

**Untersuchungen zum Einfluss des HMG-CoA-  
Reduktase-Inhibitors Lovastatin auf die Toxizität  
ionisierender Strahlung sowie des  
Anthrazyklinderivats Doxorubicin im Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Christian Henninger**

geb. am 08.02.1981 in Lübeck

Mainz, März 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Klinische Verwendung von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren .....	6
1.2 Senkung der Aktivität kleiner regulatorischer GTPasen durch Statine .....	9
1.3 Experimentelle und zulassungsüberschreitende Verwendung von Statinen .....	12
1.4 Einfluss von Statinen auf die Toxizität von ionisierender Strahlung .....	14
1.5 Einfluss von Statinen auf Doxorubicin-induzierte Zytotoxizität .....	17
1.6 Ziel dieser Arbeit .....	20
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 Geräte .....	22
2.2 Kits .....	23
2.3 Materialien, Chemikalien und Puffer .....	23
2.4 Antikörper.....	26
2.5 Nukleotide .....	27
2.6 Verwendete Software .....	32
2.7 Zellkultur .....	33
2.8 Zellexperimente.....	33
2.9 Tierversuche .....	33
2.10 Xenotransplantation .....	35
2.11 Proteinextrakte aus Zellen und Geweben .....	36
2.12 Western Blot.....	36
2.13 RNA Isolation aus Geweben .....	37
2.14 cDNA Synthese.....	37
2.15 Endpunkt- und Real-time-RT-PCR .....	37
2.15.1 Endpunkt-RT-PCR.....	37
2.15.2 Real-Time-RT-PCR .....	38
2.16 Real-time RT-PCR-Array.....	39
2.17 Blutanalysen.....	40
2.17.1 Großes Blutbild und Serumanalytik.....	40
2.17.2 Il6 und cTn-I Messungen im Blutserum.....	41
2.18 Anfertigung von Gewebeschnitten.....	41
2.19 Anfärbung von Gewebeschnitten.....	41

# Inhaltsverzeichnis

---

2.19.1 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung .....	41
2.19.2 Masson-Goldner Färbung .....	42
2.19.3 Immunhistochemische Untersuchung von Gewebeschnitten .....	42
2.20 Immunhistochemische Untersuchungen an Zellen .....	43
2.21 Zelltod Bestimmung.....	43
2.21.1 WST-1-Assay .....	43
2.21.2 TUNEL-Assay.....	43
2.22 Statistische Auswertung .....	44
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1 Untersuchung der Auswirkung einer Lovastatinvorbehandlung auf akute Strahlenantworten.....	45
3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Lovastatin auf akute Strahlenwirkungen .....	51
3.3 Untersuchung der Auswirkung einer Lovastatinbehandlung auf subakute Strahlenantworten.....	52
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Lovastatin auf subakute Strahlenwirkungen .....	58
3.5 Untersuchung der Auswirkung einer Lovastatinvorbehandlung auf akute Doxorubicintoxizität.....	58
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Lovastatin auf akute Doxorubicintoxizität.....	75
3.7 Untersuchung der Auswirkung einer Lovastatinbehandlung auf subakute Doxorubicintoxizität.....	76
3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Lovastatin auf subakute Doxorubicintoxizität.....	95
3.9 Untersuchung zum Einfluss von Lovastatin auf das antineo-plastische Potential von Doxorubicin im Xenotransplantations-experiment .....	96
3.10 Xenotransplantationsexperiment .....	98
3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Xenotransplantationsexperiment ....	101
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>102</b>
4.1 Protektive Wirkung von Lovastatin auf die Organtoxizität einer Ganzkörperbestrahlung mit ionisierender Strahlung.....	102
4.1.1 Einfluss von Lovastatin auf strahleninduzierte Leberschäden.....	103
4.1.2 Einfluss von Lovastatin auf strahleninduzierte Schädigung der Lunge.....	103
4.1.3 Einfluss von Lovastatin auf strahleninduzierte Schädigung des Darms.....	104
4.1.4 Einfluss von Lovastatin auf strahleninduzierte Hämatotoxizität .....	105

# Inhaltsverzeichnis

---

4.2	Modulation organspezifischer DNA-Schadensantwort durch Lovastatin nach Ganzkörperbestrahlung .....	107
4.3	Protective Wirkung von Lovastatin auf die Organtoxizität einer Behandlung mit Doxorubicin.....	109
4.3.1	Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierte Hepatotoxizität.....	110
4.3.2	Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität.....	112
4.4	Mögliche Einflüsse von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies .....	114
4.5	Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierten Zellzyklusarrest .....	116
4.6	Mögliche Einflüsse von Lovastatin auf Topoisomerase II-Isoformen.....	117
4.7	Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierte Zytotoxizität im Xenotransplantationsexperiment.....	120
4.8	Ausblick.....	120
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>126</b>
	Publikationen und Kongressbeiträge .....	147
	Liste der Publikationen.....	147
	Publizierte Abstracts .....	147
	Kongressteilnahmen .....	148
	Vorträge .....	148
	Posterpräsentationen .....	148

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
Abcb1b (Mdr-1)	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
Abcc1 (Mrp-1)	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle
Actb	actin, beta
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AP1	activator protein 1
ATCC	American Type Culture Collection
Baso	basophile Granulozyten
Bax	BCL2-interactive cell death susceptibility regulator
BCL2	B-cell lymphoma 2
Bp	Basenpaare
Brca2	breast cancer 2, early-onset
BSA	bovine serum albumin
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Chloralhydrat
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Citronensäure
ca.	ungefähr
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ccnb1	Cyclin B1
Cdc25a	cell division cycle 25 homolog A
Cdc42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
Cdkn1a (p21)	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNS
CDT	cytolethal distending toxin
CH	korpuskulärer Hämoglobingehalt
CHCM	mittlere Gesamthämoglobinkonzentration
CHEK1	checkpoint kinase 1
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col1a1	collagen, type 1, alpha 1
Col3a1	collagen, type 3, alpha 1
CRP	C-reaktives Protein
Ctgf	connective tissue growth factor
cTn-I	kardiales Troponin I
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
Ddb2	damage specific DNA binding protein 2

## Abkürzungsverzeichnis

---

DDR	DNA damage response, DNA-Schadensantwort
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKs	DNA dependent protein kinase catalytic subunit
Doxo	Doxorubicin (Adriamycin)
DSB	Doppelstrangbruch
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
Eos	eosinophile Granulozyten
ERK	mitogen-activated protein kinase (MAPK)
E-Selektin (Esel)	endothelial leukocyte adhesion molecule 1
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fas	TNF receptor superfamily, member 6
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluorescein)
Fos	proto-oncogene c-Fos / cellular oncogene fos
FPP	Farnesylpyrophosphat;
g	Gramm
GAP	GTPase activating protein
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GLDH	Glutamatdehydrogenase
Gpx1	Glutathionperoxidase 1
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
h	Stunde
H2ax	histone 2A family member X
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H9c2	rat cardiomyoblasts
Hmox1	Hämoxxygenase 1
HCT	Hämatokrit
HDL	high density lipoprotein
HDW	Hämoglobinverteilungsbreite
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGB	Hämoglobin

## Abkürzungsverzeichnis

---

HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HT-1080	human fibrosarcoma cell line
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
Hz	Herz
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
Il10	Interleukin 10
Il1a	Interleukin 1 alpha
IL6	Interleukin 6
Il8	Interleukin 8
IPP	Isopentenylidiphosphat
IR	ionizing radiation, ionisierende Strahlung
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
Jun	jun proto-oncogene
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> • 12 H <sub>2</sub> O	Kalium-Alaun
kDa	Kilodalton
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
Kg	Kilogramm
Kon	Kontrolle / Kontrollgruppe
Ku70	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 in
Ku80	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)
l	Liter
LDL	low density lipoprotein
IgG (H+L)	Immunglobulin G (heavy + light chain)
LMP	low melting point
Lova	Lovastatin
LSM	laser scanning microscope
LUC	große, ungefärbte Zellen („large unstained cells“)
Lymph	Lymphozyten
M	Mol
mA	Milliampère
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

mM	Millimol
Mono	Monozyten
MPV	mittleres Thrombozyten Volumen
MRN	Mre11, Rad50, Nbs1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaJO <sub>3</sub>	Natriumjodat
NER	nucleotide excision repair, Nukleotid-Exzisionsreparatur
Net1	neuroepithelial cell transforming 1
Neut	neutrophile Granulozyten
Nfe2l2 (Nrf2)	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
Nfkb1a (IκB-alpha)	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NF-κB/Nfkb1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NHEJ	non-homologous end joining, nicht-homologe Endverknüpfung
nl	Nanoliter
nM	Nanomol
Nppa	natriuretic peptide type A
Nppb	natriuretic peptide type B
p.o.	<i>per os</i>
pChk1	phosphorylierte Checkpointkinase 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pi	Orthophosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC-zeta	Proteinkinase C zeta
PLT	Thrombozyten
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rag2	recombination activating gene 2
Ras	rat sarcoma
RBC	Erythrozyten
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite
Rev1	rev1-like terminal deoxycytidyl transferase
Rho	ras homolog
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	reactive Sauerstoffspezies
RPA	replication protein A
RT	reverse Transkription

## Abkürzungsverzeichnis

---

SAPK/JNK	stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase
SCID	severe combined immunodeficiency
sd	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittels
STAT	signal transducers and activators of transcription
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBI	total body irradiation, Ganzkörperbestrahlung
TBST	Tris-buffered saline and Tween 20 buffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFb	transforming growth factor beta
TNFa (Tnf)	tumor necrosis factor-alpha
Topo2a (Top2a)	Topoisomerase II alpha
Topo2b (Top2b)	Topoisomerase II beta
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp53	Tumorsuppressorgen, 53 kDa
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
u.D.	unterhalb des Detektionslimits
UV	ultraviolette Strahlung
WBC	Leukozyten
Wee1	WEE1 homolog 1 (S. pombe)
WST-1	water soluble tetrazolium
Xpa	xeroderma pigmentosum, complementation group A
Xpc	xeroderma pigmentosum, complementation group C
Xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
z.B.	zum Beispiel
ZR	zelluläre Rezeptoren
$\gamma$ H2AX (pS139)	phosphorylated histone 2A family member X
$\Delta$ CT	relative cycle threshold, relativer Schwellwert-Zyklus
$\Delta\Delta$ CT	normalized relative cycle threshold, normalisierter relativer Schwellwert-Zyklus

# 1 Einleitung

Nebenwirkungen von Chemo- und Strahlentherapien mindern die Lebensqualität von Patienten und beeinflussen den Therapieerfolg. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) werden als Cholesterinsenker präventiv gegen die Entstehung arteriosklerotischer Plaques eingesetzt und gelten als kardioprotektiv. Sie wirken sich nicht nur auf den Cholesterinhaushalt, sondern auch auf die Funktion kleiner GTPasen aus. Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen („Ras-homologous small GTPases“) regulieren eine Vielzahl von Signalkaskaden, die in Zusammenhang mit Inflammation, Apoptose sowie Zellwachstum, -form, -motilität, und -adhäsion stehen. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass das Statinderivat Lovastatin (Lova) im Mausmodell unerwünschte Wirkungen von ionisierender Strahlung (IR) und Doxorubicin (Doxo) auf das Normalgewebe mindern kann, indem es antiinflammatorisch und antifibrotisch wirkt. Zudem verringert die Statinbehandlung Doxorubicin-induzierte DNA-Schäden im Normalgewebe. Im Gegensatz hierzu werden transformierte Zellen nicht geschützt.

## 1.1 Klinische Verwendung von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

Statine wurden 1987 zur Cholesterinsenkung klinisch zugelassen (Lardizabal und Deedwania, 2010) und gehören inzwischen zu den am zweithäufigsten verschriebenen und am meisten verkauften Medikamenten in den USA (Kleinrock, 2011). Das erste klinisch zugelassene Statin war Lovastatin. Es wurde in den 70er Jahren aus dem Schimmelpilz *Aspergillus terreus* isoliert (Endo et al., 1976) und Anfang der 80er Jahre als Cholesterinsenker in klinischen Versuchen erfolgreich getestet (Yamamoto et al., 1980). Lovastatin wird in Tablettenform oral verabreicht. Als sogenanntes „Prodrug“ wird es in der Leber metabolisch aktiviert. Die Bioverfügbarkeit von oral appliziertem Lovastatin ist mit ~5 % der verabreichten Dosis relativ gering (Schachter, 2005). Neuere Statine, wie Atorvastatin, Simvastatin, Fluvastatin, Rosuvastatin und Pravastatin unterscheiden sich in Bioverfügbarkeit und Lipophilie von Lovastatin. Von den genannten gelten Rosuvastatin und Pravastatin als hydrophil und man geht davon aus, dass diese im Gegensatz zu den anderen Statinen nur in geringem Maße die Leber verlassen (Zhou und Liao, 2010).

Statine hemmen kompetitiv die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonsäure (Kreisberg, 1991). Mevalonsäure ist eine Vorstufe von Cholesterin, welches unter

## Einleitung

---

anderem ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen ist und zur Bildung von Steroidhormonen benötigt wird (Grundy, 1978). Die Cholesterinsynthese findet vorwiegend in der Leber und im Darm statt (Dietschy und Weis, 1971). Erhöhte Cholesterinblutwerte sind mit einer Steigerung des Arterioskleroserisikos assoziiert. Es wird angenommen, dass Cholesterin in den Blutgefäßwänden in Verbindung mit Makrophagen die Bildung sogenannter Plaques verursacht, was eine Verengung des Gefäßes nach sich zieht. Im ungünstigsten Fall brechen diese Plaques durch die innere Gefäßwand. Thrombozyten versiegeln diese Bruchstellen und verstopfen das Gefäß somit endgültig (Vaughan et al., 1996). Statine werden auf Grund ihrer Cholesterin-senkenden Eigenschaft zur Arterioskleroseprävention eingesetzt (Vaughan et al., 2000). Damit das stark lipophile Cholesterin im Blut transportiert werden kann, wird es an Lipoproteine gebunden. Verringert man die intrinsische Cholesterinbiosynthese, erhöhen Zellen ihre Menge an Rezeptoren für das „low density lipoprotein“ (LDL), um dem intrinsischen Cholesterinmangel entgegenzuwirken. Dadurch wird die Migration von LDL-Cholesterin aus dem Serum in die Zellen begünstigt. Dies hat zur Folge, dass sich das LDL/HDL („high density lipoprotein“)-Cholesterinverhältnis in den Blutgefäßen ändert (Zhou und Liao, 2010). Die HDL nehmen Cholesterin aus Geweben in das Blut auf und führen dieses in die Leber zurück. In der Leber wird das Cholesterin metabolisiert und anschließend biliär ausgeschieden. Das Cholesterin aus dem Serum wird also in die Zellen und die Leber abtransportiert, was der Plaquebildung entgegenwirkt.

Schon wenige Jahre nach erfolgreicher klinischer Anwendung gab es erste Zweifel, ob die Eigenschaft der Statine als Cholesterinsenker allein für die günstigen Effekte auf die Gefäßwände verantwortlich ist. Die Therapie verhinderte nicht nur die Entstehung von Plaques, sondern führte auch zu einer Rückbildung von bereits bestehenden Gefäßplaques, verhinderte ihr Aufbrechen und reduzierte Gefäßverstopfungen durch Thrombozyten (Bellosta et al., 2000; Palinski, 2001). Hinzu kommt, dass die ebenfalls zur Cholesterinsenkung eingesetzten Fibrate, deren Wirkung nicht auf der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase beruht, keine der günstigen Effekte der Statine auf Thrombosen zeigen (Squizzato et al., 2010). Befunde wie diese verdeutlichten, dass es weitere klinisch relevante Eigenschaften von Statinen gibt, die über die Cholesterinsenkung hinausgehen (Palinski, 2001).

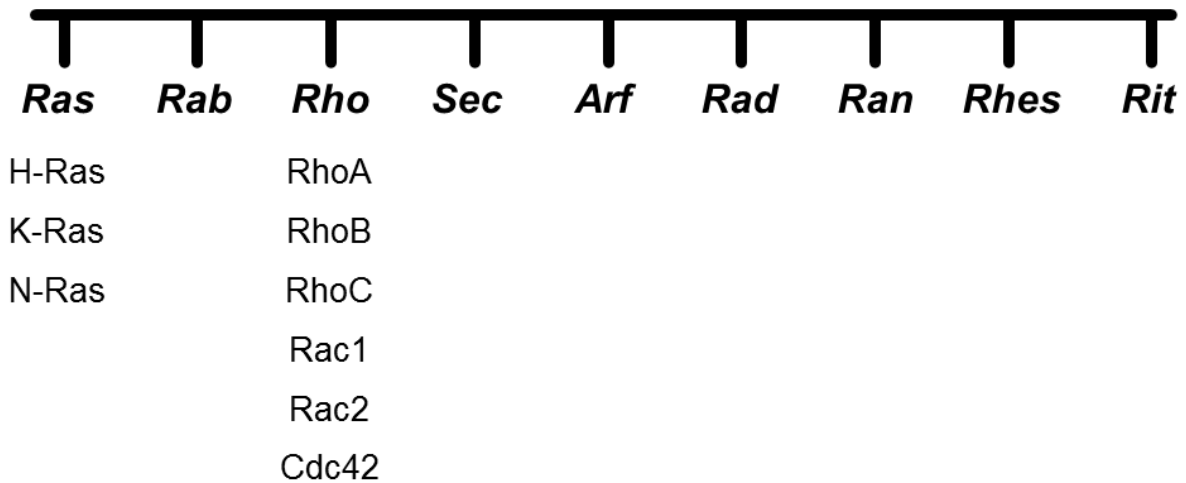
Statine sind inzwischen intensiv in ihrer cholesterinsenkungsunabhängigen Wirkung auf das Herzkreislaufsystem untersucht worden, vor allem im Zusammenhang mit inflammatorischen Ereignissen (Quist-Paulsen, 2010). Sie wirken mildernd auf krankhafte Herzremodellierungen, sowie auf die Entstehung von Lungen-, Leber- und Nierenfibrosen (Fitzgerald et al., 2009; Zhao et al., 2008). Des Weiteren werden günstige Effekte bei Thrombosen, neuronaler Degeneration, Parkinson, multipler Sklerose und Typ II Diabetes beschrieben (Di Paolo und Kim, 2011; Kawai et al., 2011; Kurata et al., 2011; Obi et al., 2009; Roy und Pahan, 2011; Willey und Elkind, 2010). Auf Grund der Diversität von biologischen Antworten auf eine Statinbehandlung spricht man bei den beobachteten Wirkungen von Statinen von pleiotropen Effekten (Futterman und Lemberg, 2004; Waldman und Kritharides, 2003). Die meisten davon werden als von der Cholesterinsenkung unabhängig angesehen und auf die Inhibition der Funktion kleiner Rho-GTPasen zurückgeführt (Zhou und Liao, 2010). So wurden z.B. die von der Cholesterinsenkung unabhängigen günstigen Effekte der Statinbehandlung auf Endothelien hauptsächlich auf die Inhibition der kleinen regulatorischen GTPase RhoA zurückgeführt. Sie wirkt sich auf die Migration von Endothelzellen aus und steigert die Aktivität der eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, „endothelial nitric oxid synthase“) (Laufs et al., 1998; Ludman et al., 2009; Noma et al., 2006; Zhou und Liao, 2010). Die eNOS produziert Stickstoffmonoxid, welches sich auf die Aggregation von Thrombozyten, die Kontraktion von Endothelzellen und die Spannung des Blutgefäßes auswirkt. Rac1 ist eine weitere Rho-GTPase, deren Inhibition sich günstig auf atherosklerotische Plaques auswirkt (Rashid et al., 2009). Ihre Inhibition spielt vor allem bei der Reduzierung inflammatorischer Prozesse eine Rolle, die durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies initiiert werden. In Endothelzellen reguliert aktives Rac1 Zellmigration, –adhäsion und Vaskularisierung (Tan et al., 2008). Die Inhibition von Rac1 durch Statine verhindert darüber hinaus die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) von Tubulusepithelzellen in der Niere und TGF beta („transforming growth factor beta“) -induzierte Kollagenbildung in Mesangialzellen, was Fibrosen nach Schädigung der Niere verhindern kann (Hubchak et al., 2009; Patel et al., 2006; Patel et al., 2005).

### **1.2 Senkung der Aktivität kleiner regulatorischer GTPasen durch Statine**

Eine Behandlung von Zellen mit Statinen führt *in vitro* zu einem runden Zellphänotyp, was eine Folge der Inhibition kleiner Rho-GTPasen ist (Koch et al., 1997). Die Inhibierung der HMG-CoA-Reduktase führt nicht nur zu einer Hemmung der intrinsischen Synthese von Cholesterin, sondern über den gleichen Weg auch zur Hemmung der Bildung von Isoprenvorstufenmolekülen (Raiteri et al., 1995). Diese werden für die posttranslationale Modifikationen (Farnesylierung (C15) und Geranylgeranylierung (C20)) am C-Terminus kleiner Rho-GTPasen benötigt (Adamson et al., 1992). Je nach Konsensussequenz (CAAX-COOH, C = Cystein, A = Alanin, X = beliebige Aminosäure) können Rho-GTPasen ausschließlich farnesyliert oder geranylgeranyliert werden oder sind für beide Modifikationen separat empfänglich. Diese Prenylierung hat zur Folge, dass das C-terminale Ende der GTPase hydrophober wird, was eine Verankerung an der inneren Zellmembran ermöglicht (Adamson et al., 1992; Maltese, 1990).

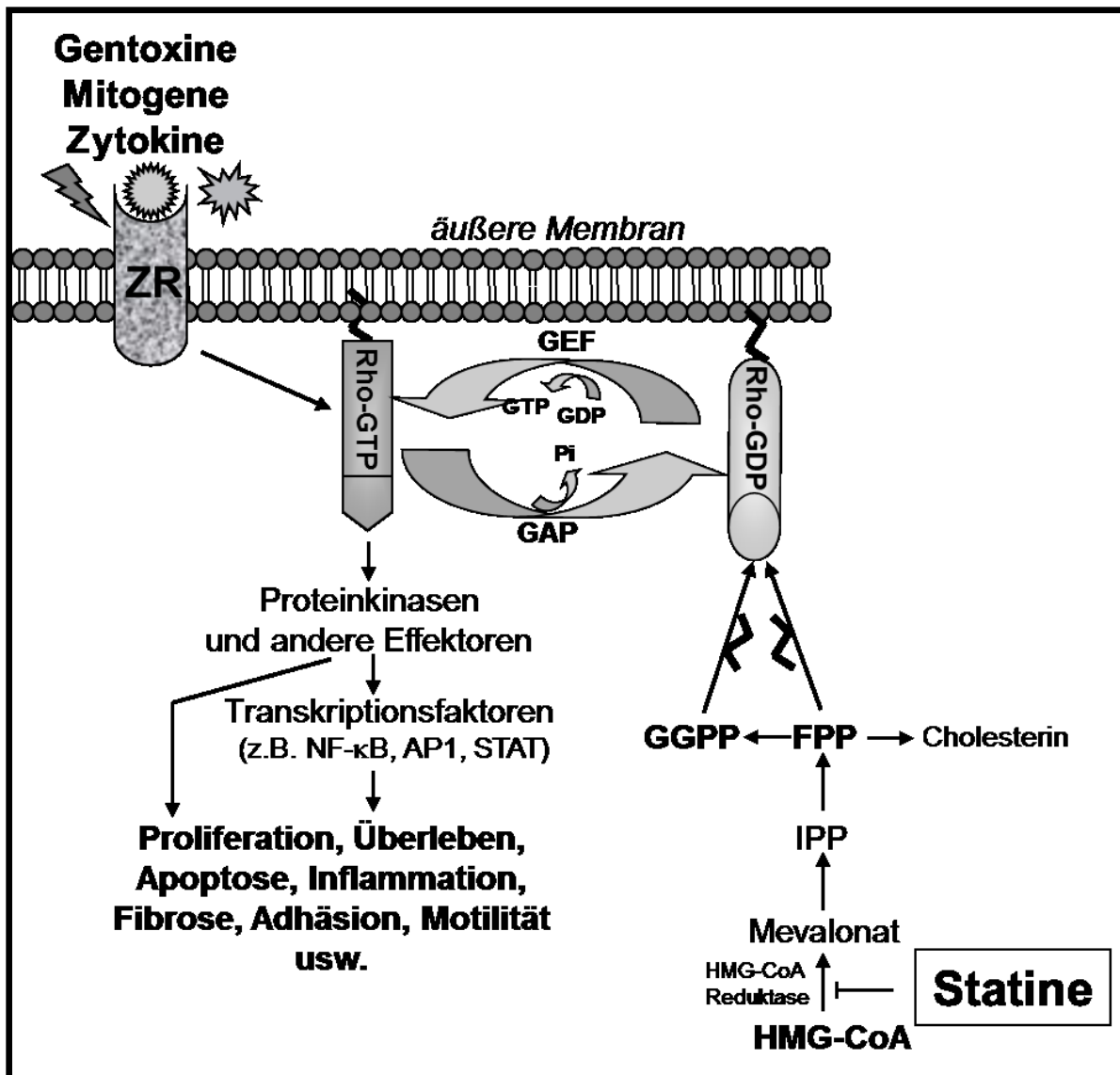
Die Familie der Rho-GTPasen gehört zur Ras-Superfamilie (Ras = „rat sarcoma“) kleiner GTPasen (Abbildung 1). In Säugetieren gibt es über 60 Mitglieder dieser Superfamilie. Diese kleinen GTP-bindenden, monomeren Proteine mit einer Masse von 20-40 kDa sind von essentieller Bedeutung für regulatorische Prozesse in allen Zellen des Körpers (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Sie sind Schaltermoleküle, die äußere Stimuli von der Zellmembran an verschiedenste Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Zytoskelettmodulatoren leiten und spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung während der Embryogenese (Etienne-Manneville und Hall, 2002).

## Die Superfamilie der Ras-GTPasen



**Abbildung 1: Die Superfamilie der Ras-GTPasen.** Abgebildet sind die verschiedenen GTPasen-Familien der Ras-Superfamilie. In der Ras- und Rho-Familie sind diejenigen Mitglieder aufgelistet, die zellbiologisch besonders gut charakterisiert sind.

Als Schaltermolekül besitzen GTPasen zwei verschiedene Zustände: einen inaktiven GDP-gebundenen Zustand und einen aktiven GTP-gebundenen, der es ihnen erlaubt mit Effektorproteinen zu interagieren. Reguliert wird die GTP-Bindung durch GEFs (GTP-Austauschfaktoren, „guanine nucleotide exchange factors“) und GAPs (GTPase aktivierende Proteine, „GTPase-activating proteins“) (Bokoch und Der, 1993). Ohne die posttranslationale Isoprenylierung der GTPasen findet keine Verankerung an der inneren Zellmembran statt. Fehlt diese Membranlokalisation bleibt die Aktivierung durch GEFs aus und somit auch die Signaltransduktion von extrazellulären Reizen (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005; Konstantinopoulos et al., 2007) (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schema der Isoprenylierung und Aktivierung von Rho-GTPasen in Verbindung mit kompetitiver Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Statine.** Statine inhibieren die HMG-CoA-Reduktase, wodurch sich der intrazelluläre Vorrat an Isoprenvorstufenmolekülen reduziert. Diese Vorstufen werden für die C-terminale Prenylierung von kleinen regulatorischen GTPasen benötigt. Dadurch beeinflussen Statine indirekt verschiedene über Rho-GTPasen regulierte Signalwege. ZR, zelluläre Rezeptoren; GEF, „guanine nucleotide exchange factor“; GAP, „GTPase activating protein“; GGPP, Geranylgeranylpyrophosphat; FPP, Farnesylpyrophosphat; IPP, Isopentenylidiphosphat; Rho, Ras-homologe GTPase; NF-κB, „nuclear factor kappa B“; AP1, „activator protein 1“; STAT, „signal transducers and activators of transcription“; GTP, Guanosintriphosphat; GDP, Guanosindiphosphat; Pi, Orthophosphat; modifiziertes Schema, adaptiert von Fritz et al., 2011

Die prominentesten Vertreter unter den kleinen GTPasen sind Isoformen des Proto-Onkogens Ras (H-, K- und N-Ras). Punktmutationen in den Genen, die für diese GTPasen kodieren werden in 20-30 % aller menschlichen Tumoren gefunden (Fernandez-Medarde und Santos, 2011; Shimizu et al., 2007). Onkogenes Ras ist konstitutiv aktiv und gibt der Zelle damit einen permanenten Wachstumsimpuls (Bos,

1989). Ebenfalls gut charakterisiert sind die Ras-homologen kleinen GTPasen (Rho-GTPasen) RhoA, B, C, Rac1, 2 und Cdc42. Konstitutiv aktive Mutanten von Rho- und Rac-Isoformen induzieren die Ausprägung von Stressfasern und Lamellopodien und Cdc42-Mutanten die Ausprägung von sogenannten Filopodien in Fibroblasten (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Auf Grund der spezifischen Phänotypen, die bei Inhibition, Expression dominant negativer Mutanten, „Knockdown“ oder konstitutiver Aktivierung von Mitgliedern der Rho-GTPasen Familie auftreten, wurden sie ursprünglich als Modulatoren des Aktinzytoskeletts, Zellwachstums, der Zellpolarität und -motilität charakterisiert (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Machesky und Hall, 1996). Später wurde entdeckt, dass das Regulationsspektrum der Rho-GTPasen noch weitaus größer ist. Ihre Signaltransduktion hat Einfluss auf zelluläre Stressantworten, Proliferation und Apoptose (Ellenbroek und Collard, 2007; Hall, 2009). Ursächlich hierfür sind Enzyme wie die NADPH-Oxidase, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und Transkriptionsfaktoren, die in Abhängigkeit von Rho-GTPasen reguliert werden (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005). So wird unter anderem die Aktivität der SAPK/JNK, ERK und p38 (Bar-Sagi und Hall, 2000; Turchi et al., 2003), sowie von NF- $\kappa$ B und AP1 reguliert (Gnad et al., 2001; Montaner et al., 1998). Durch die Modulation des Zytoskeletts wirken sich kleine GTPasen außerdem auf Zelladhäsion und –motilität aus. Durch ihre Inhibition ändert sich unter anderem die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und E-Selektin sowie die Expression von Matrixmetalloproteinasen (Fritz et al., 2011; Parri und Chiarugi, 2010). Darüber hinaus vermindert die Inhibition von Rho-Proteinen inflammatorische Prozesse indem die Expression von Cyclooxygenasen und Interleukinen reduziert wird (Fritz, 2009; Ludman et al., 2009; Zhou und Liao, 2010).

### **1.3 Experimentelle und zulassungsüberschreitende Verwendung von Statinen**

Die Verringerung der Aktivität von mutiertem Ras in transformierten Zellen durch Statine wurde schon Anfang der 90er Jahre als Möglichkeit einer gezielten Chemotherapie bei Ras-mutierten Tumoren diskutiert (Khosravi-Far et al., 1992). In jüngerer Zeit wurde die Idee der pharmakologischen Inhibition von Rho-GTPasen in der Krebstherapie wieder aufgegriffen (Berndt et al., 2011; Fritz, 2005, 2009; Fritz

und Kaina, 2006; Walker und Olson, 2005). Als vielversprechende Strategie gilt dabei die Kombination von Statinen mit gängigen Zytostatika.

