf             | C-(rapidly growing fibrosarcoma), Raf1                                                                  |
| Ca                | Kalzium                                                                                                 |
| CaCl <sub>2</sub> | Kalziumchlorid                                                                                          |
| CaMKII            | Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinases II                                               |
| CaMKK             | Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase kinase                                            |
| CBFHH             | Calcium and bicarbonat free Hank's buffered HEPES, calcium- und bikarbonatfreiem Hanks Puffer mit HEPES |
| CEE               | Chick embryo extract, Hühnerembryonenextrakt                                                            |
| CEL               | Chronic eosinophilic leukaemia, chronische eosinophile Leukämie                                         |
| CK                | Kreatininkinase                                                                                         |
| CMA               | Chaperon-mediierter Autophagie                                                                          |
| C <sub>max</sub>  | Maximale Plasmakonzentration                                                                            |
| CMML              | Chronic myelomonocytic leukaemia, chronisch myelomonozytäre Leukämie                                    |
| CML               | Chronic myeloid leukaemia, chronisch myeloische Leukämie                                                |
| CQ                | Chloroquin                                                                                              |
| CREB              | CAMP response element-binding protein                                                                   |
| CSF1R             | Colony-stimulating factor 1 receptor                                                                    |
| cTN               | Kardiales Troponin                                                                                      |
| CTR               | Kontrolle                                                                                               |
| Da                | Dalton                                                                                                  |

|                  |                                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| DDR1             | Discoidin domain receptor family 1                                                 |
| DMEM             | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                                                 |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                                                                   |
| DNA              | Desoxyribonuclein acid, Desoxyribonukleinsäure                                     |
| Dnase            | Desoxyribonuklease                                                                 |
| EGF              | Epidermal growth factor                                                            |
| EGFR             | EGF-receptor                                                                       |
| EHT              | Engineered heart tissue, künstliches Herzgewebe                                    |
| eIF4E            | Eukaryotischer Initiationsfaktor 4E                                                |
| EKG              | Elektrokardiogramm                                                                 |
| EM               | Elektronenmikroskopie                                                              |
| EM(E)A           | European Medicines Agency                                                          |
| ERBB             | Human epidermal growth factor receptor                                             |
| ERBB2            | Human epidermal growth factor receptor 2, HER2                                     |
| ER               | Endoplasmatisches Retikulum                                                        |
| ERK1/2           | Extracellular-signal Regulated Kinasen 1/2, p42/p44                                |
| ESH              | European Society of Hypertension                                                   |
| FAK              | Focal adhesion kinase                                                              |
| FBME             | Firbin-based mini-EHT, Fibrin-basiertes mini-EHT                                   |
| FDA              | US Food and Drug Administration                                                    |
| FGF              | Fibroblast growth factor                                                           |
| FGFR             | FGF-receptor                                                                       |
| FIP200           | focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD                         |
| FKS              | Fötales Kälberserum                                                                |
| FLT3             | FMS-related tyrosine kinase 3                                                      |
| FS               | Fractional shortening                                                              |
| G                | Gramm                                                                              |
| g                | Erdschwerebeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )                                  |
| GIST             | Gastrointestinal stromal tumour, gastrointestinaler Strumatumor                    |
| GSK3             | Glykogen Synthase Kinase 3                                                         |
| h                | Hour, Stunde                                                                       |
| H&E (H.E.)       | Hämatoxylin-Eosin                                                                  |
| HCl              | Chlorwasserstoff                                                                   |
| HEK              | Human embryonic kidney, humane embryonale Nierenzellen                             |
| HEPES            | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                              |
| hERG             | Human ether-à-go-go related gene                                                   |
| hES-Zellen       | humane embryonale Stammzellen                                                      |
| HIF              | Hypoxia-inducible factors                                                          |
| hiPS-Zellen      | humane induzierte pluripotente Stamzellen                                          |
| HRP              | Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase                                      |
| HS               | Horse serum, Pferdeserum                                                           |
| HSP              | Hitzeschockprotein                                                                 |
| I-Bande          | Isotrope-Bande                                                                     |
| I/R              | Ischämie/Reperfusionsschaden                                                       |
| IC <sub>50</sub> | Mittlere inhibitorische Konzentration                                              |
| Ig               | Immunglobulin                                                                      |
| IRE1             | Serine/Threonin-Proteinkinase/Endoribonuklease                                     |
| I <sub>to</sub>  | Transient outward potassium current, transientser auswärtsgerichteter Kalium-Kanal |
| JAK              | Januskinase                                                                        |
| JNK              | C-Jun N-terminale Kinasen                                                          |