Versuche mit transformierten Zellen sowie Xenotransplantationsversuche an Ratten und Mäusen zeigten, dass verschiedene Statinderivate (z.B. Lovastatin, Cerivastatin, Simvastatin und Atorvastatin) *per se* Apoptose in diversen transformierten Zelllinien auslösen, als auch die Chemo- und Strahlungsresistenzen dieser Zellen aufheben können (Agarwal et al., 1999a; Agarwal et al., 1999b; Arnold et al., 2010; Bardou et al., 2010; Bjorkhem-Bergman et al., 2010; Cafforio et al., 2005; Dimitroulakos et al., 2001; Favero et al., 2010; Fritz, 2005; Fritz und Kaina, 2006; Gao et al., 2010; Graaf et al., 2004; Hwang et al., 2010; Kamigaki et al., 2011; Kochuparambil et al., 2011; Papadopoulos et al., 2011; Podhorecka et al., 2010; Qi et al., 2010; Relja et al., 2010; Sanli et al., 2011; Taylor-Harding et al., 2010; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2010). Die hierbei vermuteten Mechanismen sind Statin-induzierter G1-Arrest (Keyomarsi et al., 1991; Olson et al., 1995) sowie Verstärkung von Apoptosesignalwegen, beispielsweise durch Runterregulation von BCL2 (Agarwal et al., 1999a; Dimitroulakos et al., 2000). Die meisten der zytotoxischen Effekte auf Krebszellen wurden allerdings mit relativ hohen Statindosen erreicht, die weit jenseits dessen liegen, was als Standardtherapie zur Minderung des Cholesterinspiegels verabreicht wird. Solch hohe Dosen sind *in vivo* generell nur schwer zu erreichen und bergen zudem die Gefahr starke unerwünschte Nebenwirkungen wie Myopathien oder sogar Rhabdomyolyse auszulösen (Ardati et al., 2005; Arora et al., 2006; Hamilton-Craig, 2001; Vaklavas et al., 2009). Bei einer Hypercholesterinämiebehandlung mit klinisch relevanten, niedrigen Statindosen kommt es in der Regel allerdings nur selten zu diesen unerwünschten Nebenwirkungen (Thompson et al., 2003). Auf Grund der erforderlichen relativ hohen Dosierung und dem unterschiedlichen Ansprechen verschiedener Krebszelllinien *in vitro* und vor allem *in vivo*, gelten Statine als ungeeignetes Mittel für eine Monochemotherapie, was durch zahlreiche Studien belegt wurde. Die monotherapeutische Unwirksamkeit gegenüber verschiedenen Krebsentitäten bestätigte sich beispielsweise in einer Phase I-Studie, in der Patienten täglich mit  $5-45 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  Lovastatin behandelt wurden (Thibault et al., 1996). Klinische Studien, in denen Statine die antineoplastische Wirkung von Standardchemotherapeutika unterstützen sollten, lieferten widersprüchliche Ergebnisse (Katz, 2005). Davon ausgehend, dass die chemosensitivierenden Effekte von Statinen auf der Hemmung

kleiner GTPasen beruhen, wird eine gezielte Inhibition von z.B. RhoA, RhoB, Rac1 oder Cdc42 als vielversprechender Angriffspunkt für neue Krebstherapeutika gesehen (Fritz und Kaina, 2006). Die inzwischen kommerziell erhältlichen spezifischen Inhibitoren für verschiedene Rho-GTPasen fanden bisher jedoch nur *in vitro* und in präklinischen Modellen Verwendung.

Den protektiven Eigenschaften von Statinen auf wildtypische Zellen oder Normalgewebe während einer antineoplastischen Behandlungen wurde bisher vergleichsweise wenig Beachtung geschenkt (Damrot et al., 2006; Feleszko et al., 2000; Haydont et al., 2007a; Huelsenbeck et al., 2011; Nubel et al., 2006). In klinisch relevanten geringen Dosen können Statine unabhängig von ihrem Einfluss auf die Cholesterinbiosynthese (Tobert et al., 1982) oder ihrem antioxidativen Potential (Davignon et al., 2004; Drinitsina und Zateishchikov, 2005; Hayashi et al., 2005; Kowalski et al., 2004; Kowalski et al., 2005; Stoll et al., 2004) primäre Zellen vor verschiedenen Noxen schützen. So schützt z.B. Lovastatin primäre humane Endothelzellen vor durch Doxorubicin oder ionisierende Strahlung induziertem Zelltod (Damrot et al., 2006; Nubel et al., 2006). *In vivo* ist für Pravastatin beschrieben, dass es fibrotische Prozesse des Rattencolons mildern kann, die durch ionisierende Strahlung induziert wurden (Bourgier et al., 2005; Haydont et al., 2007a; Haydont et al., 2007b; Haydont et al., 2005). Die Minderung von Apoptose, Inflammation und Fibrose konnte in diesen Studien auf eine Inhibition des Rho/ROCK Signalweges zurückgeführt werden.

### **1.4 Einfluss von Statinen auf die Toxizität von ionisierender Strahlung**

Ionisierende Strahlung verursacht DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche (DSB), die sowohl aus direkter Schädigung der DNA resultieren, als auch aus indirekter Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies, welche hauptsächlich durch die Ionisierung von Wasser generiert werden (Ross, 1999). Diese Eigenschaften werden therapeutisch genutzt, um Krebszellen zu schädigen. Auf Grund ihres schnellen Wachstums und ihrer in der Regel geringeren Reparaturkapazität reagieren transformierte Zellen empfindlicher auf eine Bestrahlung, als Normalgewebszellen (Hulbert, 1954). Ein nicht reparierter Schaden an der DNA führt zum Zellzyklusarrest bis hin zur Zellseneszenz und/oder zur Initiation von Apoptose (Velculescu und El-

## Einleitung

---

Deiry, 1996). Es genügt beispielsweise ein einziger nicht reparierter DSB in einer essentiellen, kodierenden DNA-Region aus, um den programmierten Zelltod zu initiieren (Rich et al., 2000).

Zellen besitzen zwei Reparaturwege, um sich vor der Toxizität von DNA-Doppelstrangbrüchen zu schützen: das nichthomologe Endverknüpfen („non-homologous end joining“, NHEJ) und die homologe Rekombination („homologous recombination“, HR) (Jeggo, 1998). Während das NHEJ sowohl somatischen Zellen, als auch Stammzellen zur Verfügung steht, ist die HR auf die S- und G2-Phase von Stammzellen, bzw. proliferierenden Zellen beschränkt, da dieser Reparaturweg ein angrenzendes Schwesterchromatid benötigt (Johnson und Jasin, 2000; Takata et al., 1998). Beim NHEJ wird die DNA-Bruchstelle durch Ku70 und Ku80 stabilisiert und anschließend durch DNA-PKs, XRCC4 und Ligase IV ligiert, ohne, dass Sequenzhomologien berücksichtigt werden (Lieber, 2008; Pastwa und Malinowski, 2007). Da dieser Prozess fehleranfällig ist, kann er bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen Mutationen in der DNA verursachen. Die HR läuft prinzipiell fehlerfrei ab. Hierbei dient das unbeschädigte Schwesterchromatid als Matrize für das geschädigte. Der MRN-Komplex bindet an beide Seiten des Doppelstrangbruchs und stabilisiert ihn. Die zum Bruch führenden 5'-Enden der DNA werden durch Endonukleasen beschnitten, wodurch kurze 3'-Überhänge entstehen. Nachdem das Protein RPA an diese Überhänge gebunden hat, interagiert es mit RAD51, welches die Suche nach passenden DNA-Sequenzen auf dem Schwesterchromatid initiiert. Der passende, unbeschädigte DNA-Strang vom Schwesterchromatid invasiert schließlich in den defekten Strang und dient als Matrize für die Reparatur. Eine DNA-Polymerase verlängert die Enden des invasierten Strangs am 3'-Ende, wodurch die sogenannte „Holliday junction“-Struktur entsteht. Diese Überkreuzstruktur wird benötigt, damit der Schwesterstrang korrekt abgeschrieben werden kann. Am Ende werden die Lücken in den Strängen durch weitere DNA-Synthesen geschlossen. (Li und Heyer, 2008)

Radioprotektion von Normalgewebe ist von klinischer Relevanz, da bei einer Strahlentherapie, so gezielt sie auch angewendet wird, gesundes Gewebe häufig Kollateralschäden erleidet. Bei Leukämien oder Lymphomen kann gar eine Ganzkörperbestrahlung von Nöten sein. Die Nebenwirkungen reichen von

unangenehmen Folgen für den Patienten (z.B. Diarrhoe, Erbrechen oder Haarausfall) bis hin zu lebensbedrohlichen Langzeitschäden (chronische Inflammation und Fibrose). Beispiele hierfür sind fibrotische Ereignisse, die zur Beeinträchtigung oder dem Verlust der Darm-, Herz- oder Lungenfunktion führen können (Adams et al., 2003; Berkey, 2010). Radioprotektive Medikamente können dazu beitragen, dass Patienten die Therapie besser vertragen. Gleichzeitig dürfen dabei die entarteten Zellen nicht geschützt werden. Das bisher einzige klinisch zugelassene Medikament, das diese Kriterien erfüllt ist Amifostin. Seine Wirkung beruht hauptsächlich auf seiner Eigenschaft als Radikalfänger, der im Normalgewebe sehr gut, aber nur schlecht im hypoxischen Milieu von Tumoren wirkt (Kouvaris et al., 2007). Anstatt das Normalgewebe zu schützen wird hauptsächlich versucht, Tumore mit radiosensitivierenden Substanzen, wie z.B. Nitroimidazolderivaten, zu behandeln, um den Patienten geringeren Strahlendosen aussetzen zu müssen (Coleman, 1996). Die Strategie dabei ist, das hypoxische Milieu des Tumors sauerstoffreicher zu machen bzw. mit elektronenaffinen Substanzen anzureichern, um die Radikalbildung durch ionisierende Strahlung zu erhöhen.

Neue Medikamente mit radioprotektiven Eigenschaften auf gesundes Gewebe zu entwickeln und zu testen ist teuer und aufwendig. Eine bessere Option wäre, ein bereits gut etabliertes Medikament nutzen zu können, das über seine bisher bekannte Funktion hinaus zusätzlich radioprotektiv auf Normalgewebe wirkt.

Unabhängig vom DNA-Schaden können die durch ionisierende Strahlung ubiquitär in der und um die Zelle entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) direkt und indirekt zur Aktivierung von rezeptorvermittelter Apoptose führen. Im Fall der direkten rezeptorgesteuerten Initiation von Zelltod, aktiviert ionisierende Strahlung Membranrezeptoren wie z.B. den EGF-Rezeptor, ohne Anwesenheit eines Liganden (Dent et al., 2003). Bei lokalen Häufungen von Zelltod werden von den geschädigten Zellen und/oder von Makrophagen des Immunsystems proapoptotische, proinflammatorische und profibrotische Zytokine sezerniert (Fas-Ligand, IL6, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , usw.). Im umgebenden gesunden Gewebe können durch die Aktivierung von Membranrezeptoren, wie z.B. dem Fas-Rezeptor, proapoptotische Signale überwiegen, obwohl der intrinsische Strahlenschaden womöglich hätte repariert werden können. Unter den Rezeptoren, die durch ionisierende Strahlung aktiviert werden, befinden sich auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus deren

Stimulierung die Aktivierung kleiner Rho-GTPasen folgt. Dies führt nachgeschaltet zu einer erhöhten Aktivität der Rho-Kinase, welche für eine Vielzahl biologischer Effekte verantwortlich ist (Haydont et al., 2007b). So kann die Behandlung mit Statinen z.B. die Expression proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine verringern (Fritz et al., 2011; Haydont et al., 2007a; Haydont et al., 2005; Quist-Paulsen, 2010).

Unabhängig von der rezeptorvermittelten Aktivierung ist z.B. für die kleine GTPase RhoA beschrieben, dass sie nach DNA-Schädigung im Zellkern akkumuliert und dort durch einen GEF aktiviert werden kann, was eine Funktion dieser Rho-GTPase in der DNA-Schadensantwort impliziert (Dubash et al., 2011). Die Identifizierung einer nukleären Lokalisation von Rac1 (Sandrock et al., 2010) legt die Vermutung nahe, dass auch diese GTPase für genomische Stabilität bedeutsam sein könnte.

### **1.5 Einfluss von Statinen auf Doxorubicin-induzierte Zytotoxizität**

Doxorubicin findet bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen Verwendung, wie z.B. bei Weichteilsarkomen, Mammakarzinomen, Leukämien und soliden Tumoren (Blum und Carter, 1974; Wang et al., 1971). Es ist ein Derivat von Daunorubicin, welches im Zuge einer Suche nach neuen Antibiotika in den 50er Jahren aus dem Bakterium *Streptomyces peucetius* isoliert wurde (Dimarco et al., 1964; Dubost et al., 1963). Bereits Anfang der 60er Jahre wurde in Tierversuchen das antineoplastische Potential der Substanz erkannt. Das noch wirksamere Doxorubicin wurde aus einer Mutante des *Streptomyces peucetius* Stammes gewonnen (Arcamone et al., 2000). Wie das Daunorubicin gehört es zur Gruppe der Anthrazykline, die sich dadurch auszeichnen, dass sie in die DNA interkalieren und Topoisomerase II Isoformen hemmen. Die Interkalation verursacht vornehmlich eine Hemmung der Transkription, während die Topoisomerase II-Inhibition zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen führt (Gewirtz, 1999).

Doxorubicin wird mittels Bolus oder Infusion verabreicht. In klinisch relevanten Dosen löst es einen G2-Arrest bei proliferierenden Zellen aus und bei höheren Dosen zusätzlich einen G1-Arrest (Barlogie et al., 1976; Krishan und Frei, 1976). Der dominante DNA-schädigende Mechanismus von Doxorubicin, bei Dosen von 0,5  $\mu\text{M}$  bis 5,0  $\mu\text{M}$ , ist die irreversible Inhibition von Topoisomerase II alpha und beta, was in Konsequenz zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt (Gewirtz, 1999; Kaufmann und Hancock, 1995). Topoisomerase II alpha und beta führen reversibel Doppelstrangbrüche in die DNA ein, um eine Entwindung und Entwirrung von

## Einleitung

---

Chromosomen und somit eine topologische Reorganisation zuzulassen (Rose, 1988). Als Topoisomerase II-Gift bindet Doxorubicin irreversibel an Topoisomerase II und verhindert die Religation der gebrochenen DNA-Enden. Der sogenannte spaltbare Komplex („cleavable-complex“) aus Doxorubicin und Topoisomerase II bleibt kovalent an die DNA gebunden, bis er proteasomal degradiert wird. Übrig bleiben DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüche, die toxisch für die Zelle sind, sofern sie nicht erfolgreich repariert werden (Lyu et al., 2007). Im Gegensatz zur Topoisomerase II beta, die in sämtlichen Zellzyklusphasen exprimiert wird, wird die Topoisomerase II alpha hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert (Capranico et al., 1992; Goswami et al., 1996). Somit werden proliferierende Zellen stärker durch Doxorubicin geschädigt, als nicht-proliferierende Zellen.

Die Schadensgenese durch Doxorubicin ist grundsätzlich unterschiedlich zu den Mechanismen mit denen ionisierende Strahlung die DNA schädigt. Beide Behandlungen haben aber gemeinsam, dass sie als für die Zelle kritischstes Ereignis DNA-Doppelstrangbrüche verursachen (Agarwal et al., 2006). Zusätzlich zur Topoisomerase II Inhibition sind für Doxorubicin DNA-Adduktbildung, DNA-Querverbindungen, DNA-Interkalation, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowie Interaktion mit Helikasen beschrieben. DNA-Adduktbildung oder Querverbindungen treten *in vitro* erst bei relativ hohen Doxorubicinkonzentrationen auf (50  $\mu\text{M}$  bis 1 mM). Ihre Relevanz für die antineoplastische Wirksamkeit von Doxorubicin ist daher umstritten und wird in der Regel vernachlässigt. Die Interaktion mit Helikasen findet im klinisch relevanten Dosisbereich statt, ihre biologische Relevanz ist jedoch wenig erforscht. DNA-Interkalation und nennenswerte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies tritt ebenfalls erst bei hohen, klinisch vermutlich nicht relevanten Dosen auf, die während einer Krebstherapie im Blutserum kaum erreicht werden. Die geringste Konzentration, bei der *in vitro* messbare reaktive Sauerstoffspezies auftraten betrug 4  $\mu\text{M}$  (Gewirtz, 1999). Beim Großteil der Befunde zur *in vitro* Produktion von ROS durch Doxorubicin wurden Zellen allerdings mit weitaus höheren Dosen von 10-500  $\mu\text{M}$  behandelt. Dabei wurde regelmäßig außer Acht gelassen, dass bei der Bolusgabe während einer Standarddoxorubicintherapie beim Menschen ein Serumspiegel von lediglich 1-2  $\mu\text{M}$  erreicht wird, der bereits nach einer Stunde auf 25-250 nM abfällt (Gewirtz, 1999).

Kardiotoxizität ist der bedeutsamste dosislimitierende Faktor bei einer Doxorubicin-Chemotherapie (Chlebowski, 1979). Bei der Behandlung von Brustkrebs tritt je nach verabreichter kumulativer Doxorubicindosis die Kardiotoxizität akut oder verzögert (sogar noch Jahre später) in Form von reduzierter Herzleistung (bei 56 % der Patienten) bis hin zu einem kongestiven Herzversagen (bei 20 % der Patienten) auf (Jensen et al., 2002). Die molekularen Mechanismen der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität sind bis heute unklar und die Rolle von möglicherweise entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies ist nach wie vor umstritten. Doxorubicin generiert reaktive Sauerstoffspezies wahrscheinlich durch Redoxzyklen der Aglykone an der Elektronentransportkette von Mitochondrien und durch die Bildung von Eisenkomplexen (Simunek et al., 2009). In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wird wie selbstverständlich auf reaktive Sauerstoffspezies als herzscheidender Mechanismus von Doxorubicin verwiesen. Dabei ist die objektive Beweislage für ROS als Ursache der Kardiotoxizität bei klinisch relevanten Dosen nicht eindeutig. Wie bereits erwähnt, sollten reaktive Sauerstoffspezies bei klinisch relevanten Dosen gar nicht erst entstehen (Gewirtz, 1999). Gegen die ROS-Hypothese spricht außerdem, dass fast alle gängigen Antioxidantien und Eisenchelatoren *in vivo* nicht vor Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathien schützen (Gewirtz, 1999; Simunek et al., 2009). Die einzige Ausnahme und zugleich das stärkste Argument für die pathophysiologische Relevanz von reaktiven Sauerstoffspezies ist der Eisenchelator Dexrazoxan. Die Kombination von Doxorubicin mit Dexrazoxan beugt sowohl in Tierversuchen als auch in der Klinik Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathien vor (Choi et al., 2010; Herman und Ferrans, 1981; Herman et al., 1985; Herman et al., 1988). Dexrazoxan wurde durch diese Studien zum einzigen zugelassenen Medikament, das zur Vorbeugung von Herzschäden in Folge einer Doxorubicintherapie Anwendung findet. Bemerkenswert hierbei ist, dass dieses ursprünglich zur Verhinderung der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies eingesetzte EDTA-Derivat selbst als Topoisomerase II Inhibitor wirksam ist (Sehested et al., 1993). Der Mechanismus der Topoisomerase II-Inhibition weicht allerdings von dem von Doxorubicin ab (Tanabe et al., 1991; Yan et al., 2009). Der durch Dexrazoxan vermittelte Schutzeffekt vor Doxorubicin-induzierter Kardiotoxizität könnte somit unabhängig von seinem Eisenchelatorcharakter sein und auf einer Depletion der Topoisomerase II beruhen (Lyu et al., 2007; Yan et al., 2009). Es ist möglich, dass bei einer Behandlung mit Dexrazoxan Doxorubicin das Substrat für

seinen Haupttoxizitätsmechanismus entzogen wird. Dadurch könnte zwar Normalgewebe vor Topoisomerase II-Giften geschützt werden, aber unter Umständen würden parallel auch Tumore geschützt und somit der Therapieerfolg negativ beeinflusst. Aktuell gibt es, vor allem bei Kindern und Jugendlichen, Anwendungsbeschränkungen für Dexrazoxan aufgrund von vermehrtem Auftreten sekundärer Neoplasien, schwerwiegender Knochenmarkdepression, Infektionen sowie aufgrund des unzureichenden Nachweises seiner klinischen Wirksamkeit (Salzer et al., 2010; Tebbi et al., 2007).

Es fehlt also nach wie vor an gut verträglichen Medikamenten, welche die Kardiotoxizität verhindern und den Erfolg einer anthrazyklinbasierten, antineoplastischen Therapie gleichzeitig nicht negativ beeinflussen. Wie bereits beschrieben können Statine die Wirkung von Chemotherapeutika auf transformierte Zellen erhöhen. Dies wurde bei verschiedenen transformierten Zelllinien *in vitro* sowie *in vivo* auch in Verbindung mit Doxorubicin gezeigt (Feleszko et al., 1999; Feleszko et al., 2000; Feleszko et al., 2002; Fromigue et al., 2008; Holmberg et al., 1994; Kozar et al., 2004; Martirosyan et al., 2010; Miller und Samid, 1995; Riganti et al., 2008; Riganti et al., 2006; Rozados et al., 2008; Schmidmaier et al., 2004; Siczkowski et al., 2010; Werner et al., 2004). Weniger Beachtung fanden bisher mögliche zytoprotektive Effekte von Statinen auf gesunde Zellen, bzw. auf das Normalgewebe, im Zuge einer Doxorubicinexposition. So gibt es nur wenige *in vivo* Daten zum möglichen kardioprotektiven Potential von Statinen während einer Doxorubicinbehandlung (Feleszko et al., 2000).

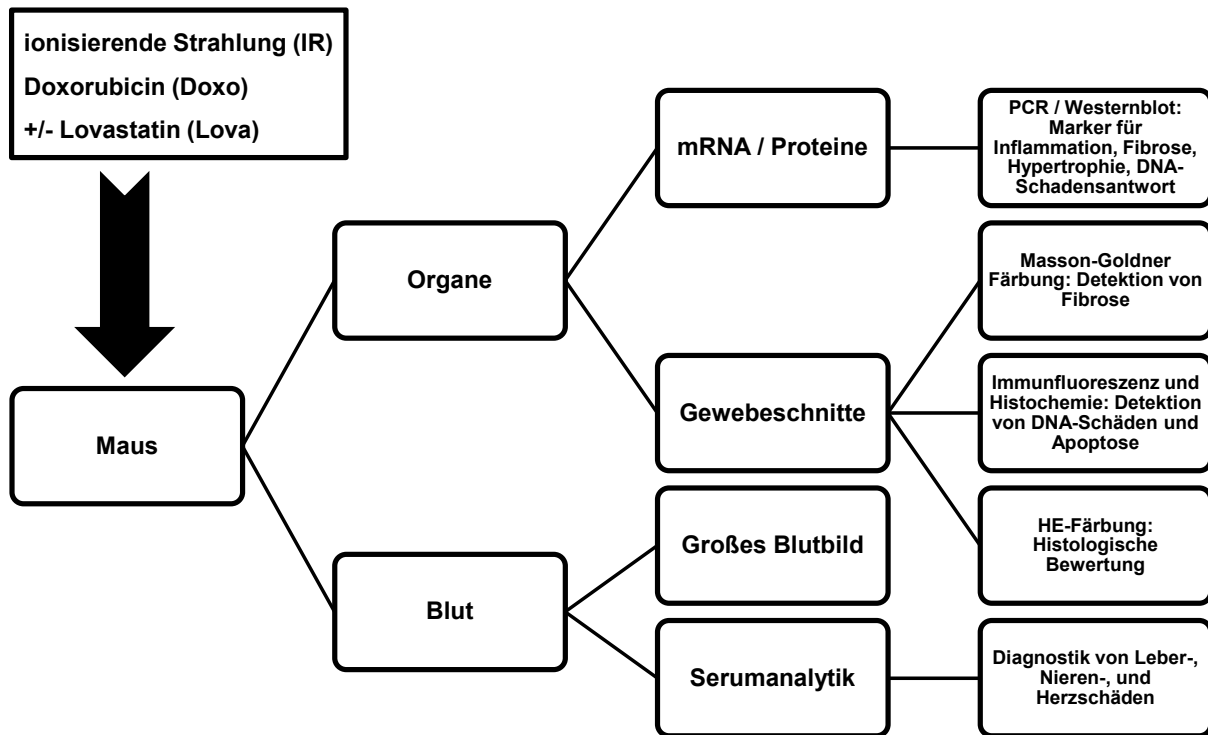
### **1.6 Ziel dieser Arbeit**

Lovastatin schützt primäre humane Zellen (HUVEC) durch Inhibition der Aktivität kleiner Rho-GTPasen vor durch ionisierende Strahlung und Doxorubicin induziertem Zelltod (Bardleben et al., 2002; Damrot et al., 2006; Nubel et al., 2006). Hier soll die Übertragbarkeit dieser *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse auf ein *in vivo* Mausmodell überprüft werden.

Mögliche protektive Effekte einer Kobehandlung mit Lovastatin wurden anhand von (i) Blutuntersuchungen (Leber-, Nieren-, Herzparameter), (ii) Quantifizierung der Menge an DNA-Schäden, (iii) Detektion der Expression von Markern für Inflammation, Fibrose und Herzhypertrophie sowie DNA-Schadensantworten in einem akuten und subakuten Behandlungsschema untersucht (Abbildung 3). Um die

## Einleitung

gleichzeitige Protektion von Tumorzellen auszuschließen, wurde ein Xenotransplantationsexperiment durchgeführt, in dem das Tumorwachstum bestimmt wurde. Im Folgenden werden die Versuchsaufbauten und Ergebnisse geschildert und anschließend diskutiert.



**Abbildung 3: Untersuchungsendpunkte und Methoden, um die Effekte von Lovastatin auf die Toxizität von ionisierender Strahlung und Doxorubicin zu untersuchen.**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blotting-Kammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank	B5060 EK/CO2	Heraeus, München
Brutschrank	BB16, Function Line	Heraeus, München
Dampfgarer	FS 20 R Multi Gourmet, Type 3216	Braun, Kronberg/Taunus
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN	Bio-Rad, München
ELISA-Reader	MagellanTM	Tecan, Salzburg
FACS	FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	TE313S-DS	Satorius, Göttingen
Geldokumentationsstation	Eagle Eye	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Hämatologiesystem	ADVIA 120	Siemens, Deutschland
Infrarot Imaging System	Odyssey	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Mikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss AG, Göttingen
Mikroskop	BX 50	Olympus, Hamburg
Mikroskop	LSM 700	Carl Zeiss AG, Göttingen
Mikrotom	Hyrax M25	Carl Zeiss AG, Göttingen
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
Serumanalytik	Architect C8000	Abbott, North Chicago, IL, USA
Spannungsquelle	PowerPac	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	Nanodrop ND 1000 UV/Vis	Peqlab, Erlangen
Sterilbank	Lamin Air, HB2472	Heraeus, München
Thermocycler, Endpunkt PCR	MyCycler	Bio-Rad, München
Thermocycler, Real-time PCR	MyIQ	Bio-Rad, München
Ultraschallstab	Sonifier 250	Branson, Dietzenbach
Ultra-Turrax	SilentCrusher S	Heidolph, Schwabach
Zellhomogenisator	TissueLyser	Qiagen, Hilden
Zentrifuge	Labofuge 400 R	Heraeus, München

## 2.2 Kits

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kits**

Kit	Hersteller
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Applied Biosciences, Mannheim
Masson-Goldner Kit	Merck, Darmstadt
Mouse Cardiac Tn-I (for serum)	Life Diagnostics, Inc, West Chester, PA, USA
Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
Peqlab gold	Peqlab, Erlangen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SensiMix SYBR Fluorescein Kit	Bioline, Luckenwalde

## 2.3 Materialien, Chemikalien und Puffer

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Materialien, Chemikalien und Puffer**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)	-	Roth, Karlsruhe
Agarose	-	Gibco, Karlsruhe
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	-	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	-	Merck, Darmstadt
Annexin-Bindepuffer	10 mM HEPES 0,14 M NaCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 0,1 % BSA pH 7,4	-
Annexin-V-FITC 488	-	BD Pharming, Heidelberg
Blotting-Puffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 20 % Methanol (v/v)	-
Borsäure	-	Roth, Karlsruhe
Bovine serum albumin	-	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	-	Sigma-Aldrich, München
CaCl <sub>2</sub>	-	Roth, Karlsruhe
Chloralhydrat	-	Merck, Darmstadt
Citratpuffer	-	DAKO, Hamburg
Citronensäure	-	Merck, Darmstadt

## Material und Methoden

---

DMSO	-	Fluka, Neu Ulm
DNase I	-	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Doxorubicin	-	Zentralapotheke der Universitätsmedizin Mainz
EDTA	-	Sigma-Aldrich, München
Eisessig	-	Roth, Karlsruhe
Entellan	-	Merck, Darmstadt
Eosin	-	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	-	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	-	PAA Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Glycin	-	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	-	Merck, Darmstadt
Hepes	-	Merck, Darmstadt
Histofix	-	Roth, Karlsruhe
LMP-Agarose	-	Appligene, Heidelberg
Lovastatin (für <i>in vitro</i> )	-	Calbiochem, Darmstadt
Lovastatin (Mevacor) (für <i>in vivo</i> )	-	Merck, Darmstadt
Methanol (techn.)	-	Chemikalienlager der Universitätsmedizin Mainz
Mayers saures Hämatoxylin	1 g Hämatoxylin 0,2 g NaJO <sub>3</sub> 50 g KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12 H <sub>2</sub> O 50 g C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> 1 g C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 1 l H <sub>2</sub> O	
Milchpulver, blotting grade	-	Roth, Karlsruhe
NaCl	-	Roth, Karlsruhe
NaJO <sub>3</sub>	-	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	-	Sigma-Aldrich, München
Nitrozellulose (Protran)	-	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger, SuperfrostPlus	-	Menzel, Braunschweig
PageRuler Prestained Plus Protein Ladder	-	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Penicillin/Streptomycin	-	Sigma-Aldrich, München
Ponceau S	-	Sigma-Aldrich, München
Propidiumjodid	-	Serva, Heidelberg
Protein Block	-	DAKO, Hamburg
Ready Red-Taq-Polymerase	-	Sigma-Aldrich, München
RNase Inhibitor, Murine	-	New England Biolabs
Roti-Load	-	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

RPMI	-	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Sammelgelpuffer	625 mM Tris 625 mM Glycin pH 6,8	-
SDS-Laufpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 0,1 % SDS (w/v)	-
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA)	100 mM Tris 10 mM EDTA 83,34 mM Borat pH 8,0	-
TBST-Puffer (Tris-buffered saline + Tween)	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 pH 7,2	-
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	-	Roth, Karlsruhe
To-pro3 Iodid	-	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trenngelpuffer	750 mM Tris 750 mM Glycin pH 8,8	-
Tris	-	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	-	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tween-20	-	Sigma-Aldrich, München
Vectashield	-	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
WST-1	-	Roche, Applied Biosciences, Mannheim
Xylol	-	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	-	Sigma-Aldrich, München

---

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten Primär- und Sekundärantikörper**

Antikörper	Spezies-spezifität	Hersteller
Actin, beta	“Mouse”	Santa Cruz, CA, USA
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	“Mouse”	Invitrogen, Paisley, UK
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	“Rabbit”	Invitrogen, Paisley, UK
Alexa Fluor 488 Annexin V		Axxora, Lörrach
Bax	“Mouse”	Santa Cruz, CA, USA
Bcl2	“Mouse”	BD Biosciences, Heidelberg
Caspase 7	“Rabbit”	Cell Signaling Techn., Beverly, MA, USA
Cdkn1a (p21)	“Rabbit”	Calbiochem, Darmstadt
Chk1	“Rabbit”	Cell Signaling Techn., Beverly, MA, USA
pChk1 (Ser 345)	“Rabbit”	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Erk2	“Rabbit”	Santa Cruz, CA, USA
IRDye 680RD Infrared Dye	“Mouse”	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IRDye 680RD Infrared Dye	“Rabbit”	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IRDye 800CW Infrared Dye	“Mouse”	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IRDye 800CW Infrared Dye	“Rabbit”	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Mapk14 (p38)	“Rabbit”	Santa Cruz, CA, USA
pMapk14 (pp38)	“Rabbit”	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Mapk8/9 (Jnk)	“Rabbit”	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
pMapk8/9 (pJnk)	“Rabbit”	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Trp53	“Mouse”	Oncogene, San Diego, CA, USA
γH2AX (pS139)	“Rabbit”	Epitomics, Burlingame, CA, USA
γH2AX (pS139)	“Mouse”	Millipore, Billerica, MA, USA

## 2.5 Nukleotide

**Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten Primer für die Endpunkt- und Real-time RT-PCR sowie den PCR-Array**