|                    |                                                                                         |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| K                  | Kalium                                                                                  |
| KHK                | Koronare Herzkrankheit                                                                  |
| L                  | Liter                                                                                   |
| LC3                | Microtubule associated protein 1 (MAP1) light chain 3 (LC3) kinase                      |
| LC <sub>50</sub>   | Mittlere letale Konzentration                                                           |
| LDH                | Lactatdehydrogenase                                                                     |
| LKB1               | Serin Threonin Kinase 11                                                                |
| LQTS               | Long QT syndrome, Long-QT- Syndrom                                                      |
| LVDF               | Linksventrikuläre Dysfunktion                                                           |
| LVEF               | Linksventrikuläre Ejektionsfraktion                                                     |
| M                  | Mol/l                                                                                   |
| mAb                | Monoclonal antibody, monoklonaler Antikörper                                            |
| MAPK               | Mitogen-activated protein kinase                                                        |
| MgCl <sub>2</sub>  | Magnesiumchlorid                                                                        |
| min                | Minute                                                                                  |
| MLK                | Multilamelläre-Körperchen                                                               |
| MPS                | Myeloproliferatives Syndrom                                                             |
| MST2               | Mammalian Ste20-like Kinase 2                                                           |
| MTC                | Medullary thyroid cancer, medulläres Schilddrüsenkarzinom                               |
| mTOR               | Mammalian target of rapamycin                                                           |
| MYBP               | Myosin-binding-protein                                                                  |
| n                  | Anzahl der untersuchten Proben, biologische Replikate                                   |
| N                  | Newton, Kraft: 1 kg*m*s <sup>-2</sup>                                                   |
| Na                 | Natrium                                                                                 |
| NaCl               | Natriumchlorid                                                                          |
| NaF                | Natriumfluorid                                                                          |
| NaHCO <sub>3</sub> | Natriumhydrogencarbonat                                                                 |
| NFAT               | Nuclear factor of activated T-cells                                                     |
| NHE                | Sodium-proton exchanger, Natrium-Protonen Austauscher                                   |
| NKM                | Nicht-Kardiomyozyten-Medium                                                             |
| NMVM               | Neonatal mouse ventricular myocytes, neonatale Mausventrikelmyozyten                    |
| NRG                | Neuroregulin                                                                            |
| NRVM               | Neonatal rat ventricular myocytes, neonatale Rattenventrikelmyozyten                    |
| (N)STEMI           | (Nicht-)ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt                                           |
| NSCLC              | Non-small-cell lung cancer, Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom                       |
| NT                 | Neurotrophin                                                                            |
| NYHA               | New York Heart Association                                                              |
| p                  | P-Wert, Signifikanzwert                                                                 |
| p.a.               | Pro analysi                                                                             |
| P/S (Pen/Strep)    | Penicilin/Streptomycin                                                                  |
| PBS                | Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung                 |
| PDGF               | Platelet derived growth factor                                                          |
| PDGFR              | PDGF-receptor                                                                           |
| PDK1               | Pyruvat Dehydrogenase Kinase1                                                           |
| PERK               | Doublestranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase                              |
| pH                 | Negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration |
| PI3K               | Phosphoinositid-3-Kinase                                                                |
| PKA                | Proteinkinase A                                                                         |
| PKC                | Proteinkinase C                                                                         |
| PL                 | Phospholipidose                                                                         |
| pNET               | Pancreatic neuroendocrine tumor, pankreatischer neuroendokriner Tumor                   |