Genname	NCBI Referenzsequenz	Sequenz (5'-3')
<i>Abcb1b</i>	NM_011075	ACCATGGAGGAAATCACAGC
<i>Abcb1b</i>	NM_011075	TGGTGGCATCATCCAAGATA
<i>Abcc1</i>	NM_008576	AGGCCTACTACCCCAGCATT
<i>Abcc1</i>	NM_008576	CAGTCTCTCCACTGCCACAA
<i>Acta1</i>	NM_009606	GCGCAAGTACTCAGTGTGGA
<i>Acta1</i>	NM_009606	TCGTCCTGAGGAGAGAGAGC
<i>Akt1</i>	NM_009652	AGAAGAGACTCTGAGCATCA
<i>Akt1</i>	NM_009652	AAGGTGCCATCGTTCTTG
<i>Apex1</i>	NM_009687	AGAAATTGACCTCCGTAACC
<i>Apex1</i>	NM_009687	CGCCAACCAACATTCTTAGA
<i>Arhgdia</i>	NM_133796	CCCTACCTACCCCAAACC
<i>Arhgdia</i>	NM_133796	TGGACAACCCTGACAGTG
<i>Atf2</i>	NM_009715	TATCGTTCGTCCAGCATCA
<i>Atf2</i>	NM_009715	TACTTGAGGTTGGTGAAGGTA
<i>Atg3</i>	NM_026402	ACCACCTCCTATGTGTTCA
<i>Atg3</i>	NM_026402	TGTGTAGTCATATTCTATTGTTGGA
<i>Atg7</i>	NM_028835	GCACAACACCAACACACT
<i>Atg7</i>	NM_028835	CGAAGGTCAGGAGCAGAA
<i>Atm</i>	NM_007499	ACCAGAGGATGCTGTTCA
<i>Atm</i>	NM_007499	ATCATTAAAGTCTATGTTGAGTCCAA
<i>Bax</i>	NM_007527	CTGGACACTGGACTTCCT
<i>Bax</i>	NM_007527	GCCACAAAGATGGTCACT
<i>Bcl2</i>	NM_009741	GTGTGGTTGCCTTATGTAT
<i>Bcl2</i>	NM_009741	GTATATCCGCTACAAGTTACA
<i>Becn1</i>	NM_019584	GATGGGAACTCTGGAGGT
<i>Becn1</i>	NM_019584	GGCTGTGGTAAGTAATGGA
<i>Bid</i>	NM_007544	CACCATGTACCTTTGTCCTATC
<i>Bid</i>	NM_007544	ACCTCTCCTAATGCTGTTCT
<i>Birc3</i>	NM_007464	GCTGACACCTTTGAGTTGA
<i>Birc3</i>	NM_007464	GCAGAAGCACTTGACCTT
<i>Brca1</i>	NM_009764	TTGTGAGCGTTTGAATGA
<i>Brca1</i>	NM_009764	ACCTGGCTTAGTTACTGT
<i>Brca2</i>	NM_009765	TAACGCCTGCTGACTCTC
<i>Brca2</i>	NM_009765	TGCCAGATGAATCTCCTAACA
<i>Casp2</i>	NM_007610	TACTGCTCACAACCCTCTC

## Material und Methoden

---

<i>Casp2</i>	NM_007610	GGACCATCACCATTATCTAAGG
<i>Ccna1</i>	NM_007628	GAGGGCATCATATTTGAGGAT
<i>Ccna1</i>	NM_007628	CTTGGGTCTGTGTCTTACTTC
<i>Ccnb1</i>	NM_172301	GGTCACTAGGAACACGAAA
<i>Ccnb1</i>	NM_172301	TTTGGTAGGGCTTTAAACAGT
<i>Ccne1</i>	NM_007633	AGCCCTGGGATGATAATTCA
<i>Ccne1</i>	NM_007633	GCTCTGGGTGGTCTGATT
<i>Cd44</i>	NM_009851	ACACCTACCTTCCTACTG
<i>Cd44</i>	NM_009851	TTGTGGACTGTGAATTACC
<i>Cdc25a</i>	NM_007658	TCAAATGAAAGTGAATCAGGAAAT
<i>Cdc25a</i>	NM_007658	CTTCATATTCTCGCCATCCA
<i>Cdc25b</i>	NM_023117	CACATCCCTCTCCTCACT
<i>Cdc25b</i>	NM_023117	GAAGCCATCAGACTCAAACCT
<i>Cdkn1a</i>	NM_007669	ACCTGAATAGCACTTTGGAAA
<i>Cdkn1a</i>	NM_007669	TCTGAGCAATGTCAAGAGTC
<i>Cdkn1b</i>	NM_009875	CCCTCCAGTACACTTGAT
<i>Cdkn1b</i>	NM_009875	TAAACAACAAAACCGAACAAA
<i>Chek1</i>	NM_007691	TGAACGCTTACTGAACAAGAT
<i>Chek1</i>	NM_007691	CCACAGGACCAAACATCAA
<i>Chek2</i>	NM_016681	TGAGAAGGACGGACAAGT
<i>Chek2</i>	NM_016681	TCTACATAGTGAAAGTGCGATTT
<i>Col1a1</i>	NM_007742	CACCCTCAAGAGCCTGAGTC
<i>Col1a1</i>	NM_007742	AGACGGCTGAGTAGGGAACA
<i>Col3a1</i>	NM_009930	GCACAGCAGTCCAACGTAGA
<i>Col3a1</i>	NM_009930	TCTCAAATGGGATCTCTGG
<i>Ctgf</i>	NM_010217	CAAAGCAGCTGCAAATACCA
<i>Ctgf</i>	NM_010217	GGCCAAATGTGTCTTCCAGT
<i>Cyp1a1</i>	NM_009992	CCTCCGTTACCTGCCTAA
<i>Cyp1a1</i>	NM_009992	GTCCTGACAATGCTCAATGA
<i>Cyp1b1</i>	NM_009994	GACGATGCGGAGTTCCTA
<i>Cyp1b1</i>	NM_009994	GCTGAAGTTGCGGTTGAG
<i>Ddb2</i>	NM_028119	AGGCAACATTCTCAGAGT
<i>Ddb2</i>	NM_028119	CATTTCGGAGGTTCCAAAG
<i>Ddit3</i>	NM_007837	GTCAGTTATCTTGAGCCTAA
<i>Ddit3</i>	NM_007837	GTGTGGTGGTGTATGAAG
<i>Elk1</i>	NM_007922	AGCCTGAGGTGTCTGTAA
<i>Elk1</i>	NM_007922	GTGTTGGGAAGCACTGAG
<i>Erc1</i>	NM_007948	AAACAGGAGCAAAGTCTAAT
<i>Erc1</i>	NM_007948	GGATGTAGTCTGGATGGA
<i>Fancc</i>	NM_007985	GCTTGTTGGAATCCTCTCAT
<i>Fancc</i>	NM_007985	CCACGAGTTAAGTCCTGAC

## Material und Methoden

---

<i>Fas</i>	NM_007987	AGAACCTCCAGTCGTGAA
<i>Fas</i>	NM_007987	ATCTATCTTGCCCTCCTTGA
<i>Fasl</i>	NM_010177	CTGGAATGGGAAGACACATAT
<i>Fasl</i>	NM_010177	TGGTCAGCACTGGTAAGA
<i>Fen1</i>	NM_007999	GGAACGATACTGAAAGAACGG
<i>Fen1</i>	NM_007999	CGGCGAAGAGGAATGTTC
<i>Fos</i>	NM_010234	AACTTCGACCATGATGTTCT
<i>Fos</i>	NM_010234	GCACTAGAGACGGACAGA
<i>Gadd45a</i>	NM_007836	GTCGCTACATGGATCAGTG
<i>Gadd45a</i>	NM_007836	GTGACTGCTTGAGTAACTACA
<i>Gapdh</i>	NM_008084	TCTCCTGCGACTTCAACA
<i>Gapdh</i>	NM_008084	TCTCTTGCTCAGTGTCTT
<i>Gpx1</i>	NM_008160	TTGGTGATTACTGGCTGC
<i>Gpx1</i>	NM_008160	TGATATTCAGCACTTTATTCTTAGTAG
<i>Gstm1</i>	NM_010358	ACACAGCCTTCATTCTCC
<i>Gstm1</i>	NM_010358	AATTCTAGGAAGCGTGAGTT
<i>Hif1a</i>	NM_010431	GAGGAGCGCCTAGGAACC
<i>Hif1a</i>	NM_010431	CGGAGAAAGAGACAAGTCCA
<i>Hmox1</i>	NM_010442	CCAGAGTCCCTCACAGAT
<i>Hmox1</i>	NM_010442	CCCAAGAGAAGAGAGCCA
<i>Hsp90aa1</i>	NM_010480	CGGAGGCTTCTGGAAAGA
<i>Hsp90aa1</i>	NM_010480	CATCGTGGCTGAATGAACA
<i>Hspa1b</i>	NM_010478	AGACGCTGACAGCTACTC
<i>Hspa1b</i>	NM_010478	CTCGCTTCTGGAAGGCT
<i>Hus1</i>	NM_008316	TGGAAGGAGTCTCTGAAGAA
<i>Hus1</i>	NM_008316	AGGGAAGTGTTTGTAGTCA
<i>Icam1</i>	NM_010493	TGCTCAGGTATCCATCCAT
<i>Icam1</i>	NM_010493	GGAAACGAATACACGGTGAT
<i>Il1a</i>	NM_010554	AAGCAACGGGAAGATTCTGA
<i>Il1a</i>	NM_010554	TGACAAACTTCTGCCTGACG
<i>Il12a</i>	NM_008351	GGAACACACAAGAACGAGAG
<i>Il12a</i>	NM_008351	CGCCATTATGATTCAGAGACT
<i>Il6</i>	NM_031168	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA
<i>Il6</i>	NM_031168	CAGAATTGCCATTGCACAAC
<i>Il10</i>	NM_010548	CATGGGTCTTGGGAAGAGAA
<i>Il10</i>	NM_010548	CATTCCCAGAGGAATTGCAT
<i>Itgb1</i>	NM_010578	GCCAGCCAAGTGACATAG
<i>Itgb1</i>	NM_010578	ACTTCTGTGGTTCTCCTGAT
<i>Jun</i>	NM_010591	AACTTTCCTGACCCAGAG
<i>Jun</i>	NM_010591	GCGAACTGGTATGAGTATAG
<i>Keap1</i>	NM_016679	ACGACGTGGAGACAGAGACC

## Material und Methoden

---

<i>Keap1</i>	NM_016679	ATCAATTTGCTTCCGACAGG
<i>Lamp1</i>	NM_010684	AAGTGGAGAACAAGAACAGAG
<i>Lamp1</i>	NM_010684	TCAGTGAATGGTTGGAGATG
<i>Lig1</i>	NM_010715	ATTTCCGGGTTTGCGTCTC
<i>Lig1</i>	NM_010715	ACCACTTGATTCCTCTCCTT
<i>Lig4</i>	NM_176953	GTGTCCTGATGCTTAGTTGT
<i>Lig4</i>	NM_176953	CTCCTTGAAGTGCCTGATT
<i>Mdm2</i>	NM_010786	AAGGTGGGAGTGATCTGAA
<i>Mdm2</i>	NM_010786	TCTGTGTTCTCTTCTGTCTCA
<i>Mgmt</i>	NM_008598	GCTGCTGAAGGTTGTGAA
<i>Mgmt</i>	NM_008598	TCTCATTGCTCCTCCTACTG
<i>Mmp13</i>	NM_008607	GCCACCTTCTTCTTGTTGA
<i>Mmp13</i>	NM_008607	TAGTATGATTTCAAGTAGTGCTCTG
<i>Mmp3</i>	NM_010809	GCTGTGGGAAAGTCAATGA
<i>Mmp3</i>	NM_010809	GCCATAGTAGTTTTCTAGGTATT
<i>Mmp7</i>	NM_010810	GAACAGGCTCAGAATTATCTTAGA
<i>Mmp7</i>	NM_010810	CCACTACGATCCGAGGTAA
<i>Mpg</i>	NM_010822	CTGTATGTGTACCTCATCTATGG
<i>Mpg</i>	NM_010822	CAGAGTTCACGGTCCTTG
<i>Mre11a</i>	NM_018736	TACGGCTTAGGCTCCATT
<i>Mre11a</i>	NM_018736	ATGCTTACTCCTGTTCTGATG
<i>Msh2</i>	NM_008628	GTCTAAGGAGAATGAGTGGTATC
<i>Msh2</i>	NM_008628	CCATAACGCCAACGGAAG
<i>Nos2</i>	NM_010927	GCTGTTAGAGACACTTCTGAG
<i>Nos2</i>	NM_010927	CACTTTGGTAGGATTTGACTTTG
<i>Nos3</i>	NM_008713	GCATGGGCAACTTGAAGA
<i>Nos3</i>	NM_008713	AGGGTGTTCGTAGGTGATG
<i>Nox1</i>	NM_172203	GGCTAAATCCCATCCAGTC
<i>Nox1</i>	NM_172203	CCTAAGCAGATGATATAGACGATAA
<i>Nppa</i>	NM_008725	CCTAAGCCCTTGTGGTGTGT
<i>Nppa</i>	NM_008725	CAGAGTGGGAGAGGCAAGAC
<i>Nppb</i>	NM_008726	CTGAAGGTGCTGTCCCAGAT
<i>Nppb</i>	NM_008726	CCTTGGTCCTTCAAGAGCTG
<i>Nfe2l2</i>	NM_010902	GCAACTCCAGAAGGAACAGG
<i>Nfe2l2</i>	NM_010902	AGGCATCTTGTGGGAATG
<i>Ogg1</i>	NM_010957	TGAGACTGCTGAGACAAGA
<i>Ogg1</i>	NM_010957	GGAAGCCATGATAAGTGACA
<i>Pcna</i>	NM_011045	GACTTAGATGTGGAGCAACTT
<i>Pcna</i>	NM_011045	GGCTAAGGTCTCGGCATA
<i>Pold1</i>	NM_011131	CTCCATTTCTCCGCATCAC
<i>Pold1</i>	NM_011131	CAATGTCAGCATCCACCAT

## Material und Methoden

---

<i>Pole</i>	NM_011132	CGGTGGATTACTACTTCATTCA
<i>Pole</i>	NM_011132	CTTCTTTGGGCACATTCTCTA
<i>Pten</i>	NM_008960	ATCAAGAGATCGTTAGCAGAAA
<i>Pten</i>	NM_008960	TTGGCGGTGTCATAATGTC
<i>Rac1</i>	NM_009007	ACAAAGCCTTCTTAAAGCCTTA
<i>Rac1</i>	NM_009007	GCGGTCTTCTTAGCAACA
<i>Rad51</i>	NM_011234	CAGCGATGTCCTAGATAATGTAG
<i>Rad51</i>	NM_011234	TTACCACTGCGACACCAA
<i>Rev1</i>	NM_019570	TCTGCGGAGGAATTGAGA
<i>Rev1</i>	NM_019570	ACACAGGATTGAAGTTGAGAC
<i>Rev3l</i>	NM_011264	TTCTCAGATGGCATTTCAGTATC
<i>Rev3l</i>	NM_011264	TCATTATGGCTCCGCTTTG
<i>Rhoa</i>	NM_016802	AAGTCTGGGTGCCTCAT
<i>Rhoa</i>	NM_016802	AATAATCGTGGTTGGCTTCTAA
<i>Rhob</i>	NM_007483	CAGCATCAGCCATCACTTC
<i>Rhob</i>	NM_007483	CTAGGCTCGCTAACTGCA
<i>Sele</i>	NM_011345	TGCGAGAAGAACGGATAGA
<i>Sele</i>	NM_011345	CTGAATTGCCACCAGATGT
<i>Sod1</i>	NM_011434	ACCAGTTGTGTTGTCAGG
<i>Sod1</i>	NM_011434	TTTCTTAGAGTGAGGATTAATGAG
<i>Tgfb1</i>	NM_011577	TGCGCTTGCAGAGATTAATA
<i>Tgfb1</i>	NM_011577	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
<i>Tiam1</i>	NM_009384	GGTAGAACCATTGTGGACTG
<i>Tiam1</i>	NM_009384	CGGTGTGGCATTTCAGAGAC
<i>Timp2</i>	NM_011594	CAAAGCAGTGAGCGAGAA
<i>Timp2</i>	NM_011594	CATCTTGCCATCTCCTTCTG
<i>Tnfa</i>	NM_013693	AGCCCCAGTCTGTATCCTT
<i>Tnfa</i>	NM_013693	CTCCCTTTGCAGAACTCAGG
<i>Top2a</i>	NM_011623	CTTCAGGAGCCGTCACCAT
<i>Top2a</i>	NM_011623	GAGCAGTATATGTTCCAGTTGT
<i>Top2b</i>	NM_009409	TGGGTGAACAATGCTACAAA
<i>Top2b</i>	NM_009409	TGTATGTATCAGGACGAAGGA
<i>Trex1</i>	NM_011637	GCTACCACTGGAACAACC
<i>Trex1</i>	NM_011637	TGCTATGGAAGTCTTTATTTCATCA
<i>Trp53</i>	NM_011640	AAGTTCTGTAGCTTCAGTTCAT
<i>Trp53</i>	NM_011640	GGCAGTCATCCAGTCTTC
<i>Trp63</i>	NM_011641	AGCATCAGAAAGCAGCAA
<i>Trp63</i>	NM_011641	GATCTTCAGCAACATCTCGTA
<i>Trp73</i>	NM_011642	CTCCGCACCCTTATAACC
<i>Trp73</i>	NM_011642	GCTGAGCAAATTGAACTGG
<i>Vcam1</i>	NM_011693	ATATACTTGGAAAGTGTCGTGTT

## Material und Methoden

---

<i>Vcam1</i>	NM_011693	GACCATCTTCACAGGCATT
<i>Wee1</i>	NM_009516	GTAGTCTCTATTCATGGACACA
<i>Wee1</i>	NM_009516	GTTGCTTTCAGTAATTGTAATTCTTT
<i>Wrn</i>	NM_011721	TGATTGCTCCTTCCTGTCT
<i>Wrn</i>	NM_011721	ACTGCGACTCTGCTTCTT
<i>Wrnip1</i>	NM_030215	GCCAATGAGATCCCTTCG
<i>Wrnip1</i>	NM_030215	AACCTTATGCTGTGCTTCTT
<i>Xpa</i>	NM_011728	GACAACCACTCACCAACATA
<i>Xpa</i>	NM_011728	TGAACTTTGAACAGGGTCTTTA
<i>Xpc</i>	NM_009531	GCGAAAGAACGGGAAAGA
<i>Xpc</i>	NM_009531	AAGCGAATTGGAATGATGGA
<i>Xrcc1</i>	NM_009532	CCAACCGTGTTCCGATTT
<i>Xrcc1</i>	NM_009532	GCACTGTCATCCTCCTCTT
<i>Xrcc3</i>	NM_028875	GGAGGAAGTCTGAGTTGGT
<i>Xrcc3</i>	NM_028875	CTCTTAACCGCAGCAGTAAT
<i>Xrcc4</i>	NM_028012	TGCCTGGACACCATTACA
<i>Xrcc4</i>	NM_028012	CTTCTCATT CAGCACCAAGAT

---

## 2.6 Verwendete Software

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software**

Software	Hersteller
Cell^A	Olympus, Hamburg
Endnote X4.0.2	Thomson Reuters, New York, NY, USA
ImageJ 1.45	National Institutes of Health, USA
iQ5 2.1	Bio-Rad, München
MS Office 2003/2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
Multi Analyst 1.1	Bio-Rad, München
Primer3 v0.4.0	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA
Sigmastat 3.5	Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA
WinMDI 2.9	Joseph Trotter
ZEN 2010	Carl Zeiss AG, Göttingen

---

### 2.7 Zellkultur

Humane Fibrosarkomzellen (HT-1080, ATCC-Nummer: CCL-121) wurden in RPMI Medium (Invitrogen, Deutschland) mit 5 % fötalem Kälberserum (PAA cell culture company, Pasching, Österreich) und Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, München) bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Sie wurden dreimal in der Woche mittels Trypsin/EDTA geerntet, mit PBS gewaschen, verdünnt und neu ausgesät, um die Zellen stetig in der verzögerten oder exponentiellen Wachstumsphase zu halten.

### 2.8 Zellexperimente

Die Zellen wurden an Tag 1 des Experiments ausgesät (~ 200.000 Zellen), an Tag 2 mit Lovastatin vorbehandelt, 16 h später (an Tag 3) mit Doxorubicin behandelt (eine Stunde Pulsbehandlung) und anschließend gewaschen. Für die Facs- und WST-1-Analysen wurden die Zellen 48 h später geerntet. Für  $\gamma$ H2AX Analysen mittels Western Blot und Immunfluoreszenz wurden die Zellen 1-2 h nach der Doxorubicin-Behandlung geerntet.

### 2.9 Tierversuche

Die Tiere wurden bei kontrollierter Temperatur von 22-24 °C in einer sterilen Umgebung mit 12 h Tag-/Nachtzyklus gehalten. Futter und Wasser wurde *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Tierversuche wurden vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt.

24 BALB/c Mäuse und 32 Rag2<sup>-/-</sup>/BALB/c Mäuse mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 20-25 g und einem Alter von 3-4 Monaten wurden für die Experimente zufällig in vier Gruppen mit je 6-8 Tieren aufgeteilt. Um den Einfluss von Lovastatin auf akute Strahlen- und Doxorubicin-Toxizität zu analysieren, wurden die Mäuse an zwei aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 10 mg x kg<sup>-1</sup> Lovastatin (orale Applikation mittels Schlundsonde) vorbehandelt und 24 h später mit 10 mg x kg<sup>-1</sup> Doxorubicin behandelt (intraperitoneale Injektion). Die Tiere aus der Bestrahlungsgruppe wurden mit 6 Gy Gammastrahlung (Ganzkörperbestrahlung mittels Cäsium 137) behandelt. Im Fall der Doxorubicin-Behandlung wurden die Tiere 24 h später erneut mit Lovastatin behandelt und weitere 24 h später nach Tierschutzvorgaben (TierSCHg, §4) mit CO<sub>2</sub>-Begasung euthanasiert (Abbildung 4).

## Material und Methoden

---

Die Organe wurden mittels Sektion entnommen und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder in Formaldehyd (Histofix von Roth, Karlsruhe) fixiert. Die bestrahlten Tiere wurden zur einen Hälfte 4 h nach der Bestrahlung, zur anderen 24 h danach analysiert (Abbildung 4).

Tag	1	2	3	4	5
<b>Lova [10 mg x kg<sup>-1</sup>]</b>					
<b>Doxo [10 mg x kg<sup>-1</sup>]</b>					
<b>Organentnahme</b>					

Stunden	-48	-24	0	4	24
<b>Lova [10 mg x kg<sup>-1</sup>]</b>					
<b>IR [6 Gy]</b>					
<b>Organentnahme</b>					

**Abbildung 4: Tierbehandlungsschemata für die Analyse des Einflusses von Lovastatin auf die akute Doxorubicin-Toxizität und akute  $\gamma$ -Strahlenantworten.**

Um den Einfluss von Lovastatin auf die subakute Doxorubicin-Toxizität und Strahlensensitivität zu untersuchen wurden die Tiere, analog zum Behandlungsschema der akuten Behandlung, zwei Tage in Folge mit 10 mg x kg<sup>-1</sup> Lovastatin vorbehandelt und erhielten im Laufe des 24-tägigen Experiments dreimal die Woche diese Statindosis. Doxorubicin wurde an Tag 3 (24 h nach der zweiten Lovastatin-Dosis), Tag 9 und Tag 16 verabreicht (Abbildung 5). Für die Analyse nach subchronischer Strahlenexposition wurden die Tiere an Tag 3 und 10 mit jeweils 2,5 Gy bestrahlt (Abbildung 5). Die Blutentnahme erfolgte an Tag 3, 10 und 16 des Experiments, nach den „Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren“ der Gesellschaft für Versuchstierkunde. An Tag 24 wurden die Tiere seziiert und die Organe entnommen.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Lova [10 mg x kg <sup>-1</sup> ]	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Doxo [3 mg x kg <sup>-1</sup> ]	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Organentnahme	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Lova [10 mg x kg <sup>-1</sup> ]	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
IR [2,5 Gy]	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Organentnahme	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 5: Tierbehandlungsschemata für die Analyse des Einflusses von Lovastatin auf subakute Doxorubicin-Toxizität und subakute  $\gamma$ -Strahlenantworten.

### 2.10 Xenotransplantation

Für das Xenotransplantationsexperiment wurden immundefiziente Rag2<sup>-/-</sup>/BALB/c Mäuse verwendet. Tiere mit einem Rag2-Knockout sind inkompetent in der V(D)J-Rekombination und besitzen als Konsequenz keine voll ausgereiften B- und T-Lymphozyten (Shinkai et al., 1992). Das Immunsystem von Rag2-Knockout-Mäusen ist somit nicht in der Lage, Fremdgewebe abzustößen. Für die Tumorbildung wurden je Flanke  $4 \times 10^6$  HT-1080 Zellen subkutan injiziert. HT-1080 wurden gewählt, da Doxorubicin zu den Standardtherapeutika bei Sarkomen gehört. Weitere Gründe waren, dass sie humanen Ursprungs sind, onkogenes N-Ras besitzen und als stark metastasierend gelten (Geiser et al., 1989; Rasheed et al., 1974). Nach HT-1080 Injektion liegt die Verdopplungszeit des Tumorumfanges in athymischen Mäusen bei  $2,6 \pm 1,0$  Tagen (Vanhoefer et al., 1996). Fünf Tage nachdem die Zellen injiziert wurden, wurden die Tiere wie in Abbildung 5 beschrieben mit Lovastatin und/oder Doxorubicin behandelt. Die Tumorgöße wurde am lebenden Tier äußerlich mittels Messschieber bestimmt. Das Tumorumfang wurde durch die Formel  $\frac{1}{2} \times (\text{Länge} \times \text{Breite}^2)$  abgeschätzt. In die Auswertung gingen nur solche Tumore mit ein, die innerhalb von acht Tagen nach Injektion der Zellen messbares Wachstum aufwiesen. Tiere mit großen Tumoren wurden nach den „Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten“ der Gesellschaft für Versuchstierkunde vor Ende des Experiments euthanasiert.

### 2.11 Proteinextrakte aus Zellen und Geweben

Semikonfluente Zellen (ca.  $2-5 \times 10^5$  Zellen in Petrischalen mit sechs Zentimetern Durchmesser) wurden mit 200  $\mu$ l Roti-Load Proteinladepuffer überschichtet und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mittels Zellschaber geerntet, sonifiziert (100 Watt, 5 Impulse, 25 % Leistung), zentrifugiert und der Überstand für 5 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurden sie entweder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert oder direkt in die Taschen des SDS-Gels zur Analyse aufgetragen.

Zu 15-30 mg gefrorenem Gewebe wurden 300-600  $\mu$ l Roti-Load Proteinladepuffer (Roth, Deutschland) gegeben. Nach mechanischer Homogenisierung mittels TissueLyser (Qiagen, Deutschland) (3 x 30 sec bei 25 Hz) wurden die Gewebelysate auf die gleiche Art und Weise behandelt wie die Zelllysate.

### 2.12 Western Blot

Ein bis zwei Mikrogramm Protein aus den Gewebe- oder Zelllysaten wurde elektrophoretisch mittels 7,5 % bis 15 % SDS-Acrylamidgelen separiert (40-70 min bei 15-30 mA pro Gel) und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geladen (1,5 h bei 300 mA). Die Membranen wurden mindestens eine Stunde in Tris-gepufferter Salzlösung mit 0,1 % Tween 20 (TBST) und fünf Prozent fettfreier Milch geblockt, 3x 5 min mit TBST gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper (1:1000) in TBST, 5 % fettfreier Milch in TBST oder 5 % BSA in TBST inkubiert (je nach Herstellerspezifikationen des Antikörpers). Am Folgetag wurden die Membranen 3x 5 min mit TBST gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper („Infrared Dye“, LI-COR Biosciences, Bad Homburg) in TBST + 5 % fettfreier Milch (1:15000) für mindestens 2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen und anschließendem Trocknen der Membran unter Lichtausschluss wurde das Infrarotsignal des Sekundärantikörpers mittels Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) detektiert und quantifiziert. Zur Normalisierung wurden Erk2 (Mapk1) und beta Actin als Referenzproteine verwendet.

### 2.13 RNA Isolation aus Geweben

Die RNA aus verschiedenen Geweben wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll isoliert, inklusive des optionalen DNA-Verdaus mittels DNase I (Qiagen, Hilden). Die Homogenisation der Gewebe wurde mittels TissueLyser (Qiagen, Hilden) (25 Hz, 3 x 30 sec) oder mittels Ultra-Turrax („SilentCrusher S“, Heidolph, Schwabach) (30-60 sec) durchgeführt. Die Konzentration und Qualität der gewonnenen RNA wurde mittels Nanodrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen) überprüft.

### 2.14 cDNA Synthese

Die reverse Transkription von 500-2000 ng RNA wurde mittels Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) mit Oligo-dT-Primern nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Der verwendete RNase Inhibitor (Murine, M0314) wurde von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) bezogen.

### 2.15 Endpunkt- und Real-time-RT-PCR

#### 2.15.1 Endpunkt-RT-PCR

Für die Endpunkt-PCR wurden zehn Prozent des Produktes aus der reversen Transkription eingesetzt. Verwendet wurde der Peqlab PCR Mix (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerprotokoll. Eine rekombinant hergestellte und aufgereinigte *Taq*-Polymerase wurde freundlicherweise von Professor Kleinert (Pharmakologie, Mainz) zur Verfügung gestellt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 525 nM eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mittels Thermocycler („MyCycler“ von Biorad, München) nach folgendem Protokoll durchgeführt: Denaturierung für 2 min bei 94 °C, dann 20 bis 35 Zyklen (je nach Primer): 94 °C, 30 sec - 56 °C, 30 sec - 72 °C, 30 sec. Die Amplifikate wurden auf ein 1,2 % Agarose-Ethidiumbromidgel aufgetragen und elektrophoretisch separiert. Die Fluoreszenz des Ethidiumbromids wurde mit einer UV-Lampe angeregt und mittels UV-sensitiver Photokamera abgelichtet („Eagle Eye“ von Stratagene, La Jolla, CA, USA). Die Intensität der Ethidiumbromidfärbung wurde mittels „Multi Analyst Software“ (Biorad, Deutschland) densitometrisch quantifiziert. Als Referenzgene wurden *Actb* (beta Actin) und/oder *Gapdh* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-

Dehydrogenase) verwendet. Sämtliche Primer wurden mittels Primer3 Version 0.4.0 konstruiert (Rozen und Skaletsky, 2000). Die mRNA Spiegel in den jeweiligen Kontrollen wurden gleich 1,0 gesetzt.

### 2.15.2 Real-Time-RT-PCR

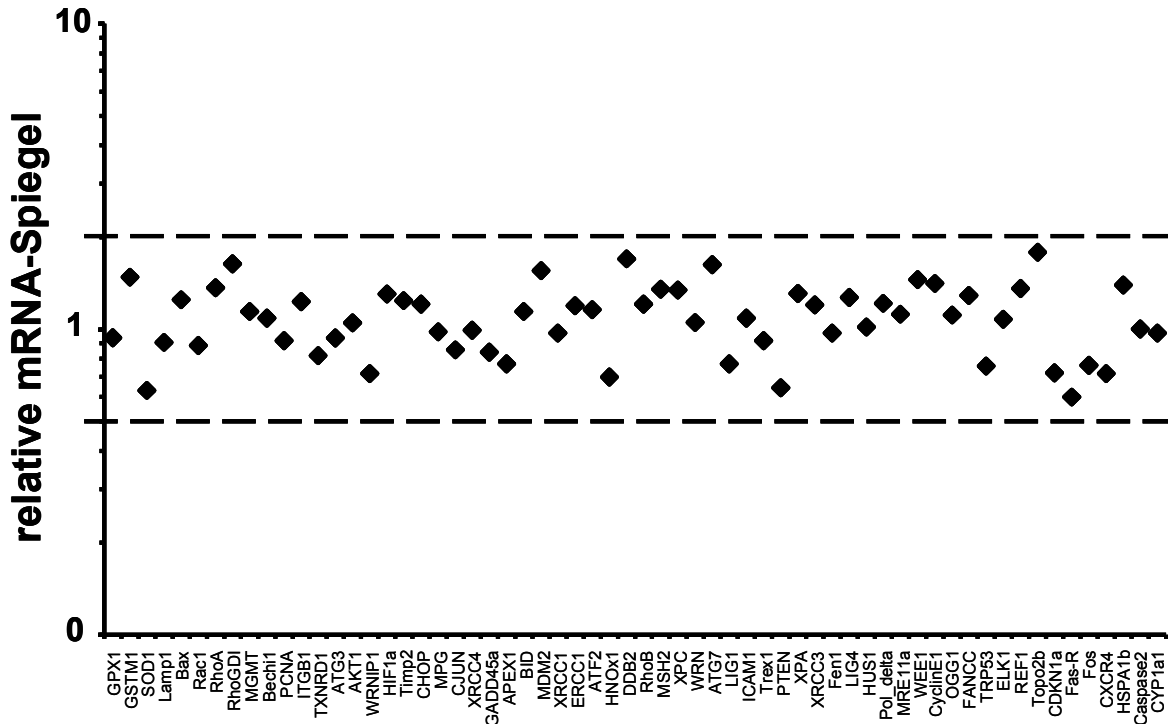
Für die Real-Time-RT-PCR wurde das SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Bioline, Luckenwalde) verwendet. Der Gesamtreaktionsansatz hatte ein Volumen von 20  $\mu$ l. 50 % dieses Ansatzes bestand aus dem SensiMix SYBR & Fluorescein Kit, zwei bis fünf Prozent aus cDNA (je nachdem, ob die cDNA aus 1000-2000 ng oder 500-1000 ng RNA synthetisiert wurde). Die Endkonzentration der Primer im Reaktionsansatz betrug 250 nM. Die  $MgCl_2$ -Endkonzentration wurde um 1 mM erhöht. Die PCR-Reaktion lief in einem MyIQ Cycler (Biorad, Deutschland) nach folgendem Protokoll ab: *Taq*-Aktivierung / cDNA Denaturierung für 10 min bei 95 °C; danach 45 Zyklen: 95 °C, 15 sec – 55 °C, 15 sec – 72 °C, 17 sec. Anschließend wurden Schmelzkurven zur Qualitätskontrolle aufgezeichnet. Die SYBR-Green Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus detektiert. Die  $\Delta CT$ -Werte („Relative Cycle Threshold“, relativer Schwellwert-Zyklus) wurden mittels IQ5 Software (Biorad, Deutschland) ausgewertet und die mRNA-Menge in den Kontrollen gleich 1,0 gesetzt. Zur Normalisierung und Generierung von  $\Delta\Delta CT$ -Werten wurden *Actb* und *Gapdh* als Referenzgene verwendet. Für die Auswertung wurden nur diejenigen Amplifikate berücksichtigt, die spezifische Schmelzkurven lieferten und vor 35 Zyklen den Schwellwert-Zyklus erreichten. Die verwendeten Primer wurden entweder mit Primer3 Version 0.4.0 generiert oder von Sigma-Aldrich anhand der NCBI Referenzsequenz bereitgestellt (Tabelle 5).