## Anhang

|               |                                                                    |
|---------------|--------------------------------------------------------------------|
| PTEN          | Phosphatase and Tensin homolog                                     |
| QTc(F)        | Frequenzkorrigierte QT-Zeit (nach Fredericia)                      |
| RAS           | Rat sarcoma                                                        |
| (m)RCC        | (Metastasized) renal cell carcinoma, metastasiertes Nierenkarzinom |
| ROS           | Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies                |
| rpm           | Rounds per minute, Umdrehung pro Minute                            |
| RSK           | Ribosomale S6 Kinase                                               |
| RT            | Raumtemperatur                                                     |
| s             | Sekunde                                                            |
| SD            | Standard deviation, Standardabweichung                             |
| SDS           | Sodium Dodecyl Sulphate, Natriumdodecanylsulfat                    |
| SEM           | Standard error of the mean, Standardfehler                         |
| SFK           | Src family kinase                                                  |
| Src           | Akronym aus: cellular und sarcoma                                  |
| STAT          | Signal transducers and activators of transcription                 |
| T1            | Kontraktionszeit                                                   |
| t1/2          | Halbwertszeit                                                      |
| T2            | Relaxationszeit                                                    |
| Tab.          | Tabelle                                                            |
| TAC           | Thoracic aorta constriction, thorakale Konstriktion der Aorta      |
| TBS           | Tris buffered saline, Tris gepufferte Salzlösung                   |
| TBST          | TBS plus Tween                                                     |
| TdP-Arhythmie | Torsades de pointes-Arhythmie                                      |
| TEM           | Transmissionselektronenmikroskopie                                 |
| TEMED         | Tetramethylethyldiamin                                             |
| TIE           | Angiopoetin-Rezeptor                                               |
| TKI           | Tyrosinkinase-Inhibitor                                            |
| TRIS          | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                    |
| Trk           | Tropomyosin-Rezeptorkinas                                          |
| Tween20       | Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat                             |
| U             | Units, Enzymeinheit                                                |
| UAW           | Unerwünschte Arzneimittelwirkungen                                 |
| UKE           | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf                             |
| ULK           | Mammalian Atg1 homologues UNC-51-like kinase                       |
| Vd            | Volume of distribution, Verteilungsvolumen                         |
| VEGF          | Vascular endothelial growth factor                                 |
| VEGF-R        | VEGF-receptor                                                      |
| Vps34         | Klasse III PI3K+B28                                                |
| w/o           | Without, ohne                                                      |
| WB            | Westernblot                                                        |
| ZK            | Zebra-Körperchen                                                   |

| SI-Einheiten (Präfixe) |                           |
|------------------------|---------------------------|
| k                      | Kilo (10 <sup>3</sup> )   |
| m                      | Milli (10 <sup>-3</sup> ) |
| μ                      | Micro (10 <sup>-6</sup> ) |
| n                      | Nano (10 <sup>-9</sup> )  |

## 9.2 Material

| Material                                                                           | Hersteller              |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 2,3-Butan-Dion Monoxim (BDM)                                                       | Sigma-Aldrich           |
| Acrylamid                                                                          | Roth                    |
| Agarose (UltraPure TM )                                                            | Invitrogen              |
| Ammoniumpersulfat                                                                  | BioRad                  |
| Aprotinin                                                                          | Sigma-Aldrich           |
| Aqua ad iniectabilia                                                               | Baxter GmbH             |
| Bluing Reagent®                                                                    | Ventana medical systems |
| Bovine Serum Albumin (BSA)                                                         | Roth                    |
| Calciumchlorid Hexahydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )           | Sigma-Aldrich           |
| cc1m                                                                               | Ventana medical systems |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                                            | Sigma-Aldrich           |
| Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) | Merck                   |
| DMEM                                                                               | Gibco, Biochrom         |
| Doxorubicin                                                                        | Sigma-Aldrich           |
| Dnase II, bovine spleen Typ V                                                      | Sigma-Aldrich           |
| Einschlussmedium Acrytol®                                                          | Leica                   |
| Einschlussmedium TissueTek                                                         | Sakura                  |
| Eosin                                                                              | Merck                   |
| Essigsäure (100%)                                                                  | Sigma-Aldrich           |
| Ethanol (96%)                                                                      | Geyer                   |
| Ethanol (99%)                                                                      | J.T. Baker              |
| EZ-Prep®                                                                           | Ventana medical systems |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                                                | Sigma                   |
| Filme für Westernblot                                                              | AGFA                    |
| Fibrinogen                                                                         | Sigma-Aldrich           |
| Formalin                                                                           | Grimm MED Logistik GmbH |
| Fötales Kälberserum                                                                | Gibco                   |
| Glucose                                                                            | Sigma                   |
| Glutaraldehyd (25%)                                                                | Agar scientific         |
| Glycerol                                                                           | Merck                   |
| Glycin                                                                             | Roth                    |
| Hämatoxylin (Harris)                                                               | Roth                    |
| Hämatoxylin                                                                        | Ventana medical systems |
| HEPES                                                                              | Sigma                   |
| Histofix                                                                           | Roth                    |
| Meerettichperoxidase                                                               | Ventana medical systems |
| Horse Serum                                                                        | Gibco                   |
| Hühnerembryonenextrakt                                                             | eigene Herstellung      |
| Hydrochloridsäure (HCl), Salzsäure                                                 | Merck                   |
| Insulin                                                                            | Sigma-Aldrich           |
| Isopropanol                                                                        | Merck                   |
| Kaliumchlorid (KCl)                                                                | Merck                   |
| L-Glutaminsäure                                                                    | Gibco                   |
| Labortierfutter                                                                    | Ssniff                  |
| Magnesiumsulfathexahydrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )           | Merck                   |
| Methanol                                                                           | J.T. Baker              |
| Molekulargewichtsstandard<br>(Precision Plus All Blue)                             | BioRad                  |
| Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)                                                       | Roth                    |

|                                                              |                           |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Natriumchlorid (NaCl)                                        | J.T. Baker                |
| Natriumfluorid (NaF)                                         | Merck                     |
| Nitrozellulosemembran                                        | Schleicher & Schüll       |
| Paraffin                                                     | Vogel                     |
| PathScan® (Multiplex Western Cocktail I, Katalognummer:5301) | Cell Signaling Technology |
| Penicillin / Streptomycin                                    | Gibco                     |
| Phloxin B neuro                                              | Sigma-Aldrich             |
| Phosphatgepufferte Salzlösung                                | Gibco                     |
| Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween® 20)        | Sigma-Aldrich             |
| Ponceaurot S                                                 | Sigma-Aldrich             |
| Proteinstandard Precision Plus All Blue                      | BioRad                    |
| sodium dodecylsulfate (SDS)                                  | Roth                      |
| SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate            | Thermo-Scientific         |
| (N',N,N',N'-)Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)               | Roth                      |
| Thrombin                                                     | Sigma-Aldrich             |
| Toluidin Blau                                                | Chroma                    |
| Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)                                 | Promega                   |
| Trishydroxymethylaminomethan-(Tris) Base                     | Sigma-Aldrich             |
| Trockenmilchpulver                                           | Roth                      |
| Trypanblau                                                   | Biochrom                  |
| Trypsin                                                      | Gibco                     |
| Xylol                                                        | Chemolute                 |

## 9.3 Geräte

| Gerät                                                                        | Bezugsquelle            |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Analysenwaage Genius                                                         | Sartorius               |
| Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT                               | Bio-Rad                 |
| Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter                                        | Sarstedt                |
| Chromatographiepapier                                                        | Whatman                 |
| Gewebeinfiltrationsautomat, Leica ASP 300s                                   | Leica                   |
| Einwegspritzen, Injekt 2 ml, 10 ml, 20 ml                                    | Braun Melsungen AG      |
| Eismaschine Scotsman AF-10                                                   | Scotsman Ice Systems    |
| Elektrophorese-Spannungsgerät PowerPac Basic                                 | Bio-Rad                 |
| Elektrophoresesystem (Mini Protean® electrophoresis cell)                    | Bio-Rad                 |
| Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße                                          | Eppendorf               |
| Färbeautomat Benchmark XT                                                    | Ventana medical systems |
| FBME-Messsystem                                                              | eigene Herstellung      |
| Gewebekulturplatten, 24-well                                                 | Nunc                    |
| Homogenisator Polytron®                                                      | Colora Messtechnik      |
| CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> Brutschrank (Zellkultur, MCO-18M, MCO-20AIC) | Sanyo                   |
| Kamera für video-optische Messung Typ A 602f-2                               | Basler                  |
| Kamera für Zeiss Mikroskope Zeiss-Axiocam MRc5                               | Zeiss                   |
| Kippschüttler Polymax 1040                                                   | Heidolph Instruments    |

## Anhang

|                                                                   |                                                         |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Kühlplatte für Histologie Leica EG1150C                           | Leica                                                   |
| Kühlschrank +4 bis +8 °C, Modell profiline                        | Liebherr                                                |
| Kühltruhe -20 °C, Modell Economy                                  | Liebherr                                                |
| Kühltruhe -80 °C                                                  | Kryotec                                                 |
| Kühlzentrifuge Modell J-6B                                        | Beckmann Instruments                                    |
| Lichtmikroskop für Immunhistochemie<br>Zeiss Axioskop 2           | Zeiss                                                   |
| Lichtmikroskop für Zellkultur Zeiss Axiovert 25                   | Zeiss                                                   |
| Mikrotom Leica SM 2000R                                           | Leica                                                   |
| Neubauer-Zählkammer                                               | Neubauer                                                |
| Objekträger (Superfrost, HistoBond®)                              | Hecht Assistent                                         |
| Paraffineinbettung Leica EG1120                                   | Leica                                                   |
| Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl                                   | Eppendorf/Peqlab                                        |
| Pipetten (serologisch),<br>1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml         | Sarstedt                                                |
| Pipettenspitzen                                                   | Sarstedt                                                |
| Polytron Stativ-Dispergiergerät                                   | Kinematica                                              |
| Rollenmischer                                                     | Stuart                                                  |
| Sicherheitswerkbank HeraSafe                                      | Heraeus                                                 |
| Sicherheitswerkbank LaminarAir HB2248                             | Heraeus                                                 |
| Silikonhalterungen                                                | Siltec GmbH & Co. KG, Weiler-Simmerberg,<br>Deutschland |
| Software für Video-optische Messung                               | Consulting Team Machine Vision                          |
| Sterilfilter (0,2 µm)                                             | Schleicher & Schuell                                    |
| Syngene Chemidoc-Bildgebungs-Apparatur                            | Synoptics Co.                                           |
| ThermalCycler 2720                                                | Applied Biosystems                                      |
| Thermomixer Comfort                                               | Eppendorf                                               |
| Tischzentrifuge 5415R                                             | Eppendorf                                               |
| Transmissionselektronenmikroskop (TEM)<br>Zeiss Leo 906 EM System | Zeiss                                                   |
| Tissuelyser                                                       | Qiagen                                                  |
| UV-Lampe                                                          | Vilber Lourmat                                          |
| x-y-z-System                                                      | IAI Corporation                                         |
| Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml                                  | Falcon/Sarstedt                                         |
| Zentrifuge Centrifuge 5415 C                                      | Eppendorf                                               |