Systematische und zufällige Fehler, angefangen von der Behandlung der Tiere, über Probenentnahme/-behandlung, mRNA-Isolation und cDNA-Synthese bis hin zur Real-Time-PCR-Analyse, können dazu führen, dass die mittels PCR-Analyse bestimmte Größe der Expressionsänderung überschätzt wird. Darum wurden strikte Grenzen definiert, ab denen ein Anstieg oder eine Abnahme des mRNA-Spiegels im Vergleich zur Kontrolle als signifikant galt. Im Regelfall wurde eine Hochregulation als signifikant akzeptiert, wenn mindestens doppelt so viel ( $>2x$ ) Produkt im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde, bzw. weniger als die Hälfte ( $<0,5x$ ). In Ausnahmefällen, z.B. wenn sämtliche mRNA-Spiegel eines Genclusters (z.B. fibroseassoziierte Gene) im Vergleich zur Kontrolle lediglich  $>1,5x$  bzw.  $<0,75x$

verändert waren, wurde die Veränderung des Gesamtclusters als signifikant angesehen.

### **2.16 Real-time RT-PCR-Array**

Der PCR-Array wurde in Zusammenarbeit mit Sigma-Aldrich Deutschland erstellt. Dafür wurden der Firma die NCBI Referenzsequenzen von 96 Genen übermittelt, für welche Primer synthetisiert und auf 96-Lochplatten vorpipettiert wurden. Die Primer wurden maschinell in einem Volumen von 8 µl H<sub>2</sub>O vorpipettiert (Endkonzentration im finalen 20 µl Reaktionsansatz: 250 nM). Die Real-Time-RT-PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die definierten Signifikanzgrenzen auch beim PCR-Array genug Sicherheit gegen falschpositive Befunde liefern und wie stark sich interindividuelle Schwankungen im Expressionsprofil auswirken, wurden Expressionsprofile der Lebern von zwei verschiedenen unbehandelten C57BL/6-Mäusegruppen aus zwei verschiedenen Experimenten miteinander verglichen. Es wurde experimentell bestätigt, dass die Signifikanzgrenzen von >2x und <0,5x auch für den PCR-Array ausreichend Sicherheit gegen falschpositive Befunde bieten (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Variabilitätskontrolle des Real-time-RT-PCR-Arrays.** Die mRNA wurde wie oben beschrieben aus den Lebern von jeweils 3 Tieren isoliert. Sie wurde zu gleichen Anteilen gemischt, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert (n = 1). Dargestellt ist das Expressionsprofil, das sowohl Resultat aus der interindividuellen Variabilität im Mausstamm, als auch aus systematischen und zufälligen Fehlern ist. Die mRNA-Spiegel von einer der Kontrollgruppen wurden gleich 1,0 gesetzt. Als Referenzgene wurden *Gapdh* und *Actb* zur Normalisierung verwendet. Es sind ausschließlich die relativen mRNA-Spiegel derjenigen Gene dargestellt, die die Qualitätskriterien erfüllten (siehe oben).

## 2.17 Blutanalysen

### 2.17.1 Großes Blutbild und Serumanalytik

Den Tieren wurde direkt nach der Sektion mittels Punktion Blut aus dem Herzen entnommen. Die EDTA-Vollblut und Blutserumanalysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Mainz durchgeführt. Für die Erstellung des großen Blutbildes inklusive Differentialblutbild der Leukozyten wurden mindestens 60 µl EDTA-Blut je Tier mittels ADVIA 120 Hämatologie System (spezialisiertes Durchflusszytometer) (Bayer, Deutschland) analysiert.

Für die Bestimmung der Konzentration von Biomarkern für Leber- und Nierentoxizität im Blutserum wurden mindestens 60 µl Serum je Tier mittels Architect C8000 (Abbott Diagnostics, Schweiz) potentiometrisch und photometrisch analysiert.

### 2.17.2 Il6 und cTn-I Messungen im Blutserum

Für die Bestimmung von cTn-I im Serum, wurde zuvor Blut aus einer Schwanzvene entnommen, um den cTn-I Wert nicht durch Schädigung des Herzens zu verfälschen. Für die Messung von kardiärem Troponin I (cTn-I) wurde das „cTn-I ELISA Kit Mouse Cardiac Tn-I (for serum)“ von Life Diagnostics (West Chester, PA, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet. Das cTn-I Protein ist im Blutserum erhöht, wenn Herzmuskelzellen geschädigt werden und wird als klinischer Marker für Myokardinfarkte verwendet (Adams et al., 1993; Sobki et al., 2000). Interleukin 6 gehört zu den Akut-Phase-Proteinen, die nach Verletzung oder Infektion im Blut messbar sind und gilt als Marker für unspezifische Inflammation (Heinrich et al., 2003). Für die Messung der Il6-Serumkonzentration wurde das „Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!“-Kit von eBiosciences (San Diego, CA, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet.

### 2.18 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die entnommenen Organe wurden für maximal 24 h in gepuffertem Formalin (Histofix, Roth, Karlsruhe) fixiert. Anschließend wurden sie mittels aufsteigender alkoholischer Reihe und Xylol entwässert, in Paraffin gegossen und ausgebettet. Mittels Hyrax M25 Mikrotom (Carl Zeiss AG, Göttingen) wurden ~ 4 µm dicke Gewebeschnitte auf Menzel-Gläser (SuperfrostPlus, Menzel, Braunschweig) übertragen. Für die Färbungen und Immunhistochemie wurden die Gewebeschnitte 30 min bei 70 °C inkubiert und anschließend zweimal 5 min mit Xylol entparaffiniert. Danach wurden sie mit einer absteigenden alkoholischen Reihe rehydriert.

### 2.19 Anfärbung von Gewebeschnitten

#### 2.19.1 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Schnitte wurden in einer Glasküvette 6-10 min in saurem Hämalaun nach Mayer inkubiert, mit Leitungswasser gespült und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser „gebläut“. Danach wurden sie kurz mit destilliertem Wasser gespült und 1-2 min in Eosin getaucht. Daraufhin wurden sie erneut kurz mit destilliertem Wasser gespült und die Zytoplasmafärbung mit 70 %igem Ethanol differenziert. Die Schnitte wurden dann mit 96 %igem Ethanol gespült und mit 100 % Ethanol

entwässert. Anschließend kamen sie für 3x 5 min in Xylol und wurden mit Entellan versiegelt.

### 2.19.2 Masson-Goldner Färbung

Für die Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte 10 min in Eisenhämatoxylin nach Weigert inkubiert und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gespült und 5 min unter fließend Leitungswasser „gebläut“. Nach einer weiteren Spülung mit destilliertem Wasser wurde das Zytoplasma durch siebenminütige Inkubation in Masson-Goldner Lösung angefärbt. Die Schnitte wurden dreimal in 1 %iger Essigsäure gespült und anschließend 5-10 min mit Phosphorwolframsäure-Orange G differenziert. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal in 1 %iger Essigsäure gespült. Kollagenreiches Gewebe wurde mit Lichtgrün angefärbt (60-90 sec Inkubation). Nach fünfminütigem Auswaschen des Lichtgrüns mit 1 %iger Essigsäure, wurden die Schnitte zweimal mit 100 % Ethanol gespült und zur vollständigen Entwässerung 3 min in 100 % Ethanol inkubiert. Nach dreimaligen Spülen mit 100 % Xylol wurden die Schnitte mit Entellan versiegelt.

### 2.19.3 Immunhistochemische Untersuchung von Gewebeschnitten

Für bessere Interaktion mit dem Primärantikörpern wurden die Epitope mittels Dampfgerar (FS 20 R Multi Gourmet, Type 3216, Braun, Kronberg/Taunus) und Citratpuffer (DAKO, Hamburg) zugänglich gemacht (1 h Inkubation). Nach 20-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur im Citratpuffer, wurden die Schnitte für mindestens eine Stunde mit „Protein block“ (DAKO, Hamburg) blockiert, anschließend 3x 5 min mit PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und 3 h mit Primärantikörper ( $\gamma$ H2AX, 1:500 in PBS + 0,2 % Triton-X100) bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden dann erneut 3x 5 min mit PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und anschließend 2 h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper (Alexa488 goat anti rabbit, 1:500 in PBS + 0,2 % Triton-X100) unter Lichtausschluss inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellkerne mit To-pro3 angefärbt (1:1000 in PBS, 30 min) und nach einem weiteren Waschschrift mit Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) konserviert, eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Zum Auswerten wurde ein Zeiss LSM 700 Laser Scanning

Mikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen) benutzt und die dazugehörige Software ZEN 2010.

### **2.20 Immunhistochemische Untersuchungen an Zellen**

Für die Anfärbung von  $\gamma$ H2AX Foci wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für mindestens 20 min in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Methanol fixiert. Die Proteine wurden anschließend mit 5 % BSA in PBS + 0,3 % Triton X-100 (PBST) für mindestens eine Stunde geblockt. Nach Entfernung der Blockierlösung wurde der  $\gamma$ H2AX Primärantikörper auf die Zellen gegeben (über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1:500 in PBST). Am nächsten Tag folgten Waschschritte mit PBS, PBS mit erhöhtem Salzgehalt (0,4 M NaCl) und PBST. Der Sekundärantikörper (AlexaFluor488 goat anti-mouse / anti-rabbit) wurde 1:500 in PBST auf die Zellen gegeben und die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 2 h unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS und PBST gewaschen, mit Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenz wurde durch eine Quecksilberdampfampe angeregt und mittels Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 50, Olympus, Hamburg) und „Colorview soft imaging System“ Kamera detektiert.

### **2.21 Zelltod Bestimmung**

#### **2.21.1 WST-1-Assay**

Die Vitalität der Zellen wurde mittels WST1- Assay (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, Mannheim) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierbei wird die enzymatische Umsetzung des Tetrazoliumsalses in Formazan spektrometrisch detektiert, was als Nachweis für eine intakte Atmungskette gilt (Peskin und Winterbourn, 2000).

#### **2.21.2 TUNEL-Assay**

TUNEL-positive Zellen wurden mittels „In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ (Roche, Mannheim) nach Herstellerprotokoll detektiert. Der TUNEL-Assay wird für den Nachweis von apoptotischen Zellen verwendet (Gavrieli et al., 1992). Während

der Apoptose wird die DNA durch Endonukleasen in ca. 180 bp lange Stücke geschnitten. Die offenen 3'OH-Enden dieser Bruchstücke werden durch die Desoxyribonukleotidyltransferase mit Fluorescein-dUTP markiert. Die Fluoreszenzintensität des Fluoresceins wurde mittels Zeiss LSM 700 Laser Scanning Mikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen) detektiert.

### **2.22 Statistische Auswertung**

Für Datensätze, die die Kriterien des Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung erfüllten, wurde für die statistische Analyse der parametrische Student T-test verwendet. Wurden die Kriterien des Tests auf Normalverteilung nicht erfüllt, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde mit einem Asterisk (\*) oder einer Raute (#) dargestellt. Ab einer Zufallswahrscheinlichkeit von  $\leq 5\%$  wurde der Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen als signifikant angesehen ( $p \leq 0,05$ ; \* / #), ab einer Wahrscheinlichkeit von  $\leq 1\%$  als hoch signifikant ( $p \leq 0,01$ ; \*\* / ##) und ab  $\leq 0,1\%$  als höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ; \*\*\* / ###).

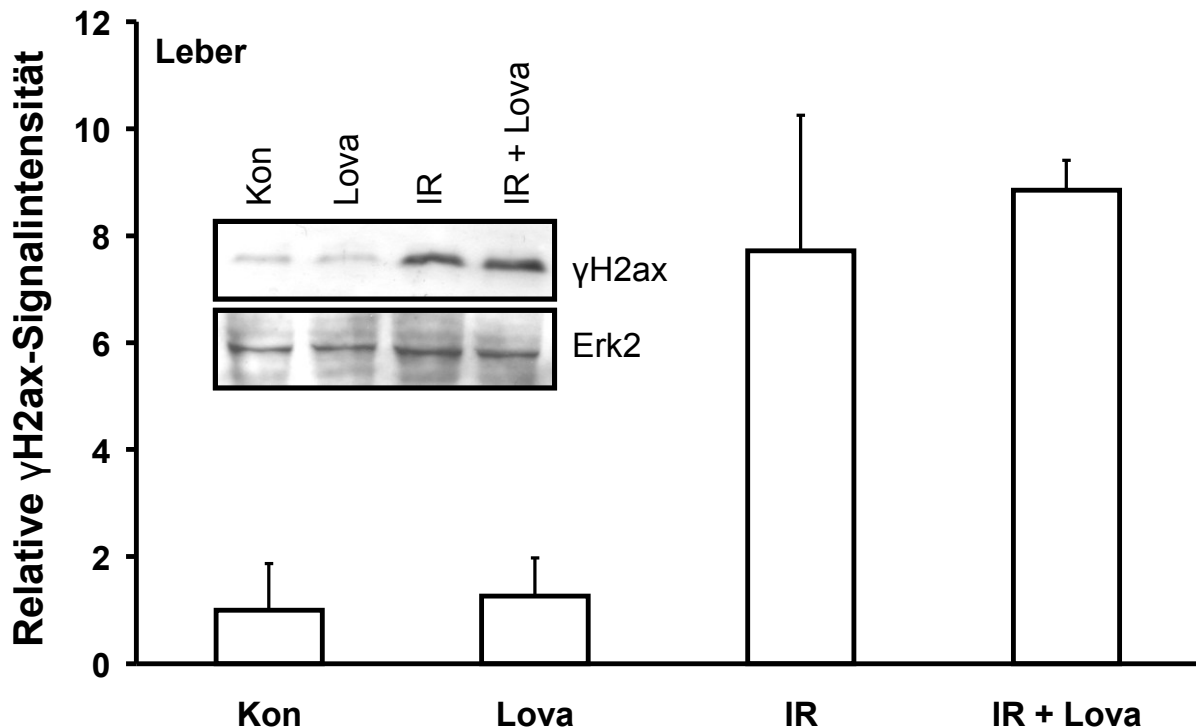
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung der Auswirkung einer Lovastatinvorbehandlung auf akute Strahlenantworten

Lovastatin-vorbehandelte primäre humane Endothelzellen (HUVEC) werden zu einem gewissen Maße vor der Toxizität von ionisierender Strahlung geschützt (Nubel et al., 2006). Um diesen protektiven Statineffekt *in vivo* zu untersuchen, wurden 10-12 Wochen alte BALB/c-Mäuse als Modellorganismus benutzt. Die Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Lovastatin vorbehandelt [10 mg x kg<sup>-1</sup>, p.o.] und am dritten Tag einer Dosis von 6 Gy Ganzkörperbestrahlung („total body irradiation“, TBI) ausgesetzt. 4 h bzw. 24 h nach der Bestrahlung wurden die in Material und Methoden beschriebenen Analysen durchgeführt.

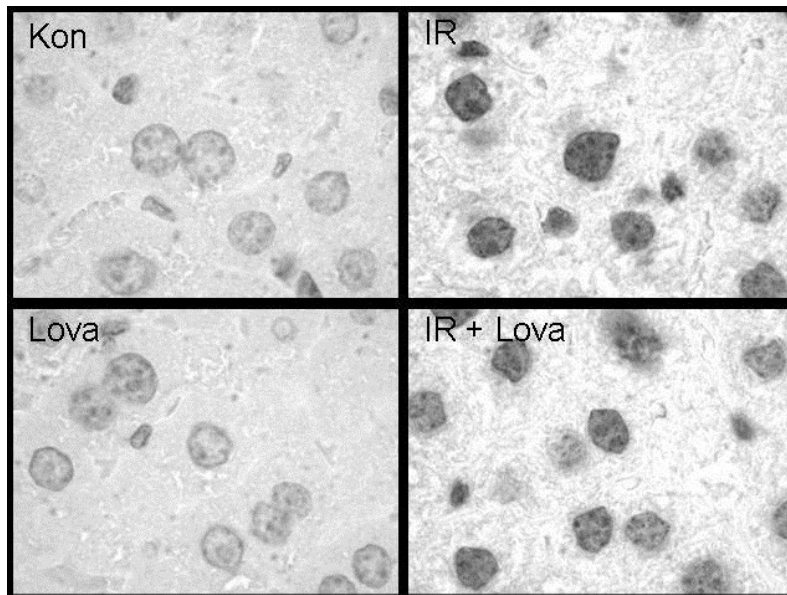
An Serin 139 phosphoryliertes Histon H2ax ( $\gamma$ H2ax) gilt als Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche (Olive, 2004). Zunächst wurde analysiert, ob Lovastatin *in vivo* einen Einfluss auf die IR-induzierte Phosphorylierung von H2ax hat. Dafür wurden 4 h nach der TBI aus der Leber der Tiere Gesamtzellproteinextrakte isoliert und der relative Gehalt an phosphoryliertem H2ax mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 7). 4 h nach der TBI war ein ca. achtfacher Anstieg des  $\gamma$ H2ax-Proteinspiegels zu sehen. Die Statinvorbehandlung hatte keinen Einfluss auf diesen Anstieg.

## Ergebnisse



**Abbildung 7: Bestimmung der  $\gamma$ H2ax Signalintensität in Gesamtproteinextrakten der Leber mittels Western Blot Analyse, 4 h nach TBI.** Der Gehalt an  $\gamma$ H2ax in Gesamtzell-extrakten aus Lebern wurde mittels Western Blot bestimmt. Das Bild zeigt einen repräsentativen  $\gamma$ H2ax Western Blot und das Referenzprotein Erk2. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung aus der Quantifizierung der normalisierten  $\gamma$ H2ax-Proteinspiegel ( $n = 3$ ). Die Menge an phosphoryliertem H2ax in der unbehandelten Kontrolle wurde gleich 1,0 gesetzt. Kon. Kontrolltiere; Lova, mit Lovastatin vorbehandelte Tiere, IR, bestrahlte Tiere; IR + Lova, mit Lovastatin vorbehandelte und bestrahlte Tiere

Um dieses Ergebnis zu verifizieren wurde 4 h nach Bestrahlung die Menge des phosphorylierten H2ax in Lebergewebeschnitten mittels Immunfärbung analysiert. Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, wurde auch mit der immunhistologischen Methode kein Unterschied zwischen der bestrahlten und der mit dem Statin kobehandelten Gruppe detektiert. Lovastatin hatte *in vivo* unter den experimentellen Bedingungen somit keinen Einfluss auf die Menge an strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in der Leber.



**Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung von  $\gamma$ H2ax in Gewebeschnitten von 4 h nach TBI entnommenen Lebern.** Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin angefärbt (hellgrau). Phosphoryliertes H2ax wurde immunhistochemisch angefärbt (dunkelgrau bis schwarz). Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen.

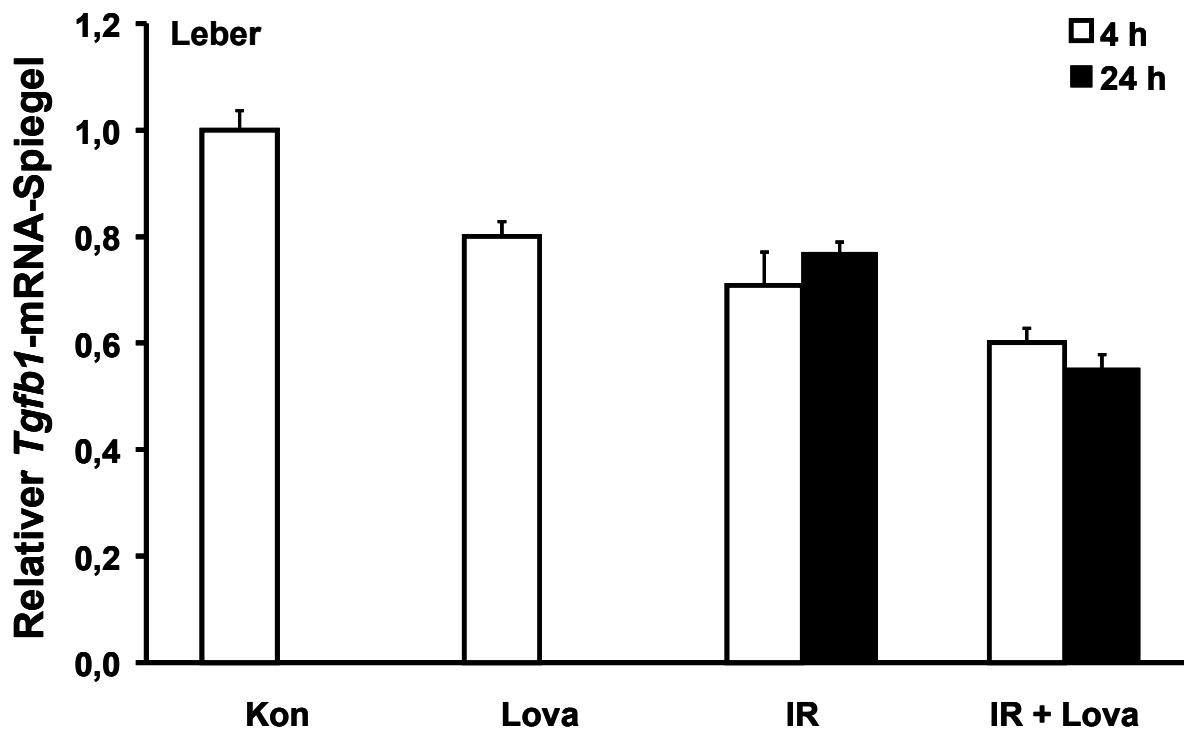
Um die Wirkung von Lovastatin auf die Strahlenantwort oder Strahlensensitivität verschiedener Organe zu untersuchen, wurde RNA aus Leber, Darm und Lunge isoliert und Endpunkt-RT-PCR- sowie Real-Time-RT-PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei wurden die mRNA-Spiegel solcher Gene bestimmt, deren Produkte mit proinflammatorischen oder profibrotischen Prozessen assoziiert sind. Inflammatorische Zellantworten auf Bestrahlung lassen sich unter anderem durch Bestimmung der Expression von *Tnf* („Tumor Necrosis Factor“), *Il1a* (Interleukin 1 alpha), *Il6* (Interleukin 6) und *Il10* (Interleukin 10) detektieren. Diese Gene kodieren für zu den Peptidhormonen zählende Zytokine. Sie sind unter anderem an der Immunreaktion nach Bestrahlung beteiligt (Neta, 1997). Im Zuge dessen vermitteln sie die interne Kommunikation zwischen Leukozyten und agieren extern als Botenstoffe für verschiedenste Körperzellen. Unter den untersuchten Genen kodiert *Il10* für das einzige hier untersuchte Zytokin mit antiinflammatorischem Charakter (Opal und DePalo, 2000). Für *Il6* werden sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Effekte beschrieben. Es bewirkt vor allem in der Leber eine Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen (Kishimoto, 1989). *Tnf* sowie *Il1a* kodieren für proinflammatorische Zytokine (Blackwell und Christman, 1996).

Profibrotische Zellantworten auf Bestrahlung lassen sich unter anderem über den Fibrosesurrogatmarker *Tgfb1* („Tumor growth Factor beta 1“) und seinem

## Ergebnisse

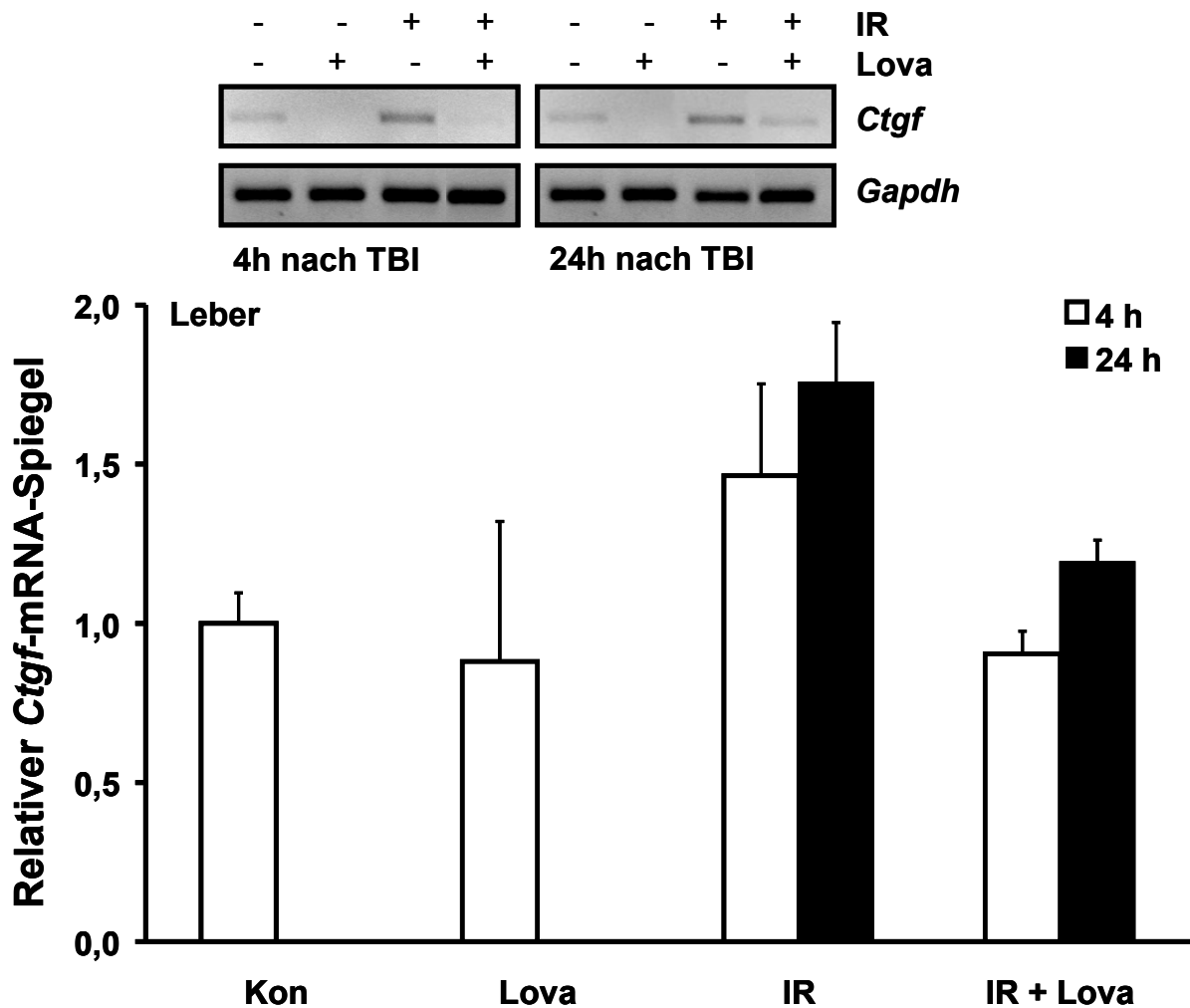
nachgeschalteten Effektor *Ctgf* („Connective Tissue growth Factor“) detektieren (Haydont et al., 2005; Vozenin-Brotons et al., 2003). Ein weiterer Hinweis auf beginnende fibroseassoziierte Ereignisse ist die vermehrte Expression und die Veränderung der relativen Verhältnisse zwischen verschiedenen Collagentypen, wie *Col1a1* („Collagen, Type 1, alpha 1“) und *Col3a1* („Collagen, Type 3, alpha 1“) (Bourgier et al., 2005; Vozenin-Brotons et al., 2003).

Die mRNA-Spiegel von *Tgfb1* (Abbildung 9) sowie *Ctgf* (Abbildung 10) in der Leber der Tiere wurden mittels Endpunkt-RT-PCR- und Real-Time-RT-PCR-Analyse bestimmt. Die Bestrahlung führte in den Lebern zu einer leichten Reduktion des *Tgfb1*-mRNA-Spiegels relativ zur Kontrollgruppe. Die Kobehandlung mit dem Statin hatte keinen Einfluss auf die *Tgfb1*-mRNA-Menge nach Strahlungsexposition. Es wurde ein leichter Anstieg der *Ctgf*-mRNA-Menge nach 4 h und eine stärkere Zunahme nach 24 h detektiert. In beiden Fällen führte die Statinvorbehandlung zu einer Verringerung des *Ctgf*-mRNA-Spiegels auf Kontrollniveau (Abbildung 10).



**Abbildung 9: Real-Time-RT-PCR-Analyse des *Tgfb1*-mRNA-Spiegels in der Leber, 4 h und 24 h nach TBI.** Die mRNA von jeweils drei Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der *Tgfb1*-mRNA-Menge relativ zur Kontrolle (n = 3).

## Ergebnisse



**Abbildung 10: Endpunkt-RT-PCR- und Real-Time-RT-PCR-Analyse des *Ctgf*-mRNA-Spiegels in Lebern, 4 h und 24 h nach TBI.** Die mRNA von jeweils drei Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Endpunkt-RT-PCR (Bild), sowie Real-Time-RT-PCR (Säulendiagramm) analysiert. Gezeigt ist jeweils das Foto eines repräsentativen, mit Ethidiumbromid angefärbten, Agarosegels mit *Gapdh* als Referenzgen sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der *Ctgf*-mRNA-Menge relativ zur Kontrolle (Real-Time-RT-PCR, n = 3).

Im Folgenden wurden die mRNA-Spiegel der oben genannten Zielgene auch in Darm und Lunge mittels Real-Time-RT-PCR analysiert (Abbildung 11). Im Gegensatz zur Leber wurde im Darm eine Induktion des *Tgfb1*-mRNA-Spiegels durch Bestrahlung beobachtet, welcher durch die Kobehandlung mit Lovastatin gesenkt wurde. Dies galt sowohl für die 4 h nach Bestrahlung, als auch für die 24 h nach Bestrahlung analysierten Organe. Den gleichen Effekt konnte man bei der Analyse des *Ctgf*-mRNA-Gehalts beobachten (Abbildung 12).