## 9.4 TKIs und Antikörper

| Tyrosinkinase-Inhibitoren           | Hersteller       |
|-------------------------------------|------------------|
| Dasatinib, free Base                | LC Laboratories® |
| Erlotinib, Hydrochlorid Salz        | LC Laboratories® |
| Gefitinib, free Base                | LC Laboratories® |
| Imatinib, Methansulfonat Salz       | LC Laboratories® |
| Lapatinib, Di-p-Toluensulfonat Salz | LC Laboratories® |
| Lestaurtinib                        | LC Laboratories® |
| Sorafenib, p-Toluensulfonat Salz    | LC Laboratories® |
| Sunitinib, Malat Salz               | LC Laboratories® |
| Vandetanib, free Base               | LC Laboratories® |

| 1. Antikörper (AK)                     | Verdünnung | Firma                            | 2. AK                   | Verdünnung | Firma                   |
|----------------------------------------|------------|----------------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| Monoclonal Mouse Anti-Sarcomeric Actin | 1:200      | DakoCytomation (M0874)           | anit-mouse, anti rabbit | unverdünnt | Ventana medical systems |
| Purified Mouse Anti-Connexin-43        | 1:200      | BD Bioscience (610061)           | anit-mouse, anti rabbit | unverdünnt | Ventana medical systems |
| PathScan® Multiplex Cocktail I         | 1:200      | Cell Signaling Technology (5301) | anti-rabbit             | 1:10000    | Dianova                 |
| Anti-p38-Antinody                      | 1:1000     | Abcam (ab7952)                   | anti-rabbit             | 1:10000    | Sigma Aldrich           |
| Anti-p38-Antinody (diphosphorylated)   | 1:1000     | Sigma Aldrich (MFC00803556)      | anti-rabbit             | 1:10000    | Sigma Aldrich           |
| LC3 Antibody                           | 1:500      | Novus Biologicals (NB100-2331)   | anti-rabbit             | 1:10000    | Sigma Aldrich           |

## 9.5 Lebenslauf

**Name:** Jacob  
**Vorname:** Fabian, Johannes  
**Geburtsdatum:** 18.02.1986  
**Geburtsort:** Henstedt-Ulzburg, Deutschland

### Universitäten:

09/06: Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg  
12/06: Vorläufige Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes e.V.  
09/08: Erfolgreich bestandener Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/08: Endgültige Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes e.V.  
11/12: Erlangung der Approbation

### Praktisches Jahr:

08/11 – 12/11: Tertian Chirurgie im Regionalspital Surselva in der Schweiz  
12/11 – 03/12: Tertian Innere Medizin in der Asklepios Klinik Barmbek in Hamburg  
03/12 – 07/12: Tertian Anästhesiologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

### Famulaturen:

08/09 – 09/09 Unfallchirurgische Notaufnahme im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
02/11 – 03/11 Diagnostische Radiologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
03/11 – 04/11 Herzchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
05/11 – 06/11 Pharmakologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

### Dienst:

08/05 – 04/06: Zivildienst in der Asklepios Klinik Wandsbek in Hamburg

**Schulen:**

08/92 – 07/96: Eenstock-Grundschule in Hamburg  
08/96 – 06/05: Osterbek-Gymnasium in Hamburg  
08/03 – 06/05: Abitur am Osterbek-Gymnasium in Hamburg

Fabian Jacob

## **10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Fabian Jacob