## Ergebnisse

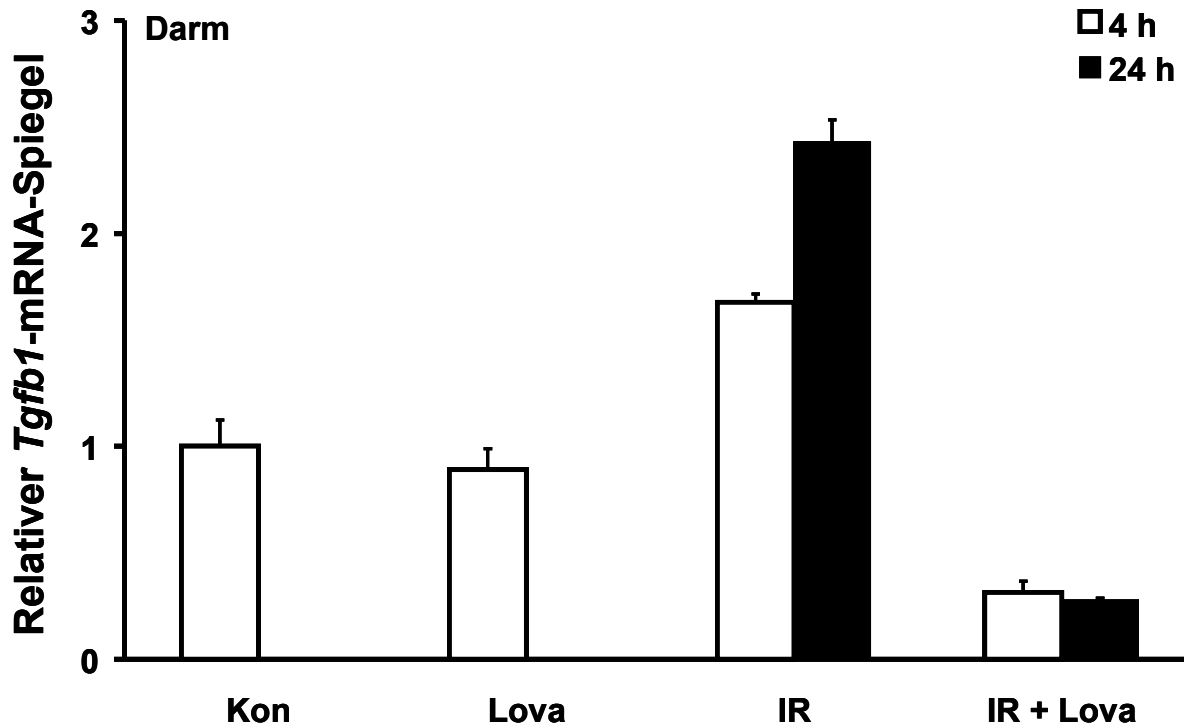


Abbildung 11: Real-Time-RT-PCR Analyse des *Tgfb1*-mRNA-Spiegels im Darm, 4 h und 24 h nach TBI. Die mRNA von jeweils drei Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt, und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der *Tgfb1*-mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

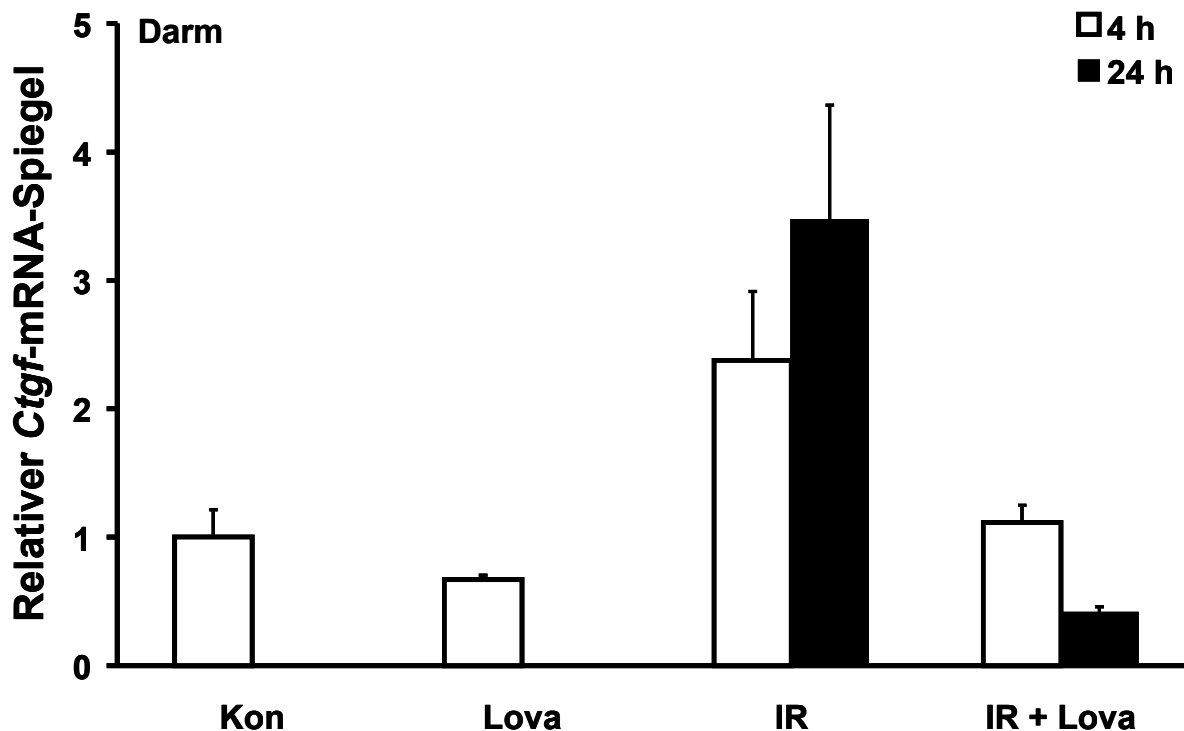


Abbildung 12: Real-Time-RT-PCR-Analyse des *Ctgf*-mRNA-Spiegels im Darm, 4 h und 24 h nach TBI. Die mRNA von jeweils drei Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der *Ctgf*-mRNA-Menge relativ zur Kontrolle (n = 3).

## Ergebnisse

Die Lunge war in Bezug auf die analysierten Parameter gänzlich unauffällig. Sowohl die Bestrahlung, als auch die Behandlung mit dem Statin beeinflusste die mRNA-Spiegel der untersuchten Gene nicht. Die Ergebnisse der Real-Time-RT-PCR-Untersuchungen der oben genannten Gene sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Real-Time-RT-PCR-Ergebnisse von den analysierten Organen mit und ohne Lovastatin-Vorbehandlung, 4 h und 24 h nach TBI.** Die mRNA von jeweils drei Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. O, keine mRNA-Spiegel Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe / im Vergleich zur bestrahlten Gruppe; ▲, höherer mRNA-Spiegel als in der Kontrollgruppe / als in der bestrahlten Gruppe; ▼, niedrigerer mRNA-Spiegel als in der Kontrollgruppe / als in der bestrahlten Gruppe; nd, nicht durchgeführt; n = 3

Marker Gen	Leber		Lunge		Darm	
	Einfl. von IR	Einfl. von Lova auf IR	Einfl. von IR	Einfl. von Lova auf IR	Einfl. von IR	Einfl. von Lova auf IR
<i>Ctgf</i>	▲	▼	O	O	▲	▼
<i>Tgfb1</i>	O	O	O	O	▲	▼
<i>Tnf</i>	▲	▼	O	O	O	O
<i>Il1a</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Il6</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Il10</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Col1a1</i>	O	O	O	O	nd	nd
<i>Col3a1</i>	O	O	O	O	nd	nd

### 3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Lovastatin auf akute Strahlenwirkungen

Strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche in der Leber wurden durch die Statinbehandlung nicht beeinflusst. In Hinblick auf Fibrosemarker wurden auf mRNA-Ebene in Leber und Darm mildernde Effekte durch Lovastatin beobachtet. Die Lunge war in Bezug auf die untersuchten Parameter unauffällig.

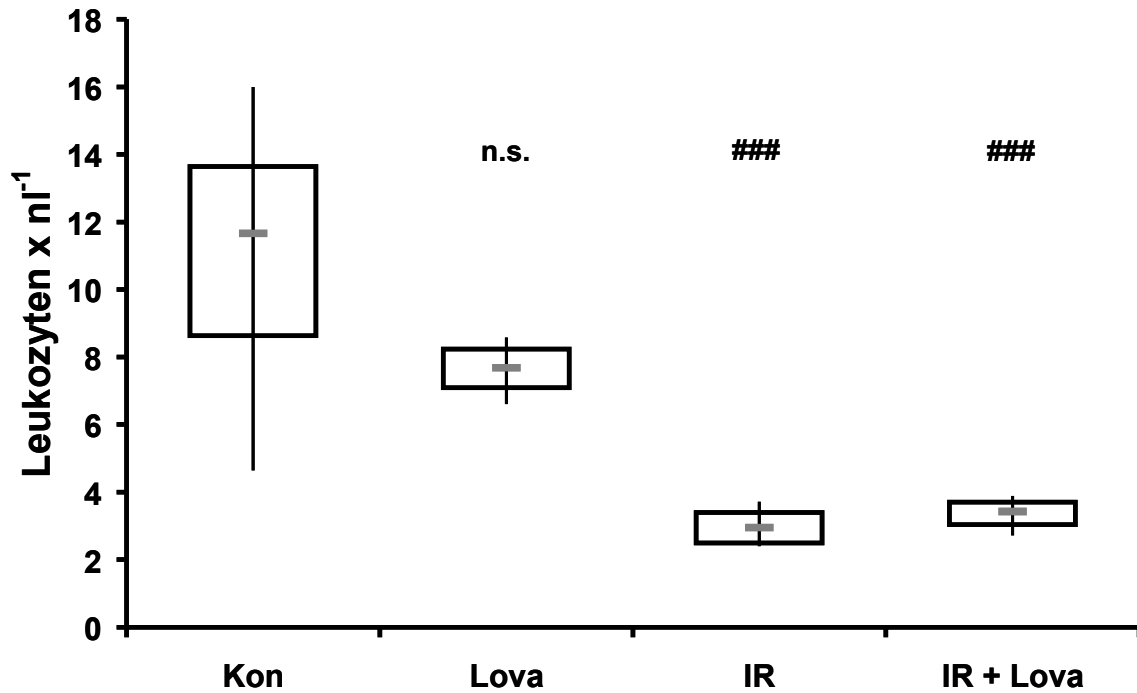
### **3.3 Untersuchung der Auswirkung einer Lovastatinbehandlung auf subakute Strahlenantworten**

Um die Effekte von Lovastatin auf subakute Strahlenantworten zu untersuchen wurden BALB/c-Mäuse wie in Material und Methoden beschrieben zweimal mit 2,5 Gy bestrahlt. 21 Tage nach der ersten Bestrahlung wurden die Analysen durchgeführt. Die mit dem Statin kobehandelte Gruppe wurde 48 h und 24 h vor der ersten TBI mit Lovastatin vorbehandelt ( $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ , p.o.), welches anschließend dreimal pro Woche verabreicht wurde ( $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ , p.o.). Am Ende des Versuchs (zwei Wochen nach der zweiten Bestrahlung) wurden Blutproben und Organe entnommen sowie RNA aus den Organen isoliert.

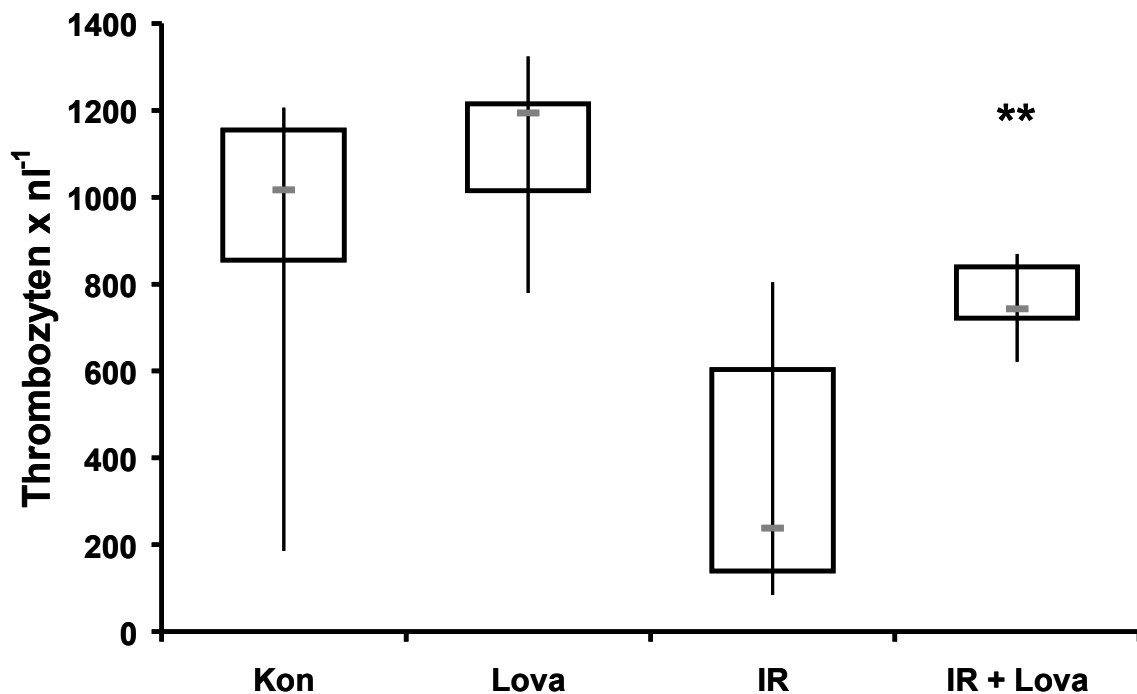
In Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz wurde EDTA-Blut sowie Blutserum untersucht. Dafür wurde den Tieren am Versuchsende Blut aus dem Herzen entnommen (zwei Wochen nach der zweiten TBI) und ein großes Blutbild inklusive Differentialblutbild der Leukozyten mit einem ADVIA 120 Hämatologie System (Siemens, Deutschland) erstellt. Das Blutserum wurde mittels eines Architect C8000 Systems (Abbot, UK) auf Konzentrationen von Leber- und Nierenenzymen untersucht, die als Indikatoren für Hepato- bzw. Nephrotoxizität gelten.

Von ionisierender Strahlung ist bekannt, dass sie sich negativ auf die Neubildung von Leukozyten auswirken kann (O'Toole und Unsgaard, 1979). Thrombozytenzahlen können je nach betrachtetem Zeitpunkt nach der Bestrahlung sowohl erhöht, als auch erniedrigt sein (Tanum, 1984). Wie in Abbildung 13 dargestellt, führte die TBI zu einer Verminderung der Leukozytenzahl, die jedoch nicht von der Lovastatin-Kobehandlung beeinflusst wurde. Die Thrombozytenzahl im Blut der bestrahlten Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verringert. Hier führte die Kobehandlung mit dem Statin zu einer dem Kontrollniveau ähnlichen Thrombozytenzahl (Abbildung 14). Die Behandlung mit Lovastatin verhinderte somit eine IR-induzierte Abnahme der Thrombozytenzahlen, jedoch nicht der Leukozytenzahlen, im Blut.

## Ergebnisse



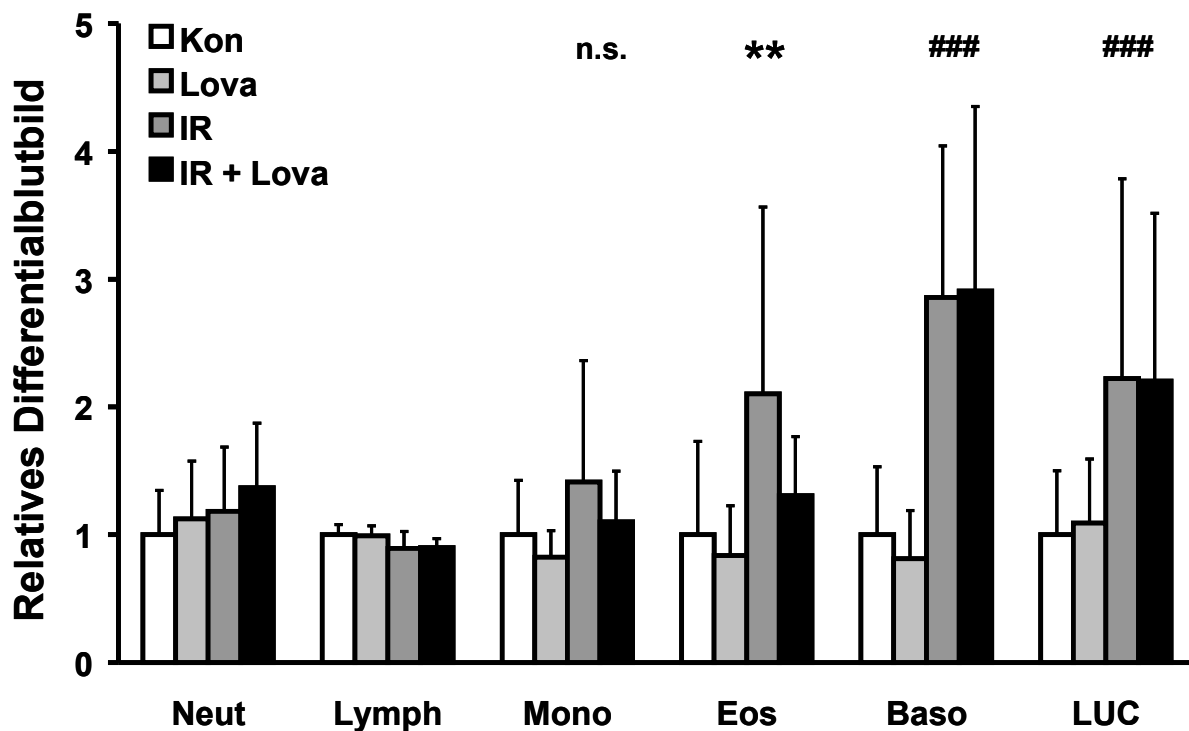
**Abbildung 13: Leukozytenzahl im EDTA-Blut von BALB/c-Mäusen, 14 Tage nach der zweiten TBI.** Das Blut wurde mittels Punktion aus dem Herzen entnommen und mit EDTA gemischt, um die Gerinnung zu verhindern. Die Blutproben wurden mittels ADVIA 120 Hämatologie System gemessen (n = 4-6). Die grauen Balken geben den Median an, die Kästen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil, die senkrechten Linien repräsentieren Maximum und Minimum. n.s., nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe (Kon); ###, höchst signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe (Kon) ( $p \leq 0,001$ )



**Abbildung 14: Thrombozytenzahl im EDTA-Blut von BALB/c-Mäusen, 14 Tage nach der zweiten TBI.** Das Blut wurde mittels Punktion aus dem Herzen entnommen und mit EDTA gemischt, um die Gerinnung zu verhindern. Die Blutproben wurden mittels ADVIA 120 Hämatologie System gemessen (n = 4-6). Die grauen Balken geben den Median an, die Kästen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil, die senkrechten Linien repräsentieren Maximum und Minimum. \*\*, hoch signifikant unterschiedlich zur bestrahlten Gruppe (IR) ( $p \leq 0,01$ )

## Ergebnisse

Das Differentialblutbild der Leukozyten zeigte, dass das Blut der bestrahlten Tiere, im Vergleich zu dem der unbehandelten Kontrolltiere, einen durchschnittlich zwei- bis dreifach erhöhten Anteil an eosinophilen (Eos) und basophilen Granulozyten (Baso) besaß und einen durchschnittlich zweifach erhöhten Anteil an großen, ungefärbten Zellen (LUC, „large unstained cells“) (Abbildung 15). Der strahleninduzierte Anstieg in der Fraktion eosinophiler Granulozyten wurde durch die Statinkobehandlung signifikant auf das Niveau in der Kontrollgruppe reduziert. Auf den Anstieg von LUC und basophilen Granulozyten hatte die Statinbehandlung jedoch keinen Einfluss. Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Neut), Lymphozyten (Lymph) und Monozyten (Mono) wurden durch die Bestrahlung nicht beeinflusst.



**Abbildung 15: Relatives Differentialblutbild von BALB/c-Mäusen, 14 Tage nach der zweiten TBI.** Das Blut wurde mittels Punktion aus dem Herzen entnommen und mit EDTA gemischt, um die Gerinnung zu verhindern. Die Blutproben wurden mittels ADVIA 120 Hämatologie System gemessen (n = 4-6). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen relativ zur unbehandelten Kontrollgruppe. Neut, neutrophile Granulozyten; Lymph, Lymphozyten; Mono, Monozyten; Eos, eosinophile Granulozyten; Baso, basophile Granulozyten; LUC, große, ungefärbte Zellen („large unstained cells“); n.s., kein signifikanter Unterschied zwischen IR-Gruppe und IR + Lova-Gruppe; \*\*, hoch signifikanter Unterschied zwischen der IR-Gruppe und IR + Lova-Gruppe ( $p \leq 0,01$ ); ###, höchst signifikanter Unterschied zur Kon-Gruppe ( $p \leq 0,001$ )

Weitere standardmäßig im großen Blutbild bestimmte Parameter, wie die Anzahl an Erythrozyten oder der Hämatokritwert waren in jeder der Gruppen im Vergleich zur

## Ergebnisse

Kontrollgruppe unauffällig. Das Ergebnis aller bestimmten Blutparameter ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

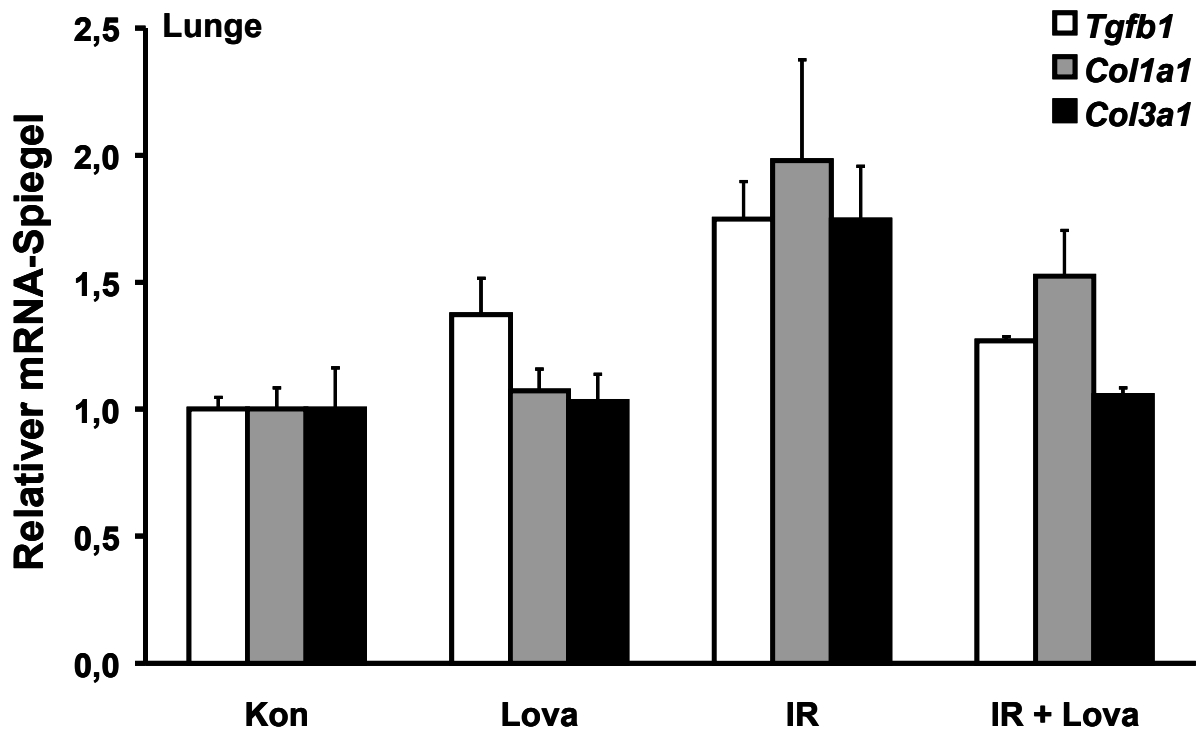
**Tabelle 8: Übersicht über die gemessenen Blutparameter aus dem großen Blutbild, 14 Tage nach der zweiten TBI.** ○, kein Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe; ▲, erhöhter Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe / zur nur bestrahlten Gruppe; ▼, verringerter Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe / zur nur bestrahlten Gruppe; WBC, Leukozyten; RBC, Erythrozyten; HGB, Hämoglobin; HCT, Hämatokrit; MCV, mittleres Erythrozytenvolumen; MCH, mittleres korpuskuläres Hämoglobin; MCHC, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration; CHCM, mittlere Gesamthämoglobinkonzentration; CH, Korpuskulärer Hämoglobingehalt; RDW, Erythrozytenverteilungsbreite; HDW, Hämoglobinverteilungsbreite; PLT, Thrombozyten; MPV, mittleres Thrombozyten Volumen

Parameter	Einfluss von Lova	Einfluss von IR	Einfluss von Lova auf IR
WBC	○	▼	○
RBC	○	○	○
HGB	○	○	○
HCT	○	○	○
MCV	○	○	○
MCH	○	○	○
MCHC	○	○	○
CHCM	○	○	○
CH	○	○	○
RDW	○	○	○
HDW	○	○	○
PLT	○	▼	▲
MPV	○	○	○

Analog zu dem Experiment, in dem die Effekte akuter Strahlenexposition untersucht wurden, wurden auch im Versuch mit fraktionierter Bestrahlung die oben erwähnten Surrogatmarker für Inflammation und Fibrose mittels Real-Time-RT-PCR-Analyse in Leber, Darm und Lunge untersucht. In der Leber und im Darm waren sämtliche detektierte mRNA-Spiegel der untersuchten Inflammations- und Fibrosesurrogatmarker unauffällig (Tabelle 9). In der Lunge war die mRNA-Expression von *Tgfb1*, *Col1a1* und *Col3a1* (Abbildung 16), sowie von *Il6* (Abbildung 17) im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Diese Hochregulationen wurden in jedem Fall durch die Kobehandlung mit dem Statin abgemildert. Die Menge an *Ctgf*-, *Tnf*-, *Il1a*-

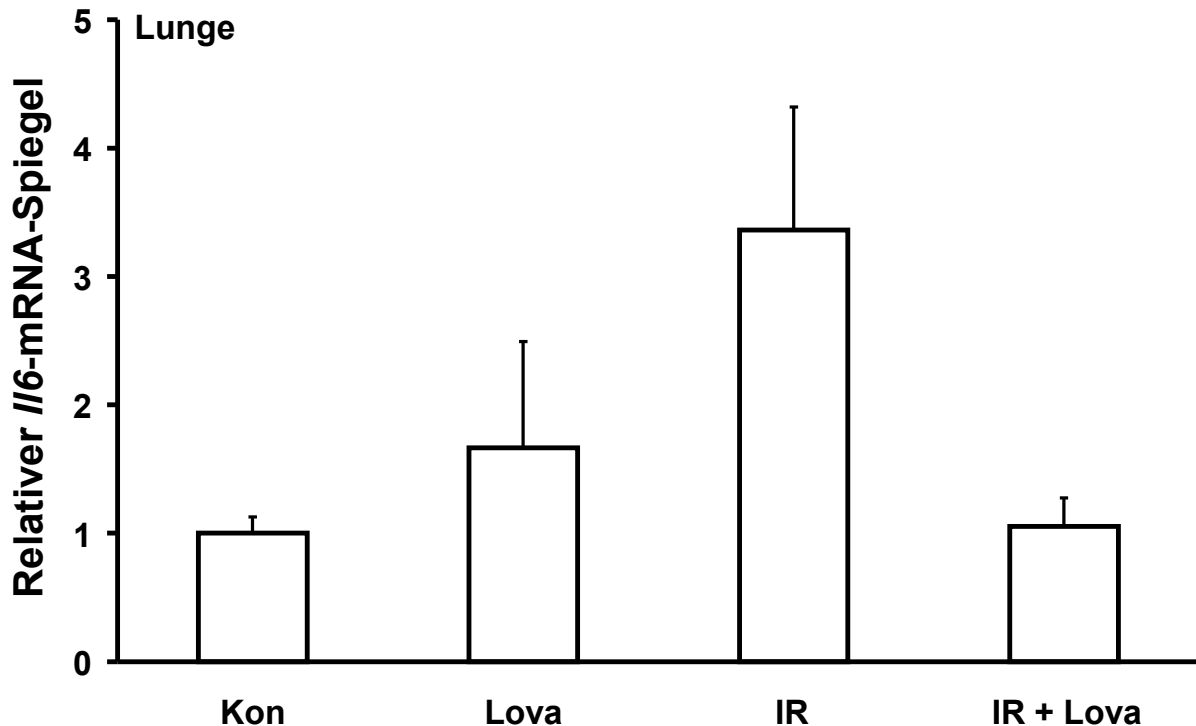
## Ergebnisse

und *Il10*-mRNA war in den Lungen der bestrahlten Tiere im Vergleich zu denen aus der unbestrahlten Kontrollgruppe unverändert (Tabelle 9).



**Abbildung 16: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von mit Fibrose assoziierten Genen in der Lunge, 14 Tage nach der zweiten TBI.** Die mRNA von jeweils 3-6 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

## Ergebnisse



**Abbildung 17: Real-Time-RT-PCR-Analyse des I/6-mRNA-Spiegels in Lungenextrakten, 14 Tage nach der ersten TBI.** Die mRNA von jeweils 3-6 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der I/6-mRNA-Menge relativ zur Kontrolle (n = 3).

**Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Real-Time-RT-PCR-Ergebnisse von den bestrahlten Organen mit und ohne Lovastatin-Kobehandlung, 14 Tage nach der zweiten TBI.** Die mRNA von jeweils drei Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. O, keine mRNA-Spiegel Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe / im Vergleich zur bestrahlten Gruppe; ▲, höherer mRNA-Spiegel als in der Kontrollgruppe / als in der bestrahlten Gruppe; ▼, niedrigerer mRNA-Spiegel als in der Kontrollgruppe / als in der bestrahlten Gruppe; n = 3

Marker Gen	Leber		Lunge		Darm	
	Einfl. von IR	Einfl. von Lova auf IR	Einfl. von IR	Einfl. von Lova auf IR	Einfl. von IR	Einfl. von Lova auf IR
	<i>Ctgf</i>	O	O	O	O	O
<i>Tgfb1</i>	O	O	▲	▼	O	O
<i>Tnf</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Il1a</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Il6</i>	O	O	▲	▼	O	O
<i>Il10</i>	O	O	O	O	O	O
<i>Col1a1</i>	O	O	▲	▼	O	O
<i>Col3a1</i>	O	O	▲	▼	O	O

### **3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Lovastatin auf subakute Strahlenwirkungen**

Die Leber und der Darm zeigten 14 Tage nach der zweiten Strahlungsdosis ein unauffälliges Expressionsmuster bezüglich der exemplarisch analysierten proinflammatorischen und profibrotischen Marker. In der Lunge wurde auf mRNA-Ebene nach Bestrahlung ein Anstieg von molekularen Fibrose- und Inflammationssurrogatmarkern beobachtet. Die Kobehandlung mit Lovastatin reduzierte diesen erhöhten Gehalt. Zudem verhinderte die Kobehandlung die strahleninduzierte Abnahme der Thrombozytenzahl, aber nicht der Leukozytenzahl, im Blut. Im Differentialblutbild hatte die Bestrahlung eine Erhöhung verschiedener Granulozyten und großer, ungefärbter Zellen (LUC) zur Folge. Die Lovastatin-Kobehandlung hatte nur beim IR-induzierten Anstieg von eosinophilen Granulozyten einen protektiven Effekt. Insgesamt zeigte sich ein selektiver und organspezifischer Schutzeffekt der Statinbehandlung vor IR-induzierter Normalgewebstoxizität.

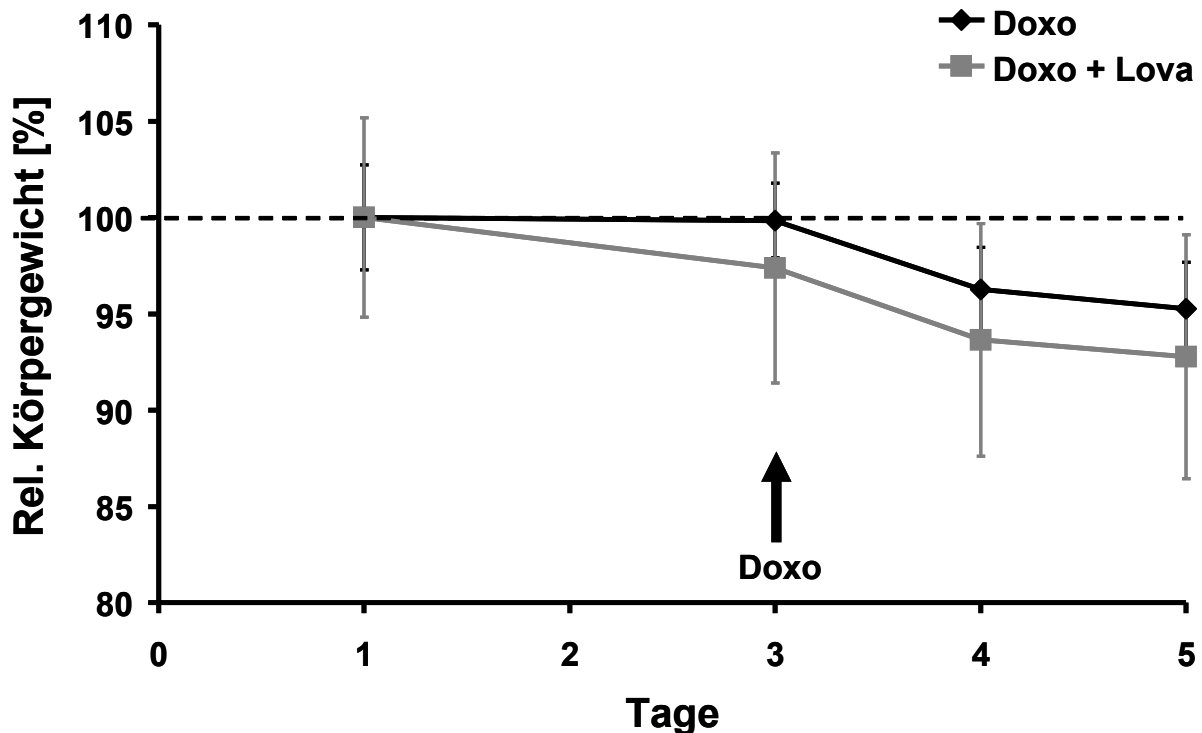
### **3.5 Untersuchung der Auswirkung einer Lovastatinvorbehandlung auf akute Doxorubicintoxizität**

Aus Experimenten mit primären humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) ist bekannt, dass Lovastatin nicht nur vor strahleninduzierter, sondern auch vor Doxorubicin-induzierter Zytotoxizität schützen kann (Damrot et al., 2006). Bei Patienten die eine Doxorubicin-Chemotherapie erhalten, sind die dosislimitierenden Faktoren Knochenmarksdepression (Wang et al., 2006), Hepatotoxizität (Deepa und Varalakshmi, 2003; Saad et al., 2001) und im Besonderen Kardiotoxizität (Chlebowski, 1979; Zhang et al., 2009).

Um den von primären humanen Endothelzellen bekannten Schutzeffekt von Lovastatin vor Doxorubicintoxizität *in vivo* zu untersuchen, wurden 10-12 Wochen alte BALB/c-Mäuse als Modellorganismus benutzt. Die Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Lovastatin [10 mg x kg<sup>-1</sup>, p.o.] vobehandelt und bekamen am dritten Tag eine intraperitoneale Injektion mit Doxorubicin [10 mg x kg<sup>-1</sup>]. Am Tag darauf wurden die Tiere mit Lovastatin [10 mg x kg<sup>-1</sup>, p.o.] nachbehandelt und 24 h später die Analysen durchgeführt. Während des gesamten Experiments wurde das Gewicht der Tiere regelmäßig kontrolliert (Abbildung 18). In

## Ergebnisse

beiden Behandlungsgruppen führte die Doxorubicinbehandlung zu einer leichten Abnahme des Körpergewichts (~5 %) im Vergleich zum Startgewicht. Lovastatin hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Doxorubicin-induzierten Gewichtsverlust.



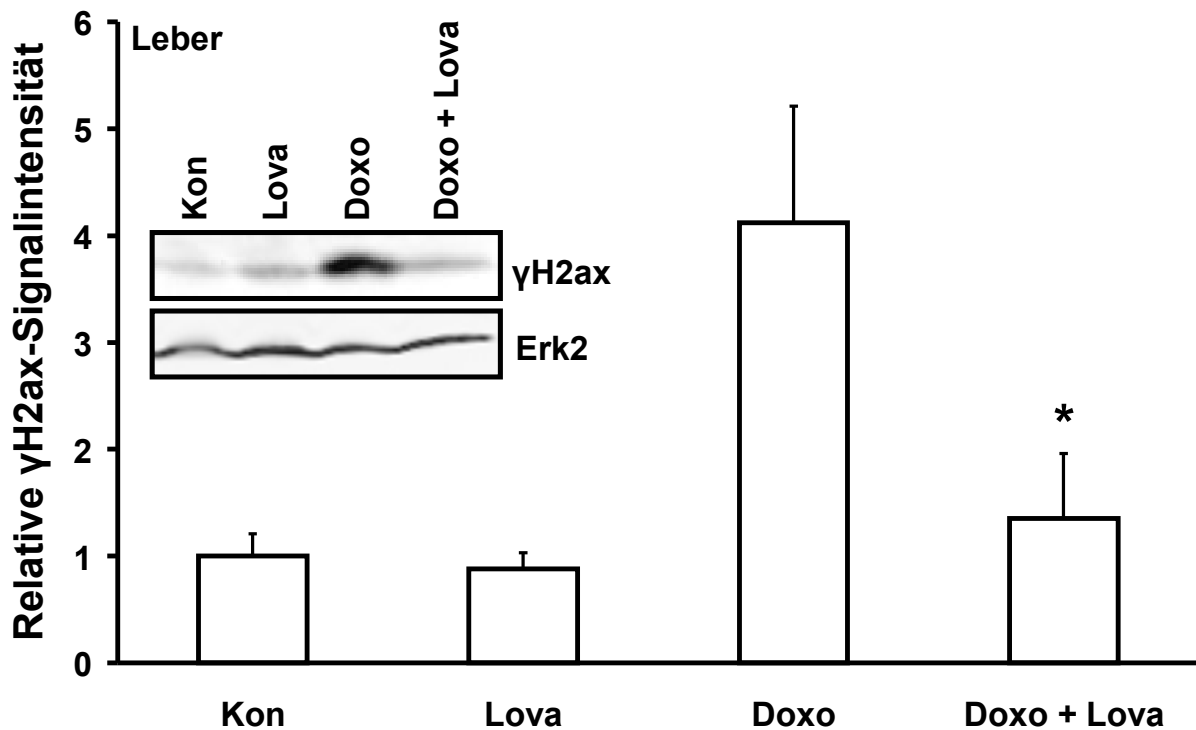
**Abbildung 18: Verlauf des Körpergewichts von Mäusen aus dem Kurzzeit-Doxorubicin-Versuch.** Die Mäuse wurden mittels einer Analysenwaage gewogen. Das mittlere Körpergewicht der jeweiligen Gruppe an Tag 1 wurde 100 % gesetzt (vor der ersten Lovastatinapplikation). An Tag 3 des Experiments wurden die Mäuse direkt vor der Doxorubicin-Injektion gewogen. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der Mausgewichte je Gruppe (n = 5).

Aus *in vitro* Versuchen mit primären humanen Endothelzellen (HUVEC) und Rattenkardiomyozyten (H9c2) ist bekannt, dass eine Statinvorbehandlung zu einer Verminderung von Doxorubicin-induziertem  $\gamma$ H2AX im Zellkern führt (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011). Da die Phosphorylierung von H2AX als Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche gilt (Harper und Elledge, 2007; Olive, 2004; Rothkamm et al., 2003), wird davon ausgegangen, dass Lovastatin primäre Zellen *in vitro* vor Doxorubicin-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen schützen kann.

Um die Übertragbarkeit auf ein *in vivo* System zu überprüfen wurden 48 h nach der Doxorubicininjektion Gesamtzellproteinextrakte aus Lebern und Herzen der BALB/c-Mäuse gewonnen. Die Menge an phosphoryliertem H2ax Protein wurde mittels Western Blot detektiert (Abbildung 19). Die Lovastatin-Kobehandlung führte zu einem

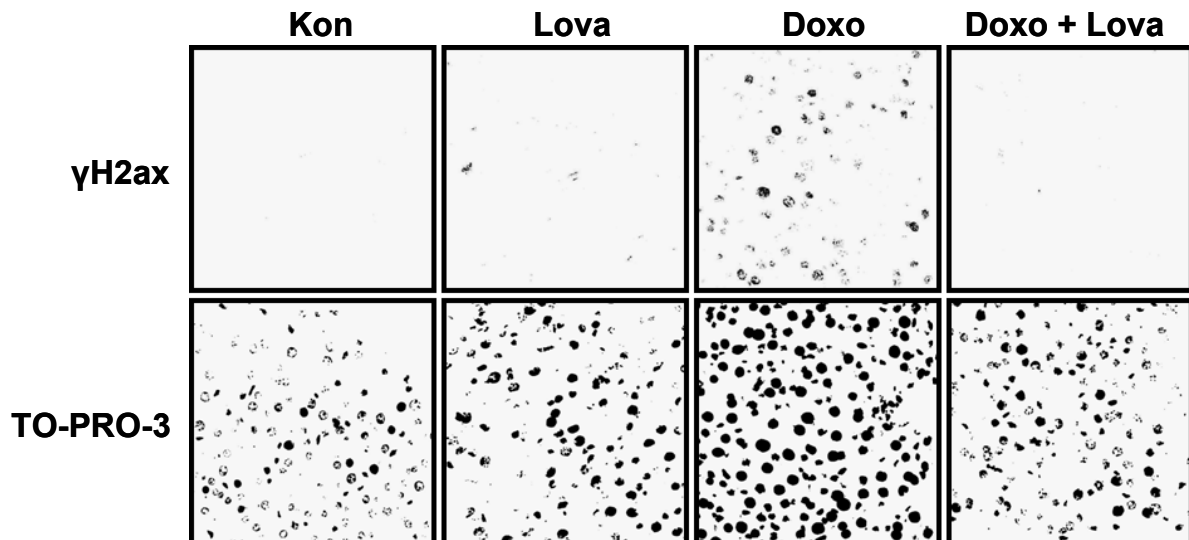
## Ergebnisse

signifikant geringeren Anstieg des  $\gamma$ H2ax-Spiegels in den Lebern der mit Doxorubicin behandelten Tiere. Die Phosphorylierung von H2ax wurde zudem an Leberschnitten mittels Immunfluoreszenz detektiert (Abbildung 20). Die Quantifizierung von  $\gamma$ H2ax-Foci in den Leberzellen bestätigte die Ergebnisse aus den Western Blot Analysen. Auch hier wurde 48 h nach Doxorubicinapplikation in Lebern von Lovastatinvorbehandelten Tieren eine geringere Menge von phosphoryliertem H2ax beobachtet, als in den Lebern von nicht vorbehandelten Tieren. In den Herzen konnte weder mittels Western Blot, noch Immunfluoreszenzanalyse eine Erhöhung des  $\gamma$ H2ax-Spiegels durch die Doxorubicinbehandlung detektiert werden.

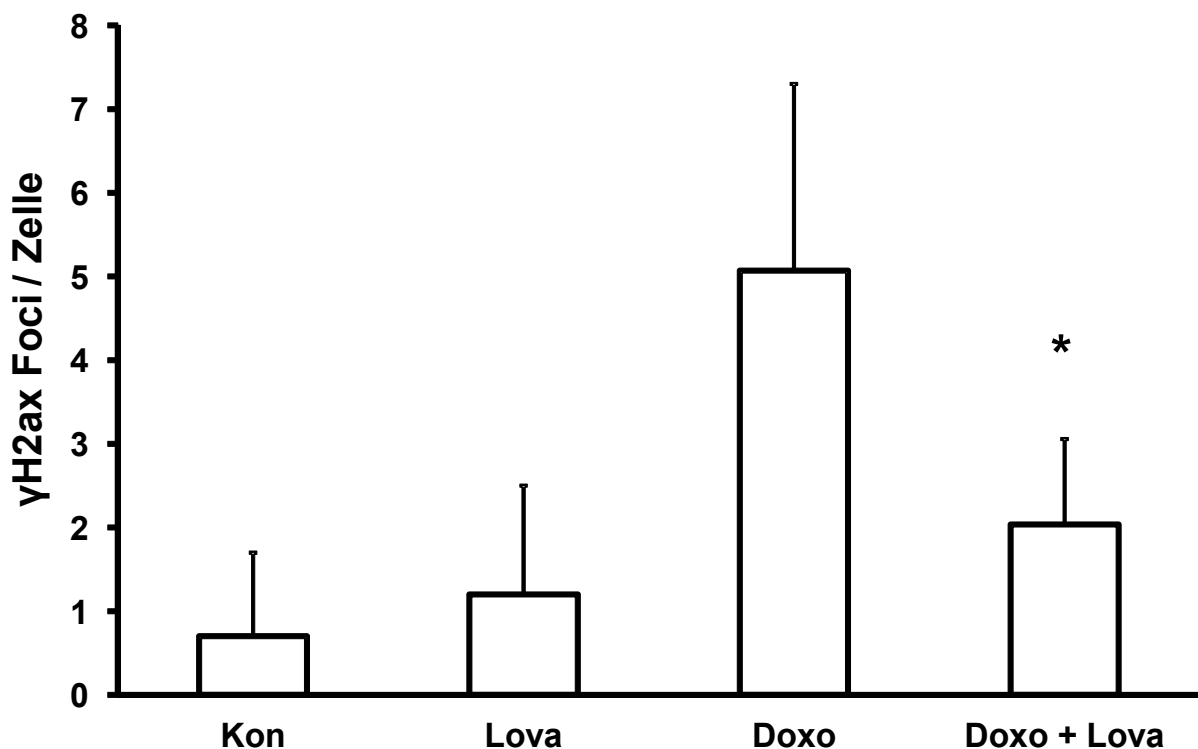


**Abbildung 19: Bestimmung der  $\gamma$ H2ax-Signalintensität in Gesamtproteinextrakten der Leber mittels Western Blot Analyse, 48 h nach Doxorubicinbehandlung.** Aus Lebern gewonnene Proteinextrakte wurden mittels Western Blot analysiert. Das Bild zeigt einen repräsentativen  $\gamma$ H2ax Western Blot und das Referenzprotein Erk2. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung aus der Quantifizierung der auf Erk2 normalisierten  $\gamma$ H2ax-Proteinspiegel ( $n = 3$ ); \*, signifikanter Unterschied zwischen der Doxorubicin-Gruppe (Doxo) und der kobehandelten Gruppe (Doxo + Lova) ( $p \leq 0,05$ )

## Ergebnisse



**Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von phosphoryliertem H2ax in Schnittpreparaten von Mauselebern, 48 h nach Doxorubicinbehandlung.** Abgebildet sind jeweils Ausschnitte von repräsentativen, FITC-angefärbten Schnitten, sowie die dazugehörigen Zellkernfärbungen (TO-PRO-3).



**Abbildung 21: Quantifizierung der γH2ax-Foci aus dem immunhistochemischen Nachweis in Schnittpreparaten von Mauselebern.** Es wurden Schnitte von jeweils drei Tieren fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet mit sechs betrachteten Arealen pro Schnitt. In jedem Areal wurden ca. 130 Zellkerne ausgewertet. \*, signifikanter Unterschied zwischen der Doxorubicin-Gruppe (Doxo) und der kobehandelten Gruppe (Doxo + Lova) ( $p \leq 0,05$ )

In Untersuchungen an primären humanen Endothelzellen und wildtypischen Ratten-Kardiomyoblasten wurde ausgeschlossen, dass der beobachtete protektive Effekt des Statins auf mögliche Radikalfängereigenschaften der Substanz selbst oder die Aktivierung von antioxidativen Zellantworten zurückzuführen war (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011). Es wurde ebenfalls ausgeschlossen, dass die Statinbehandlung in den verwendeten Konzentrationen den Transport von Doxorubicin in die Zelle oder aus der Zelle heraus beeinflusste (Chen et al., 2005; Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011; Sakaeda et al., 2006; Sakaeda et al., 2002).

Die Bestimmung des Einflusses von Lovastatin auf den Doxorubicinimport in und -export aus den Geweben von Mäusen würde einen nicht vertretbaren tierexperimentellen Aufwand voraussetzen. Darum wurde sich darauf beschränkt die Expression von Genen zu analysieren, die für die Xenobiotikatrporter *Abcb1b* (*Mdr-1*) und *Abcc1* (*Mrp-1*) kodieren („Multi Drug Resistance“) (Sarkadi et al., 2006). Die mRNA-Analyse dieser Transporter zeigte, dass die Kobehandlung mit Lovastatin keinen signifikanten Effekt auf die Expression von *Abcb1* und *Abcc1* in Leber (Abbildung 22) und Herz (Abbildung 23) hatte. Ein verringerter Import oder ein beschleunigter Export von Doxorubicin durch eine Kobehandlung mit dem Statin ist somit unwahrscheinlich.

## Ergebnisse

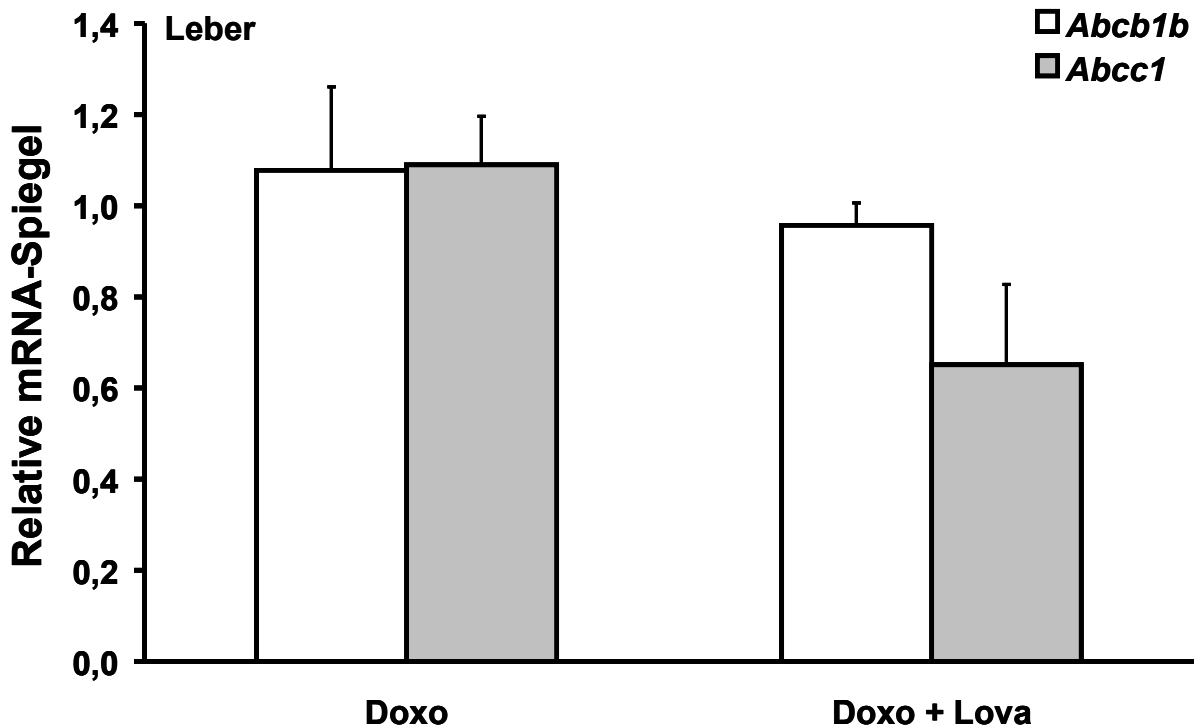


Abbildung 22: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von *Abcb1b* und *Abcc1* in Lebern, 48 h nach Doxorubicinbehandlung. Die mRNA aus Lebern von jeweils 3-4 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der *Abcb1b*- und *Abcc1*-mRNA-Menge relativ zur Kontrolle (n = 3).

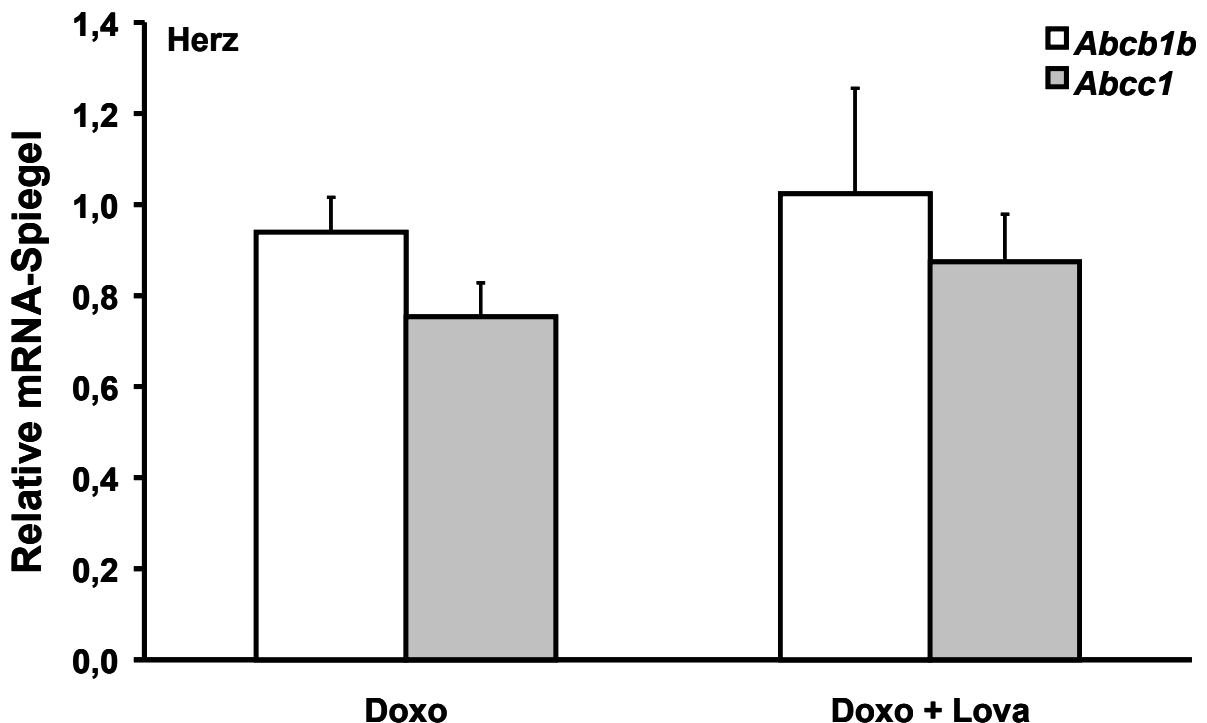


Abbildung 23: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von *Abcb1b* und *Abcc1* in Herzen, 48 h nach Doxorubicinbehandlung. Die mRNA aus Herzen von jeweils 3-4 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der *Abcb1b*- und *Abcc1*-mRNA-Menge relativ zur Kontrolle (n = 3).

## Ergebnisse

---

Eine mögliche Radikalfängereingeschaft von Lovastatin *in vivo* zu überprüfen, wäre mit einem ähnlichem Aufwand verbunden, wie den Import und Export von Doxorubicin in Mausorganen zu untersuchen. Darum wurde sich auf die Analyse der Expression von Genen beschränkt, die im Zuge der Zellantwort auf oxidativen Stress hochreguliert werden (Crawford und Davies, 1994; Li und Kong, 2009b) (Abbildung 24 und Abbildung 25). Exemplarisch wurde die mRNA Expression der antioxidativen Enzyme Glutathionperoxidase 1 (Gpx1) und Hämoxygenase 1 (Hmox1) untersucht sowie die Expression des Transkriptionsfaktors Nfe2l2 („nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2“) und seines Repressors Keap1 („kelch-like ECH-associated protein 1“). Der Transkriptionsfaktor Nfe2l2 reguliert Gene, die für antioxidative sowie fremdstoffmetabolisierende Proteine kodieren (Li und Kong, 2009a; Numazawa und Yoshida, 2004).

Die mRNA-Analyse der Lebern zeigte, dass weder die Doxorubicinbehandlung, noch die Kobehandlung mit Lovastatin einen signifikanten Effekt auf die mRNA Expression der mit oxidativem Stress assoziierten Gene hatte (Abbildung 24). In den Herzen führte die Doxorubicinbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Verringerung des mRNA-Spiegels von *Gpx1* und einer mehr als zweifachen Erhöhung des mRNA-Spiegels von *Hmox1*. Der mRNA-Spiegel des Transkriptionsfaktors Nfe2l2 wurde ebenso wenig durch die Doxorubicinbehandlung beeinflusst, wie der seines Repressors Keap1 (Abbildung 25). Wie in der Leber hatte die Lovastatin-Kobehandlung auch im Herz keinen Einfluss auf die Regulation der untersuchten Gene, die mit Antworten auf oxidativen Stress in Zusammenhang stehen.

## Ergebnisse

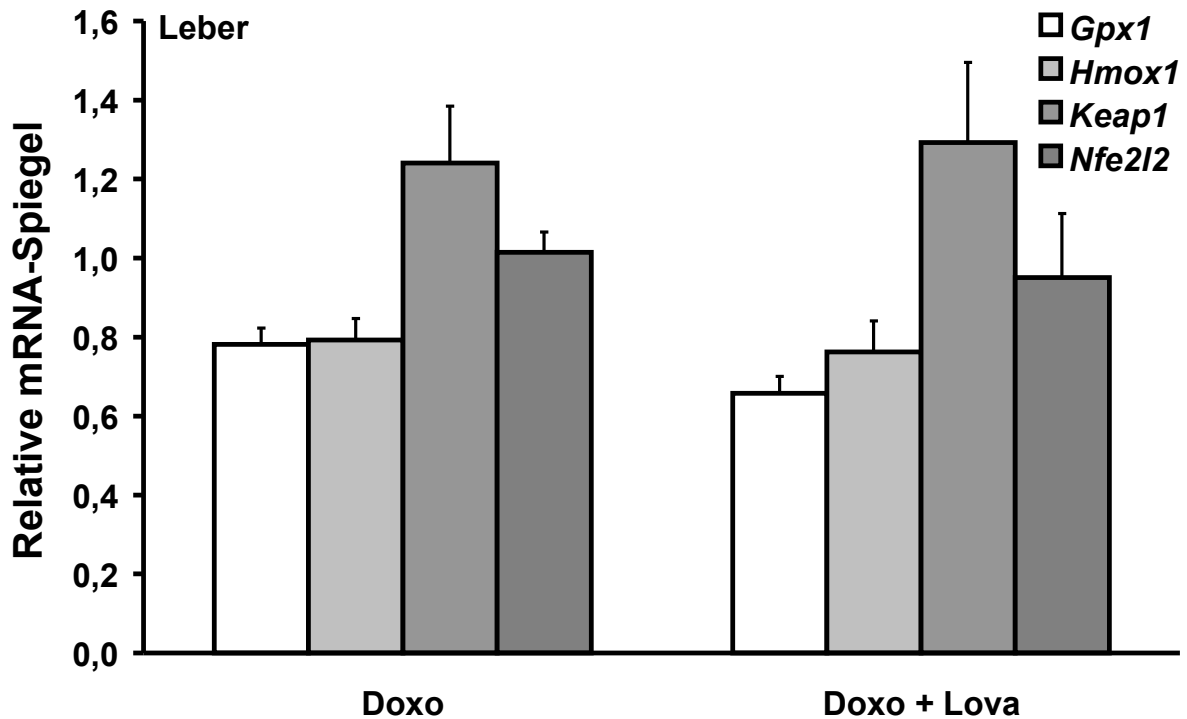


Abbildung 24: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit der Zellantwort auf oxidativen Stress assoziiert sind, 48 h nach Doxorubicinbehandlung. Die mRNA aus Lebern von jeweils 3-4 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

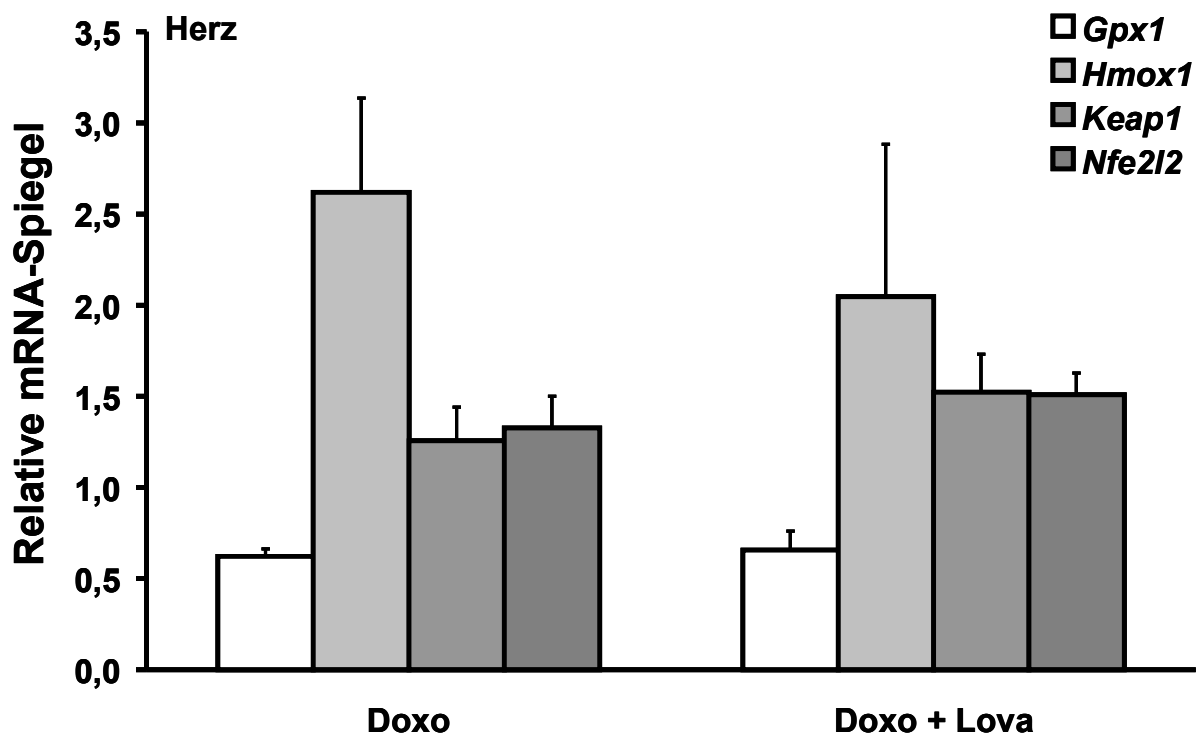


Abbildung 25: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit der Antwort auf oxidativen Stress assoziiert sind, 48 h nach Doxorubicinbehandlung. Die mRNA aus Herzen von jeweils 3-4 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

## Ergebnisse

---

Um zu analysieren, ob 48 h nach Verabreichung der hohen Doxorubicindosis bereits klinisch messbare Leber oder Nierenschäden auftraten, wurden Serumspiegel von Leberenzymen und Stoffwechselprodukten bestimmt, die indikativ für Hepato-, bzw. Nephrotoxizität sind. Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Gpt) ist ein Enzym das hauptsächlich im Zytoplasma von Leberzellen vorkommt. Sterben Leberzellen ab oder ändert sich die Permeabilität der Zellmembran, findet man erhöhte Werte dieses Enzyms im Blut. Gpt ist somit ein Indikator für einen leichten bis mittleren Leberschaden. Die Glutamatahydrogenase (Gldh) ist ein Enzym, das hauptsächlich in den Mitochondrien von Leberzellen vorkommt. Werden erhöhte Werte dieses Enzyms im Blut gemessen, bedeutet dies ein vollständiges Absterben von Leberzellen. Werden erhöhte Gldh-Werte zusammen mit erhöhten Werten von Gpt im Blut gemessen, spricht dies für einen schweren Leberschaden. Kreatinin ist ein Muskelabbauprodukt welches über die Niere mit dem Harn ausgeschieden wird. Es akkumuliert im Blut sobald die Filtrationsleistung der Niere um mehr als 50% abgenommen hat, was für eine schwere Niereninsuffizienz spricht (Goldman, 1956). Die untersuchten Serumparameter waren sowohl nach der Doxorubicin-, als auch nach der Lovastatinbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe unauffällig. Ein Leber- oder Nierenschaden, 48 h nach der Doxorubicinbehandlung, ist daher unwahrscheinlich.

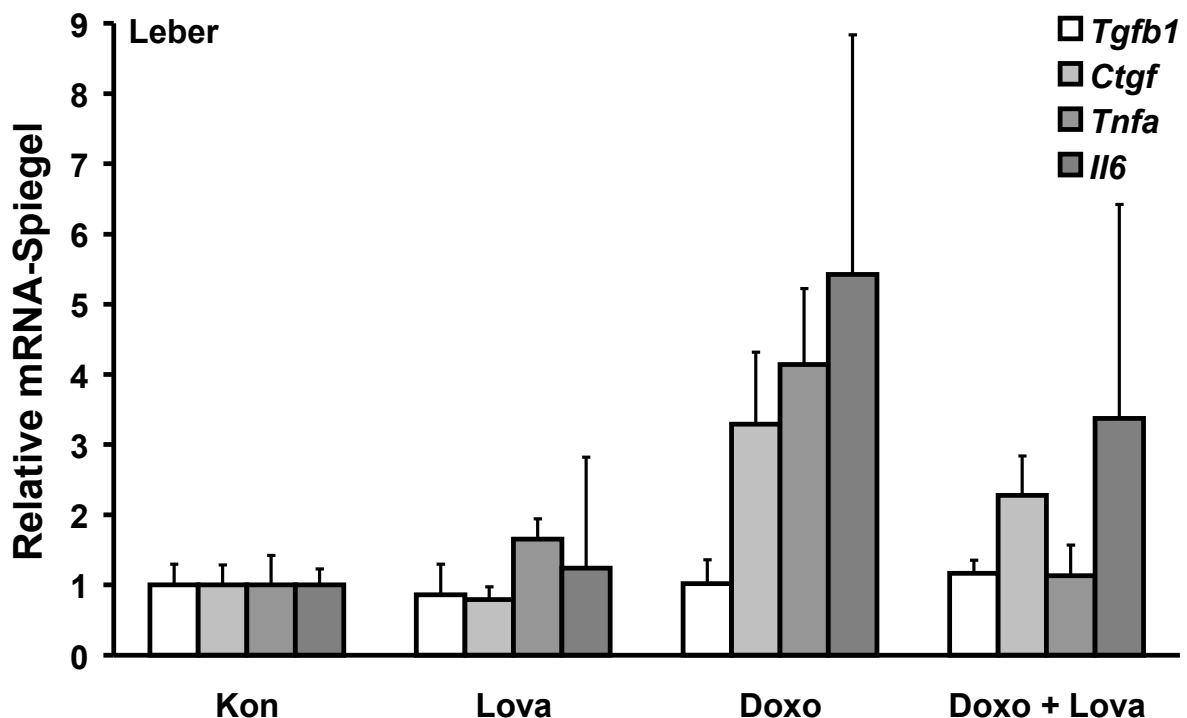
In Kooperation mit der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz wurden zusätzlich histologische Schnittpräparate von Herzen und Lebern analysiert. Es gab 48 h nach der Doxorubicinbehandlung keine morphologischen Anzeichen für beginnende Inflammation oder Fibrose und es waren keine apoptotischen oder nekrotischen Zellen erkennbar. Im TUNEL-Assay, der eine direkte Anfärbung von apoptotischen Zellen ermöglicht, wurde in der Leber nur ein marginaler, nicht signifikanter Anstieg an TUNEL-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert, der durch die Lovastatin-Kobehandlung nicht beeinflusst wurde. Auf Grund starker Autofluoreszenz (vor allem der unspezifischen Eigenfluoreszenz von roten Blutkörperchen) konnte in den Herzen nicht zwischen Hintergrundfluoreszenz des Organs und TUNEL-positiven Zellen unterschieden werden.

Wie bei den Experimenten mit ionisierender Strahlung wurde auch nach der Doxorubicinbehandlung mRNA aus Herzen und Lebern isoliert und Real-Time-RT-PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde sich zunächst auf die mRNA Expression

## Ergebnisse

derjenigen Gene konzentriert, die für Proteine kodieren, die in Verbindung mit inflammatorischem (Tnf, Il6) und fibrotischem Geschehen (Tgfb1, Ctgf) stehen.

Die Doxorubicinbehandlung führte in der Leber zu einem drei- bis fünffachen Anstieg der mRNA-Spiegel von *Ctgf*, *Tnfa* und *Il6* im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 26). Die Lovastatin-Kobehandlung reduzierte diesen Anstieg bei allen untersuchten Parametern außer bei *Tgfb1*, dessen Expression in jeder der Gruppen unauffällig blieb. Die gleichen Parameter wurden anschließend unter Verwendung von aus Herz isolierter mRNA untersucht (Abbildung 27). Die Doxorubicin-Behandlung führte in den Herzen zu einem starken Anstieg des *Ctgf*-mRNA-Spiegels im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Lovastatin-Kobehandlung reduzierte diesen Anstieg. Die Spiegel von *Tgfb1* und *Tnfa* blieben in jeder der Gruppen unauffällig, mit einem leichten Anstieg von *Tnfa* in der Kobehandlungsgruppe. Der Spiegel an *Il6*-mRNA war in sämtlichen Gruppen unterhalb des Detektionslimits. Der beobachtete Effekt spricht erneut für eine antiinflammatorische und antifibrotische Wirkung von Lovastatin.



**Abbildung 26: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit inflammatorischem oder fibrotischem Geschehen assoziiert sind, 48 h nach Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Lebern von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

## Ergebnisse

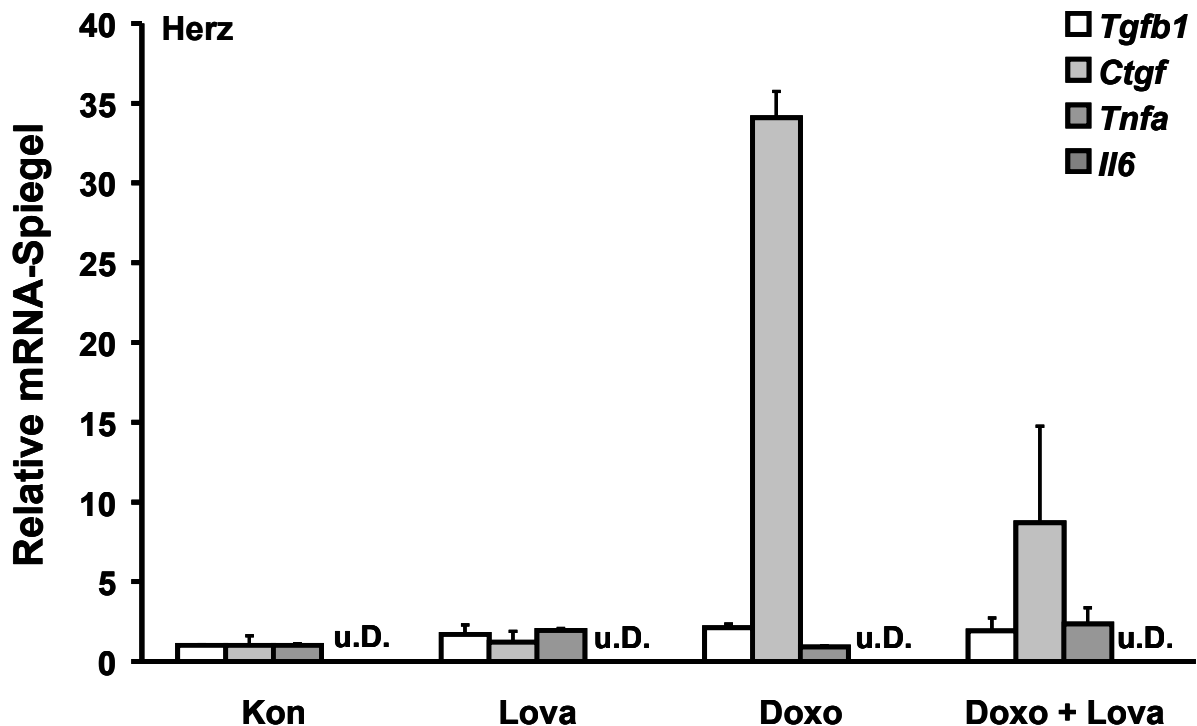


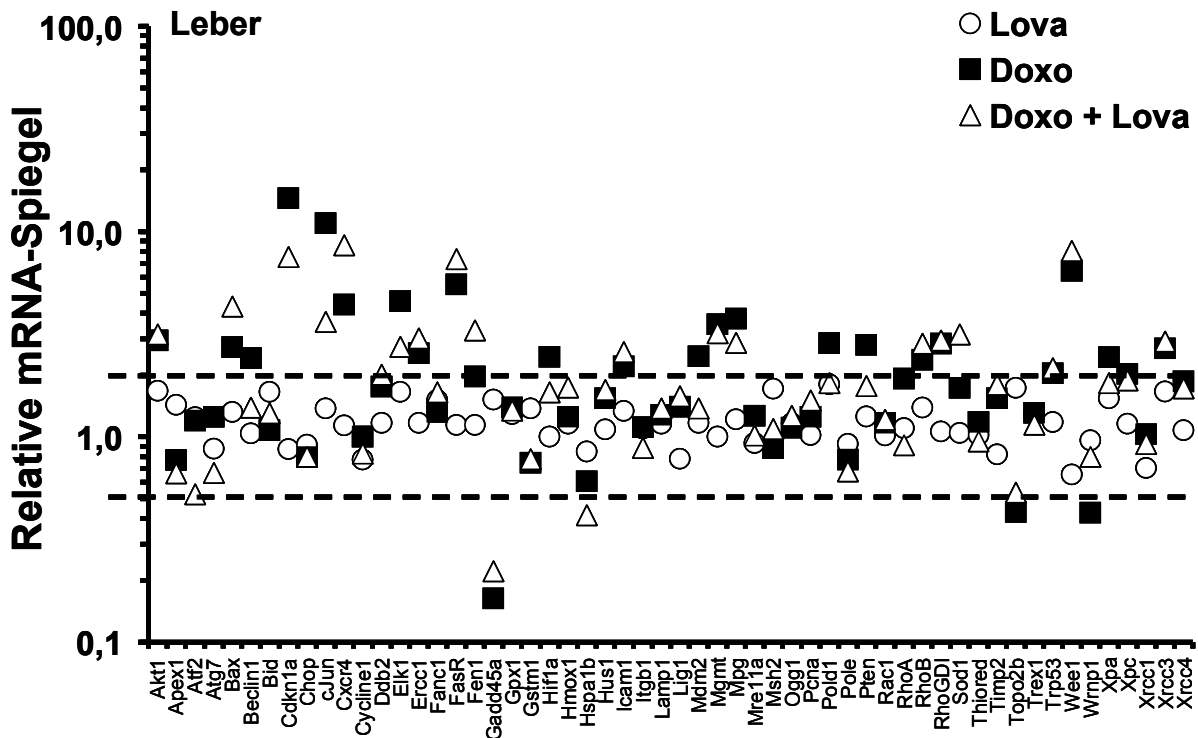
Abbildung 27: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit inflammatorischem oder fibrotischem Geschehen assoziiert sind, 48 h nach Doxorubicinbehandlung. Die mRNA aus Herzen von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3). u.D., unterhalb des Detektionslimits

Mittels eines eigens für diesen Zweck etablierten „Real-Time-RT-PCR-Array“ (siehe Material und Methoden, 2.16) wurde anschließend mit aus Leber isolierter mRNA ein breites Screening nach veränderter Expression von solchen Genen durchgeführt, die als induzierbar durch DNA-schädigende Agenzien beschrieben sind, bzw. in direktem funktionellen Zusammenhang mit genotoxininduzierbaren Stressantworten stehen.

Die Analyse des mRNA-Expressionsprofils der Leber mittels „PCR-Array“ zeigte, dass eine kurzzeitige Lovastatinbehandlung keinen Einfluss auf die Expression der 94 untersuchten Gene hatte (Abbildung 28). Die Doxorubicinbehandlung führte bei 5 % der untersuchten Gene zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe geringerem mRNA-Spiegel. Bei 45 % der untersuchten Gene waren die mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe höher, bei 50 % nicht reguliert. In der Kobehandlungsgruppe waren 5 % der mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe herunter reguliert, 34 % der Gene wiesen einen höheren relativen mRNA-Spiegel auf und 61 % waren nicht reguliert. Von den 94 untersuchten Genen

## Ergebnisse

sind in Abbildung 28 nur diejenigen aufgeführt, deren Amplifikate die Qualitätskriterien erfüllten (siehe Material und Methoden, 2.15.2 und 2.16).

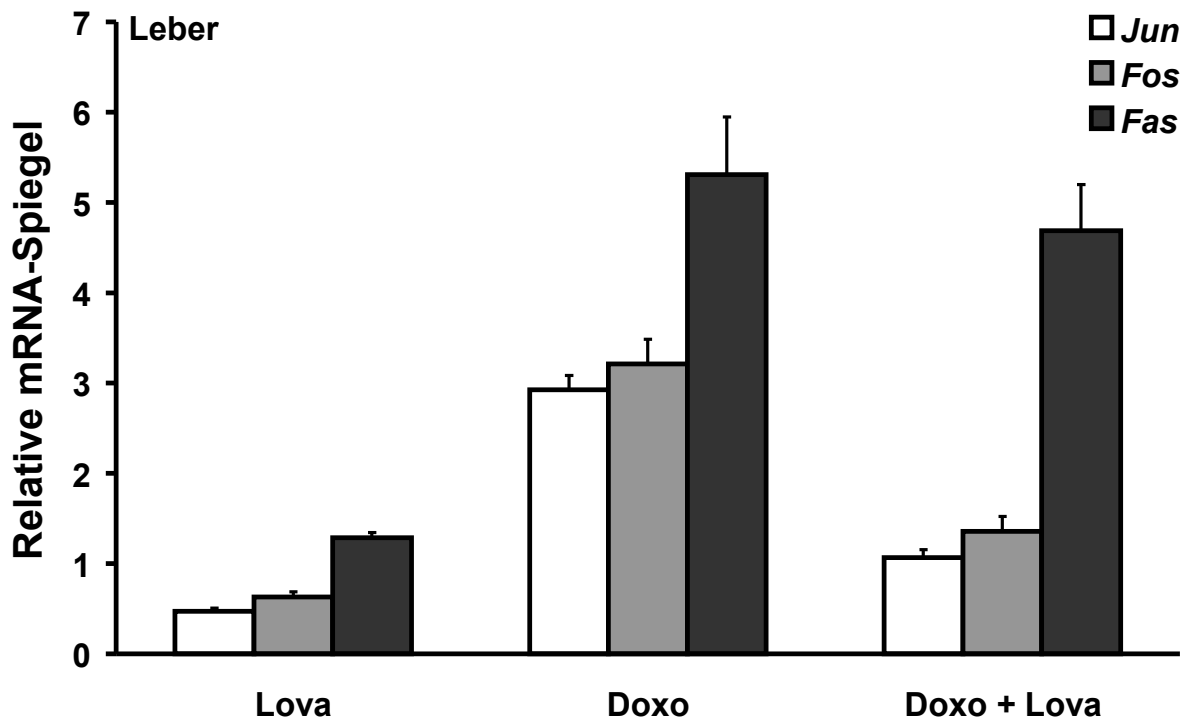


**Abbildung 28:** „94-Gen Real-Time-RT-PCR-Array“-Screening von mRNA, die 48 h nach Doxorubicinbehandlung aus Lebern isoliert wurde. Die mRNA von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert (n = 1). Dargestellt sind die behandelten Gruppen relativ zur Kontrollgruppe. Es sind ausschließlich die relativen mRNA-Spiegel derjenigen Gene dargestellt, die die Qualitätskriterien erfüllten (siehe Material und Methoden).

Die Expression von ausgewählten, stark regulierten Genen wurde anschließend in Real-Time-RT-PCR-Analysen in Triplikaten verifiziert. Abbildung 29 zeigt die Verifizierung der mRNA-Spiegeländerungen von *Jun* und *Fos*. Diese Gene kodieren für Proteine, die den sogenannten AP1-Komplex bilden, ein Transkriptionsfaktor, der Gene reguliert, die vor allem im Zusammenhang mit zellulärer Stressantwort stehen (Karin, 1996). Außerdem ist die Verifizierung für die Expression des Fas-Rezeptors dargestellt. Dieses Gen kodiert für ein Membranprotein, welches für die Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs verantwortlich ist (Waring und Mullbacher, 1999). Die Doxorubicinbehandlung führte in der Leber zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe dreifach höheren mRNA-Spiegel von *Fos* und *Jun*. Die Lovastatin-Kobehandlung hielt diese Spiegel auf Kontrollniveau. Die Expression des Fas-Rezeptors war in der mit Doxorubicin behandelten Gruppe mehr als fünffach höher

## Ergebnisse

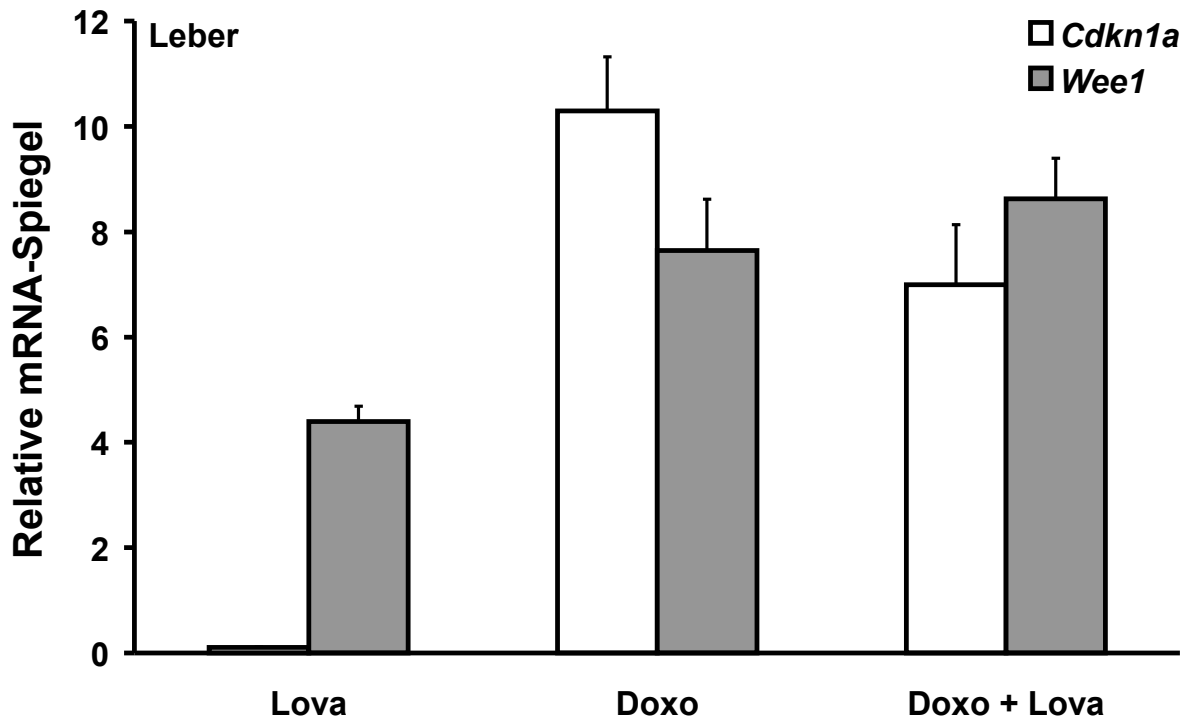
relativ zur Kontrollgruppe. Die Statin-Kobehandlung beeinflusste diesen Anstieg nicht. Die Wirkung von Lovastatin auf die Doxorubicin-induzierte Expression von *Jun* und *Fos* lässt eine verminderte Stressantwort vermuten.



**Abbildung 29: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit früher Antwort auf diverse Zellstimuli und Apoptoseinitiation assoziiert sind, 48 h nach Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Lebern von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

Des Weiteren wurden die im „PCR-Array“ detektierten starken Änderungen der mRNA-Spiegel von *Cdkn1a* (*p21*) und *Wee1* verifiziert (Abbildung 30). Diese stehen in Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle (Aguda, 1999). Die Doxorubicinbehandlung führte zu einem starken Anstieg der mRNA-Spiegel von *Cdkn1a* (*p21*) und *Wee1* in der Leber. Die Kobehandlung mit Lovastatin hatte nur im Fall von *Cdkn1a* einen hemmenden Effekt. Die Statinbehandlung allein führte zu einer deutlichen Abnahme des *Cdkn1a*-mRNA-Spiegels, während der *Wee1* mRNA-Spiegel um ein vierfaches erhöht war. Sowohl die jeweilige Monotherapie mit den Substanzen, als auch die Kombination hatte somit unterschiedlichen Einfluss auf die Expression der mit Zellzykluskontrolle assoziierten Gene.

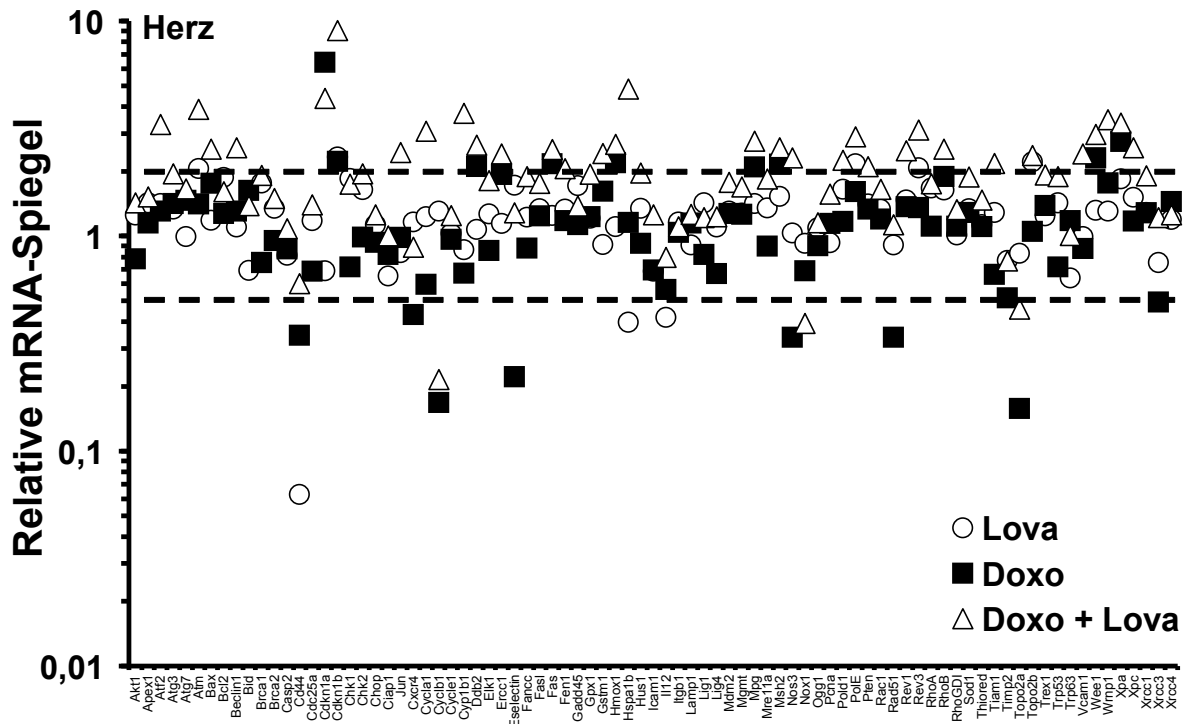
## Ergebnisse



**Abbildung 30: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit der Zellzykluskontrolle assoziiert sind, 48 h nach Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Lebern von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

Aus dem Herzen isolierte mRNA wurde ebenfalls bezüglich der Genexpression der 94 auf dem „PCR-Array“ vertretenen Gene analysiert (Abbildung 31). Wie bei der Leberanalyse sind von den 94 untersuchten Genen nur diejenigen aufgeführt, deren Amplifikate die im Methodenteil erläuterten Qualitätskriterien erfüllten. Die Analyse der aus den Herzen isolierten RNA mittels „PCR-Array“ zeigte, dass die kurzzeitige Lovastatinbehandlung bei 6 % der untersuchten Gene zu einem höheren mRNA-Spiegel relativ zur Kontrollgruppe führte. 4 % der Gene waren im Vergleich zur Kontrollgruppe runterreguliert und 90 % per Definition nicht reguliert (siehe Material und Methoden, 2.15.2 und 2.16). Die Doxorubicinbehandlung führte bei 10 % der untersuchten Gene zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren mRNA-Spiegel. Zu 11 % waren die mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe höher, zu 79 % nicht reguliert. In der Kobehandlungsgruppe waren 4 % der mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe runterreguliert, 39 % wiesen einen höheren relativen mRNA-Spiegel auf und 57 % der Gene waren nicht reguliert.

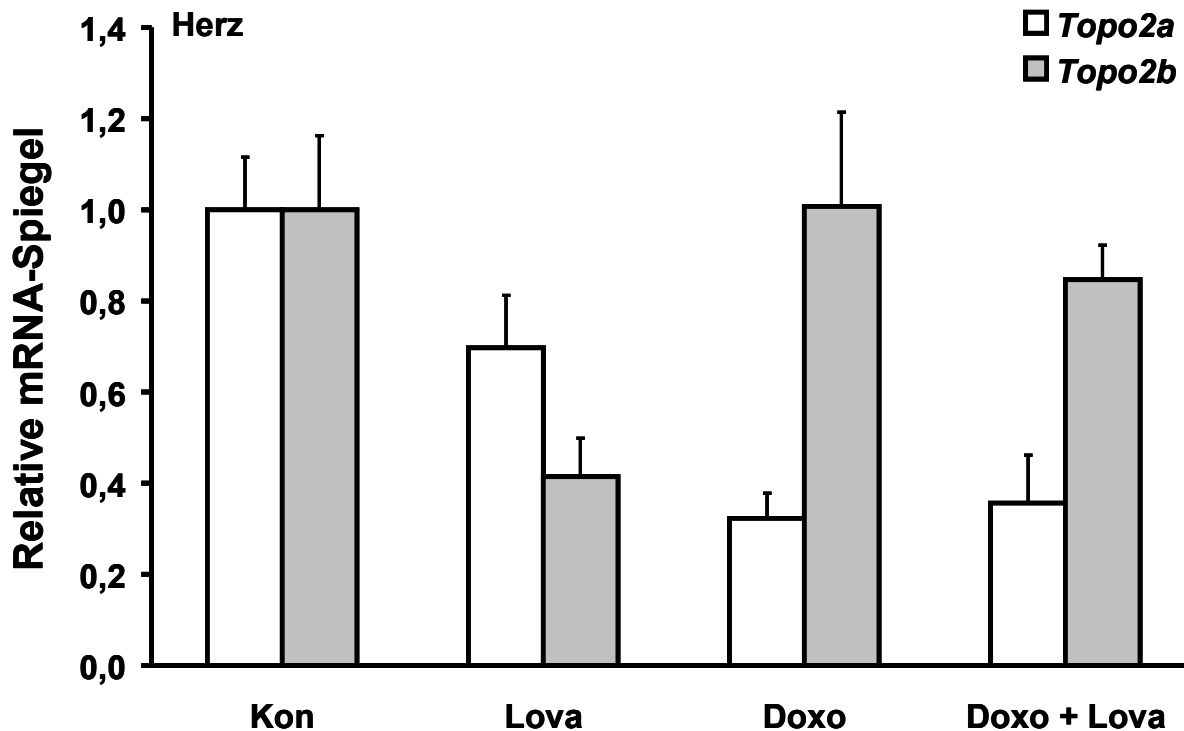
## Ergebnisse



**Abbildung 31: „94-Gen-Real-Time-RT-PCR-Array“-Screening in den Herzen der 48 h nach Doxorubicinbehandlung analysierten Tiere.** Die mRNA wurde wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und aus den Herzen von jeweils 5 Tieren zu gleichen Anteilen zusammenpipettiert, zu cDNA synthetisiert und anschließend mittels Real-Time-PCR analysiert (n = 1). Dargestellt sind die behandelten Gruppen relativ zur Kontrollgruppe. Als Referenzgene wurden *Gapdh* und *Actb* zur Normalisierung verwendet. Es sind ausschließlich die relativen mRNA-Spiegel derjenigen Gene dargestellt, die die Qualitätskriterien erfüllten (siehe Material und Methoden).

Auch hier wurde die Expression von ausgewählten, stark regulierten Genen mittels Real-Time-RT-PCR-Analysen in Triplikaten verifiziert. Abbildung 32 zeigt die aus Herzen isolierte mRNA-Menge von Topoisomerase II alpha und beta (*Topo2a*, *Topo2b*) in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Bereits die Vorbehandlung mit Lovastatin hatte einen im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren Spiegel an *Topo2a* und *Topo2b* mRNA im Herzen zur Folge. Dies ist von besonderer Relevanz, da diese Gene für Enzyme kodieren, deren Inhibition durch Doxorubicin als Hauptursache für dessen Toxizität angesehen wird (Tewey et al., 1984). Die Doxorubicinbehandlung, sowie die Kobehandlung mit Lovastatin führten im Fall von *Topo2a* zu einer Herunterregulation. Auf die Expression von *Topo2b* hatte sowohl die Doxorubicin- als auch die Kobehandlung keinen Einfluss.

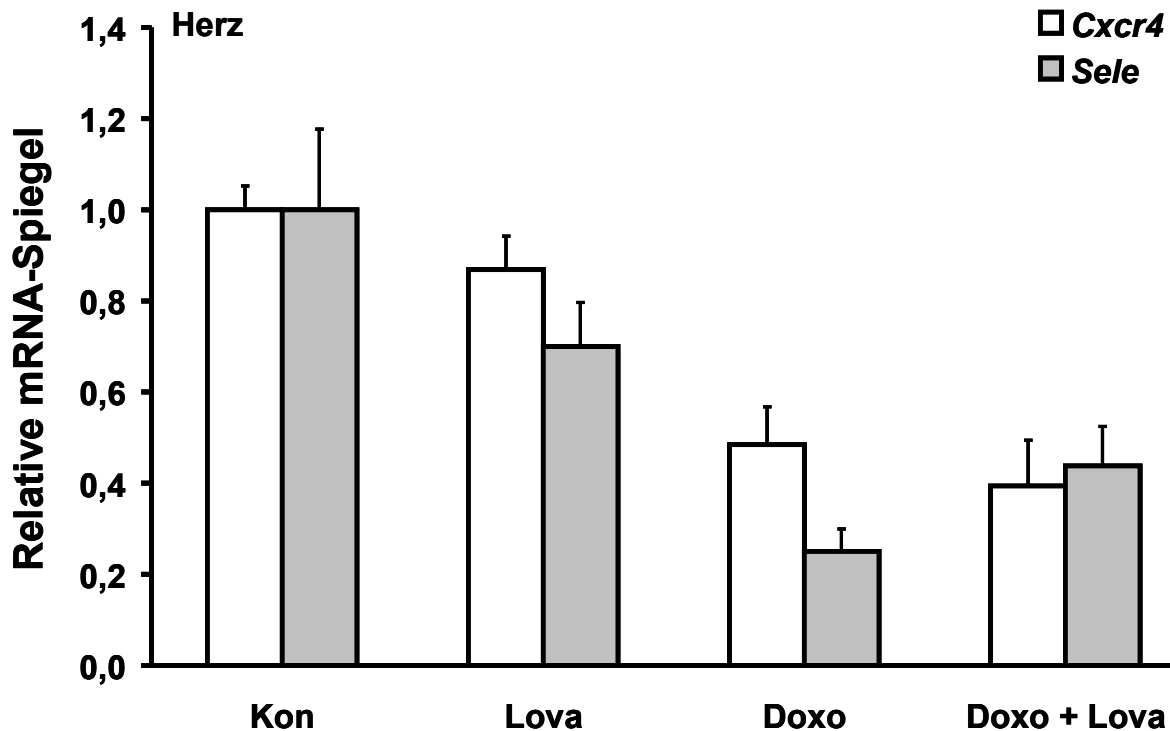
## Ergebnisse



**Abbildung 32: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Topoisomerase II alpha und beta, 48 h nach Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Herzen von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

Abbildung 33 zeigt die Verifizierung der mRNA-Expression von *Cxcr4* und *Sele* (*E-Selektin*). Diese Gene kodieren für Proteine, die mit endothelialen Zelladhäsionsprozessen (Tedder et al., 1995) und Inflammation in Zusammenhang stehen. Ihre Expression kann außerdem die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelien begünstigen und Metastasierung sowie Angiogenese fördern (Laubli und Borsig, 2010; Teicher und Fricker, 2010). Die Lovastatinbehandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Spiegel von *Cxcr4* und *E-Selektin* (*Sele*). Die Doxorubicinbehandlung, führte zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren mRNA-Spiegel von beiden Genen, die Kobehandlung mit Lovastatin hatte keinen Einfluss darauf.

## Ergebnisse



**Abbildung 33: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von *Cxcr4* und *E-selectin*, 48 h nach Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Herzen von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

In Abbildung 34 ist die Verifizierung der Unterschiede in der Genexpression der mit Zellzykluskontrolle assoziierten Gene *p21* (*Cdkn1a*), sowie *Ccnb1* (*Cyclinb1*) dargestellt. Die Lovastatinbehandlung führte in den Herzen zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren mRNA-Spiegel von *p21* (*Cdkn1a*). Dieser Effekt war unerwartet, da eine Lovastatinbehandlung in der Regel zu einem G1-Arrest in proliferierenden Zellen führt (siehe 1.3). Die Runterregulation von *Cdkn1a* wirkt jedoch einem G1-Arrest entgegen. Die Doxorubicinbehandlung verursachte einen Anstieg von *p21*-mRNA. In der Kobehandlungsgruppe war der mRNA-Spiegel etwas geringer als in der Doxorubicin-Gruppe. Der Spiegel von *Ccnb1* wurde durch die Doxorubicinbehandlung stark reduziert. Im Herzen hatte die Monobehandlung mit der jeweiligen Substanz somit einen starken Einfluss auf die Expression von mit Zellzykluskontrolle assoziierten Genen. Die Vorbehandlung mit dem Statin beeinflusste die Doxorubicin-induzierte Verringerung der mRNA-Menge jedoch kaum.

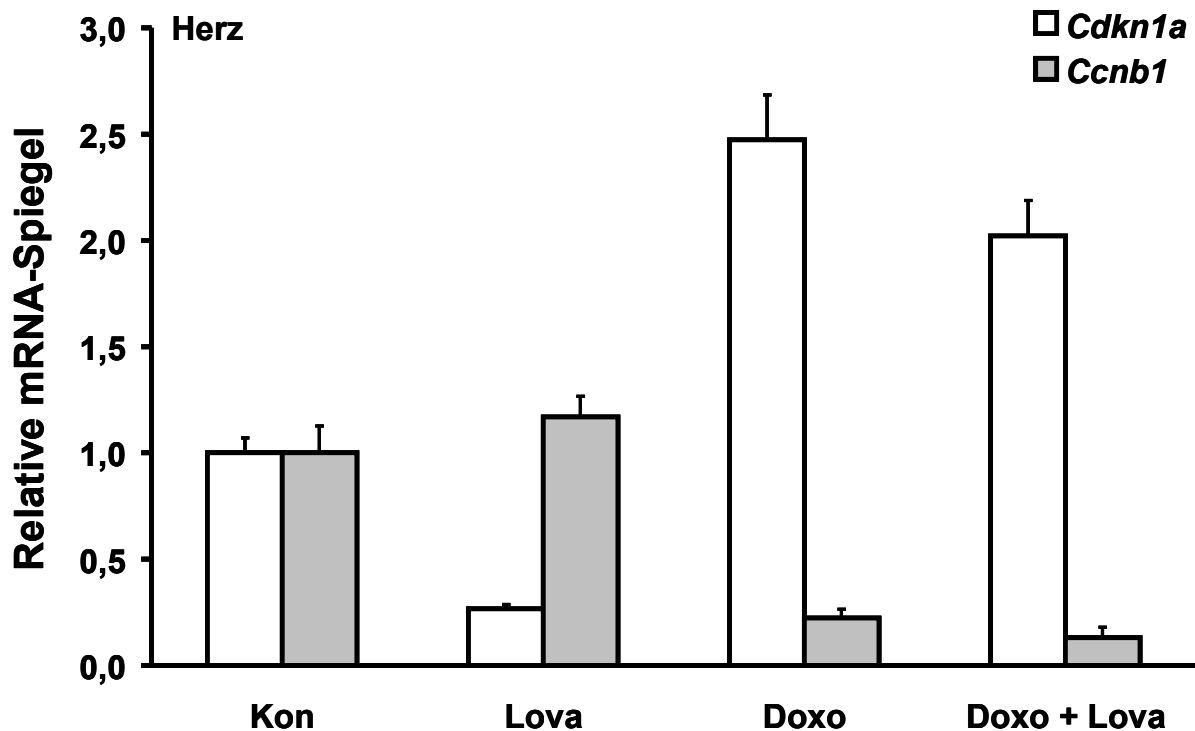


Abbildung 34: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von mit Zellzykluskontrolle assoziierten Genen *Cdkn1a* (*p21*) und *Ccnb1*, 48 h nach der Doxorubicinbehandlung. Die mRNA aus Herzen von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

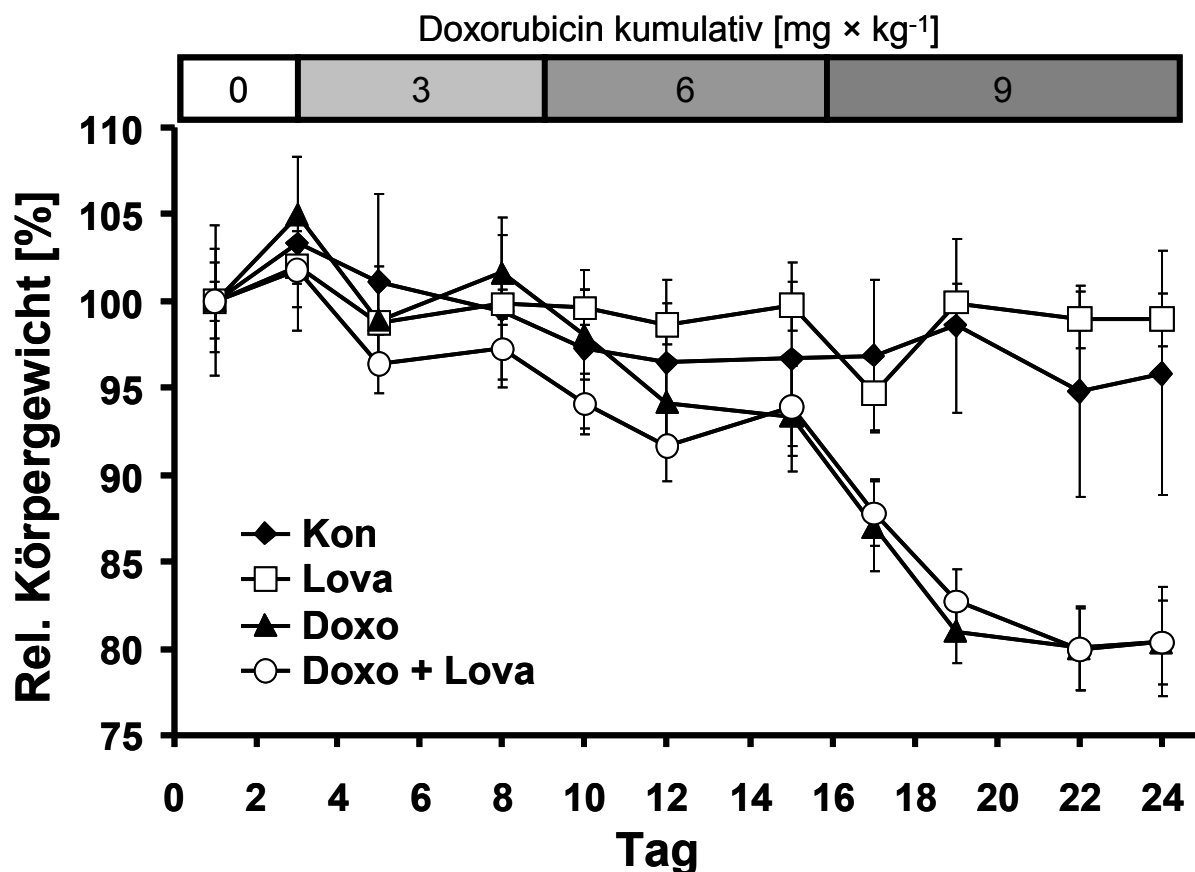
### 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Lovastatin auf akute Doxorubicintoxizität

Die Kobehandlung mit Lovastatin führte zu einer geringeren Menge an Doxorubicin-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in der Leber (gemessen an der Menge von an Serin 139 phosphoryliertem Histon H2ax). Die Expression von Genen, die für Xenobiotikatransporter kodieren oder für Proteine, die mit Entgiftung von ROS in Zusammenhang stehen, wurden durch die Kobehandlung mit Lovastatin nicht beeinflusst. Die Expression von proinflammatorischen und profibrotischen Genen fiel besonders in der Leber und bezüglich der *Ctgf*-Expression auch im Herzen durch die Lovastatin-Kobehandlung geringer aus, als in der Doxorubicin-Gruppe. Zudem verringerte Lovastatin die durch Doxorubicin induzierte Hochregulation von für den AP1-Komplex kodierenden Genen sowie von Zellzykluskontrollfaktoren. Die Lovastatinvorbehandlung führte im Herzen zu einem geringen mRNA-Spiegel der Topoisomerasen II alpha und beta.

### 3.7 Untersuchung der Auswirkung einer Lovastatinbehandlung auf subakute Doxorubicintoxizität

In einem 24 Tage dauernden Experiment wurde BALB/c-Mäusen dreimal  $3 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  Doxorubicin intraperitoneal injiziert (Tag 3, 9 und 16). Lovastatin ( $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ ) wurde nach einer zweitägigen Vorbehandlung dreimal pro Woche oral mittels Schlundsonde verabreicht (siehe Material und Methoden, 2.9, Abbildung 5). Die Organe wurden eine Woche nach der letzten Doxorubicinbehandlung analysiert.

Während des gesamten Experiments wurde das Gewicht der Tiere regelmäßig überprüft (Abbildung 35). Die Doxorubicinapplikation führte zu einer langsamen Abnahme des Körpergewichts ab der zweiten Dosis (Tag 9) und einem rapiden Gewichtsverlust ab der dritten Dosis (Tag 16). Am Ende des Experiments betrug das Gewicht der Tiere, die mit Doxorubicin behandelt wurden, im Mittel ca. 80 % des Startwertes. Die Kobehandlung mit Lovastatin hatte darauf keinen Einfluss.



**Abbildung 35: Verlauf des Körpergewichts der Mäuse aus dem Langzeit-Doxorubicin-Versuch.** Die Mäuse wurden mittels einer Analysenwaage gewogen. Das mittlere Körpergewicht der jeweiligen Gruppe wurde an Tag 1 des Experiments 100 % gesetzt. An Tag 3, 9 und 16 wurden die Mäuse direkt vor der Doxorubicininjektion gewogen. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und den Standardfehler des Mittels (SEM) der Körpergewichte je Gruppe (n = 6-15).

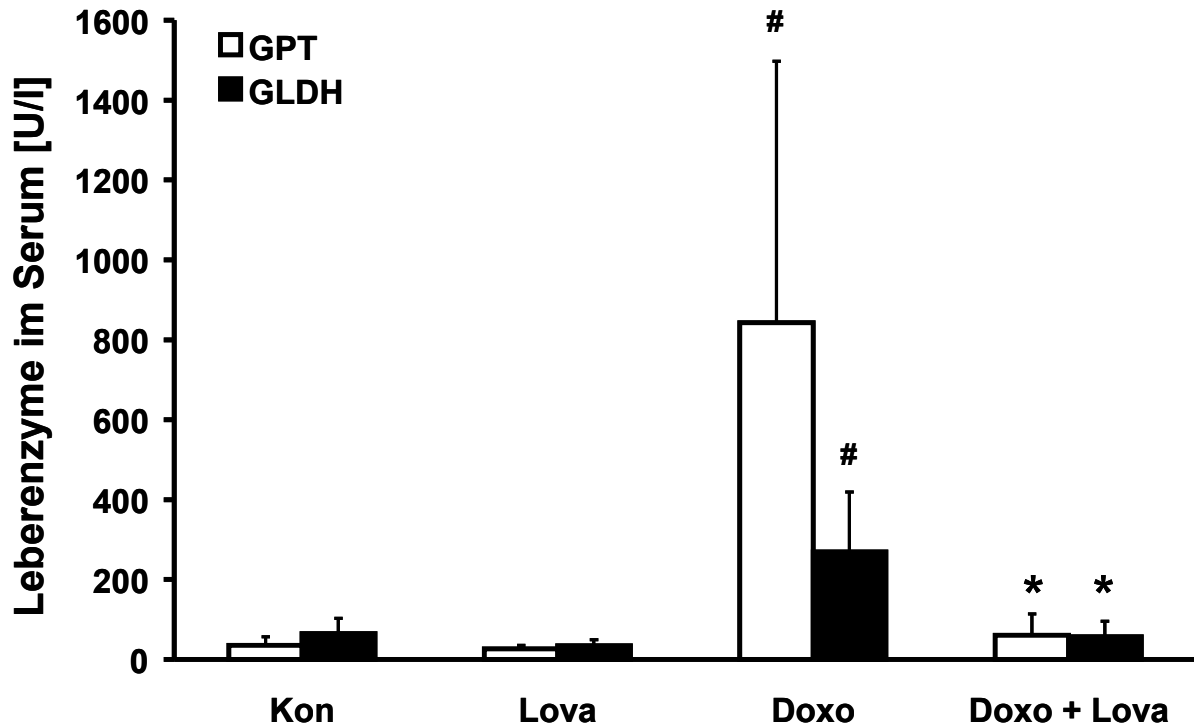
## Ergebnisse

---

Eine Analyse von phosphoryliertem H2ax war in diesem Experiment nicht sinnvoll, da die Organentnahme acht Tage nach der letzten Doxorubicin-Applikation durchgeführt wurde. Der Großteil der von Doxorubicin verursachten DNA-Doppelstrangbrüche sollte nach dieser Zeit längst repariert sein. Es ist allerdings zu erwähnen, dass gerade der Anteil an residualen (nicht reparierten) Doppelstrangbrüchen auch noch mit einiger Verzögerung für Zellen toxisch werden kann, z.B. wenn diese Zellen anfangen, sich zu teilen (Banath et al., 2010). Auf Grund des eher schlechten Signal-/Rauschverhältnisses beim immunhistologischen Nachweis von  $\gamma$ H2ax-Foci in Gewebeschnitten sind diese persistierenden Strangbrüche nur schwer zu detektieren. Mittels Western Blot kann so eine geringe Menge an phosphorylierten H2ax Protein in der Regel überhaupt nicht detektiert werden. Darüber hinaus war es bereits im Kurzzeitversuch nicht möglich, 48 h nach Doxorubicinapplikation phosphoryliertes H2ax in Herzen zu messen.

Wie für den Kurzzeitversuch beschrieben, wurden auch beim 24tägigen Versuch Blutserumparameter bestimmt, welche indikativ für Leber- und Nierenschäden sind. Zusätzlich wurde mittels Troponin-I-ELISA (siehe Material und Methoden, 2.17.2) der Serumspiegel von kardialem Troponin-I, als Indikator für das Absterben von Herzmuskelzellen, detektiert (Berroeta et al., 2006). Die Doxorubicinbehandlung führte zu einem Anstieg des Gpt- und Gldh-Serum-Spiegels. Dies spricht für einen schweren Leberschaden. Bei den Tieren, die mit Lovastatin kobehandelt wurden, befanden sich die Spiegel hingegen auf Kontrollniveau (Abbildung 36). Der Serumspiegel von Kreatinin war in sämtlichen Gruppen unauffällig.

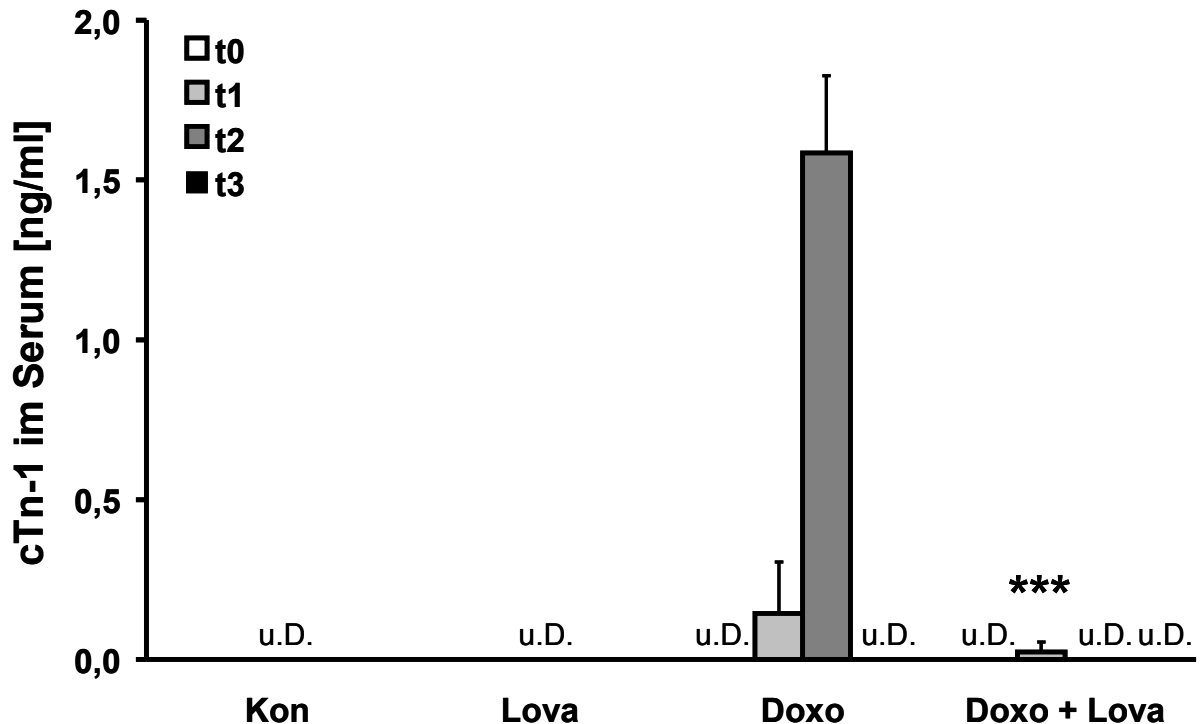
## Ergebnisse



**Abbildung 36: Einfluss von Lovastatin und Doxorubicin auf den Spiegel der Leberenzyme Gpt und Gldh im Blutserums, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Das Blut wurde mittels Herzpunktion gewonnen. Nach Koagulation und Zentrifugation wurde der Serumüberstand abgenommen und mittels Architect C8000 potentiometrisch und photometrisch gemessen (n = 3-6). #, signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Doxo-Gruppe ( $p \leq 0,05$ ); \*, signifikanter Unterschied zwischen der Doxo-Gruppe und der Doxo + Lova-Gruppe ( $p \leq 0,05$ )

Wie aus Abbildung 37 hervorgeht wurde an Tag 16 des Experiments (4 h nach der dritten Doxorubicinapplikation) ein starker Anstieg des cTn-I-Serum-Spiegels detektiert. Die Lovastatin-Kobehandlung verhinderte diesen Anstieg signifikant, was eine Verhinderung des Absterbens von Herzmuskelzellen impliziert.

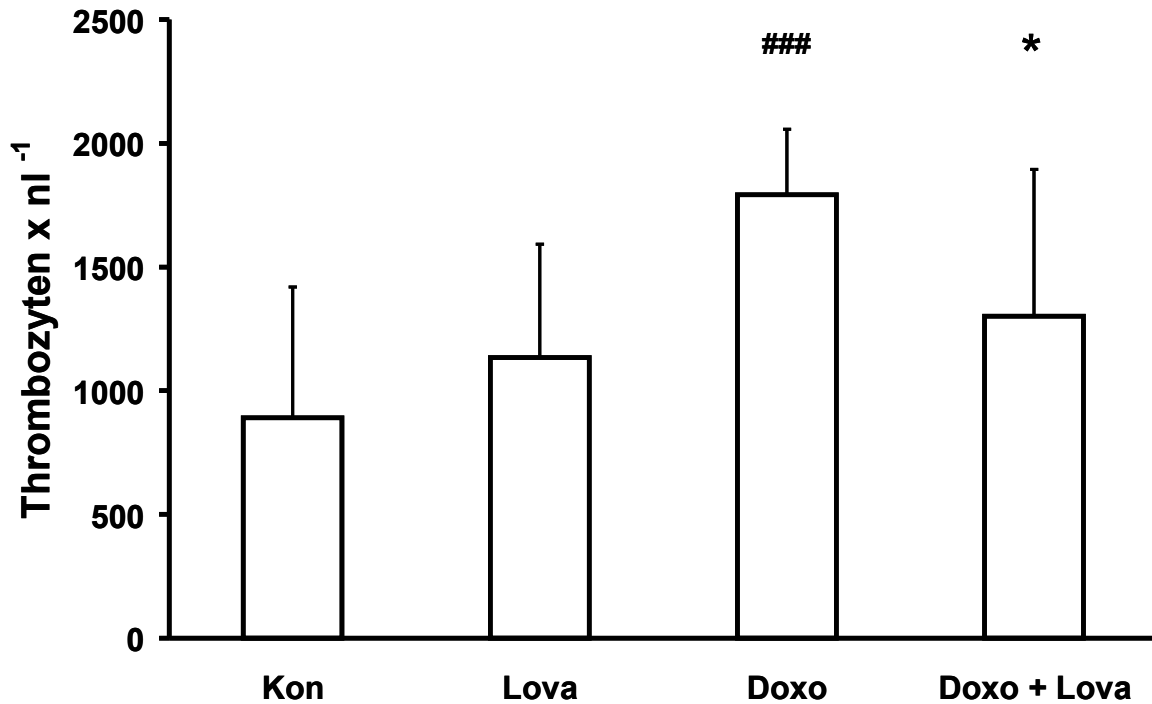
## Ergebnisse



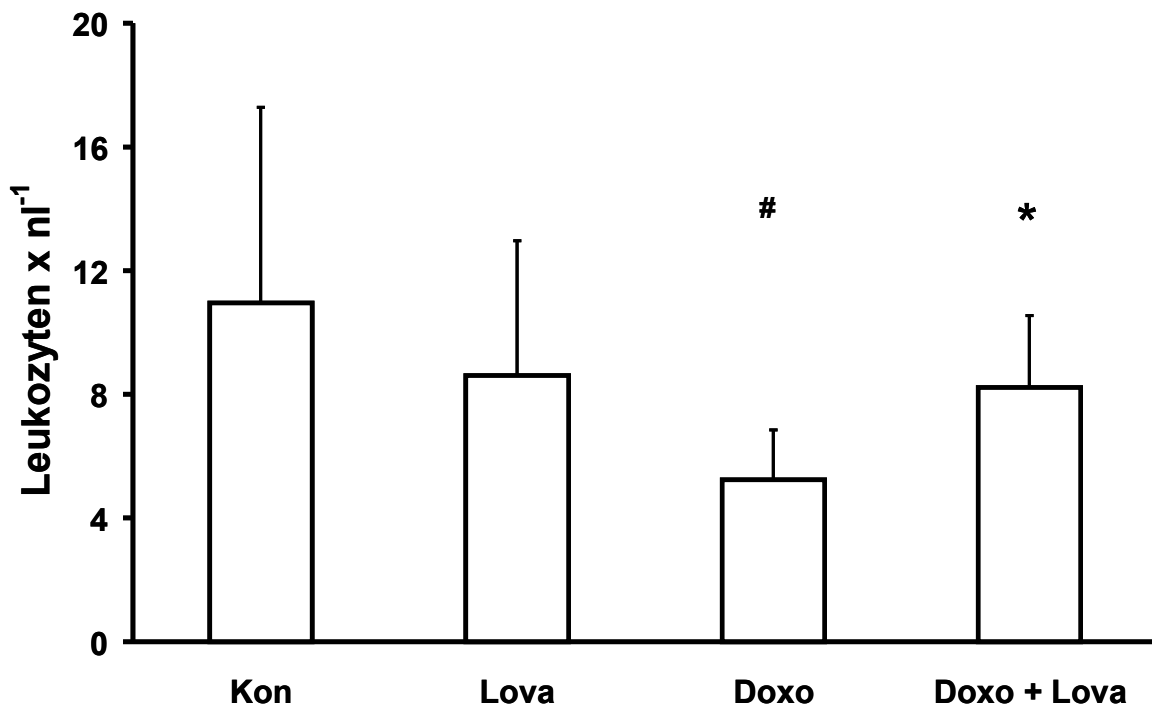
**Abbildung 37: Einfluss von Lovastatin und Doxorubicin auf den cTn-I-Spiegel im Blutserum der Mäuse.** Das Blut wurde am lebenden Tier aus der Schwanzvene entnommen. Nach Koagulation und Zentrifugation wurde der Serumüberstand abgenommen und der cTn-I-Proteingehalt mittels cTn-I-ELISA detektiert (n = 3). t0, Tag 3 (direkt vor Applikation der ersten Doxorubicindosis); t1, Tag 10 (24 h nach der zweiten Applikation); t2, Tag 16 (4 h nach der dritten Applikation); t3, Tag 24 (8 Tage nach der dritten Applikation); \*\*\*, höchst signifikanter Unterschied zwischen der Doxo-Gruppe und der Doxo + Lova-Gruppe ( $p \leq 0,001$ ); u.D., unterhalb des Detektionslimits des ELISA-Kits

Analog zu den Untersuchungen zur subakuten Strahlentoxizität wurde auch im Versuch zur Analyse der subakuten Toxizität von Doxorubicin den Mäusen Blut aus dem Herzen entnommen (Tag 24, 8 Tage nach der letzten Doxorubicindosis) und ein großes Blutbild inklusive Differentialblutbild der Leukozyten mit einem ADVIA 120 Hämatologie System (Siemens, Deutschland) erstellt. Das Ergebnis aus der Thrombozytenzählung und der Leukozytenzählung aus dem Blutbild der verschiedenen Gruppen ist in Abbildung 38 und Abbildung 39 zusammengefasst. Die Doxorubicinbehandlung führte zu einem signifikanten Anstieg der Thrombozytenzahl sowie einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kobehandlung mit Lovastatin milderte diese Effekte signifikant.

## Ergebnisse



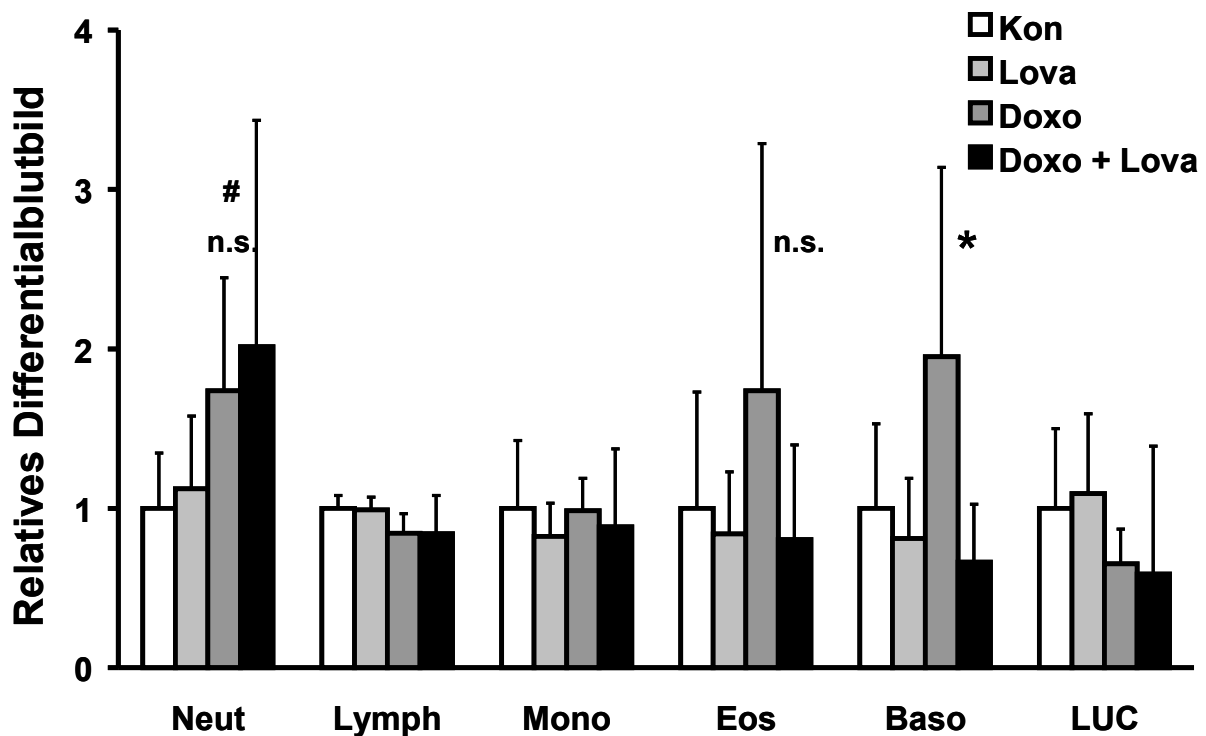
**Abbildung 38: Thrombozytenzahl im EDTA-Blut der BALB/c-Mäuse, 8 Tage nach der dritten Doxorubicindosis.** Das Blut wurde mittels Punktion aus dem Herzen entnommen und mit EDTA gemischt, um die Gerinnung zu verhindern. Die Blutproben wurden mittels ADVIA 120 Hämatologie System gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 6-11). \*, signifikanter Unterschied zwischen der Doxo-Gruppe und der Doxo + Lova-Gruppe ( $p \leq 0,05$ ); ###, höchst signifikanter Unterschied zwischen der Doxo-Gruppe und der Kon-Gruppe ( $p \leq 0,001$ )



**Abbildung 39: Leukozytenzahl im EDTA-Blut der BALB/c-Mäuse, 8 Tage nach der dritten Doxorubicindosis.** Das Blut wurde mittels Herzpunktion entnommen und mit EDTA gemischt, um die Gerinnung zu verhindern. Die Blutproben wurden mittels ADVIA 120 Hämatologie System gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 6-11). \*, signifikanter Unterschied zwischen der Doxo-Gruppe und der Doxo + Lova-Gruppe ( $p \leq 0,05$ ); #, signifikanter Unterschied zwischen der Doxo-Gruppe und der Kon-Gruppe ( $p \leq 0,05$ )

## Ergebnisse

Das Leukozytendifferentialblutbild zeigte, dass die Tiere, die mit Doxorubicin behandelt wurden, einen geringfügig höheren relativen Anteil an neutrophilen und basophilen Granulozyten aufwiesen, als die Tiere aus der Kontrollgruppe. Nur die Doxorubicin-induzierte Erhöhung der relativen Anzahl von basophilen Granulozyten wurde durch die Kobehandlung mit dem Statin signifikant verringert (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Relatives Differentialblutbild aus BALB/c-Mäusen, 8 Tage nach der dritten Doxorubicindosis.** Das Blut wurde mittels Herzpunktion entnommen und mit EDTA gemischt, um die Gerinnung zu verhindern. Die Blutproben wurden mittels ADVIA 120 Hämatologie System gemessen (n = 6-11). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen relativ zur Kontrollgruppe. Neut, neutrophile Granulozyten; Lymph, Lymphozyten; Mono, Monozyten; Eos, eosinophile Granulozyten; Baso, basophile Granulozyten; LUC, große, ungefärbte Zellen („large unstained cells“); n.s., kein signifikanter Unterschied zwischen Doxo-Gruppe und Doxo + Lova-Gruppe; \*, signifikanter Unterschied zwischen Doxo-Gruppe und Doxo + Lova-Gruppe ( $p \leq 0,05$ ); #, signifikanter Unterschied zur Kon-Gruppe ( $p \leq 0,05$ )

Weitere standardmäßig im großen Blutbild bestimmte Parameter, wie die Anzahl an roten Blutkörperchen oder der Hämatokritwert, waren in jeder der Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe unauffällig. Das Ergebnis aller bestimmten Blutparameter ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

## Ergebnisse

**Tabelle 10: Übersicht über die gemessenen Blutparameter aus dem großen Blutbild, 8 Tage nach der dritten Doxorubicindosis.** O, kein Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe; ▲, erhöhter Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe / zur Doxo Gruppe; ▼, verringerter Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe / zur Doxo Gruppe; WBC, Leukozyten; RBC, Erythrozyten; HGB, Hämoglobin; HCT, Hämatokrit; MCV, mittleres Erythrozytenvolumen; MCH, mittleres korpuskuläres Hämoglobin; MCHC, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration; CHCM, mittlere Gesamthämoglobinkonzentration; CH, Korpuskulärer Hämoglobingehalt; RDW, Erythrozytenverteilungsbreite; HDW, Hämoglobinverteilungsbreite; PLT, Thrombozyten; MPV, mittleres Thrombozyten Volumen

Parameter	Einfluss von Lova	Einfluss von Doxo	Einfluss von Lova auf Doxo
WBC	O	▼	▲
RBC	O	O	O
HGB	O	O	O
HCT	O	O	O
MCV	O	O	O
MCH	O	O	O
MCHC	O	O	O
CHCM	O	O	O
CH	O	O	O
RDW	O	O	O
HDW	O	O	O
PLT	O	▲	▼
MPV	O	O	O

Wie im Versuch zur akuten Doxorubicintoxizität gezeigt (siehe, 3.5), wurde auch hier überprüft, ob die zytoprotektiven Effekte des Statins auf einer Modulation des Xenobiotikatransports („Multi Drug Resistance“) oder auf der Zellantwort auf oxidativen Stress beruhen. Dazu wurden in Leber und Herz die mRNA-Mengen von *Gpx1*, *Hmox1*, *Nfe2l2* und *Keap1* sowie von *Abcb1b* und *Abcc1* analysiert.

Die Doxorubicinbehandlung führte in den Lebern im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Erhöhung des *Nfe2l2*-mRNA-Spiegels (*Nrf2*, „Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2“) (Abbildung 41). Wie bereits erwähnt reguliert diese Transkriptionsfaktor Gene, die im Zusammenhang mit antioxidativer Zellantwort stehen. In der Kobehandlungsgruppe fiel diese Erhöhung geringer aus. Die mRNA-Spiegel von *Gpx1*, *Hmox1* und *Keap1* unterschieden sich in sämtlichen Gruppen nicht von der Kontrollgruppe.

## Ergebnisse

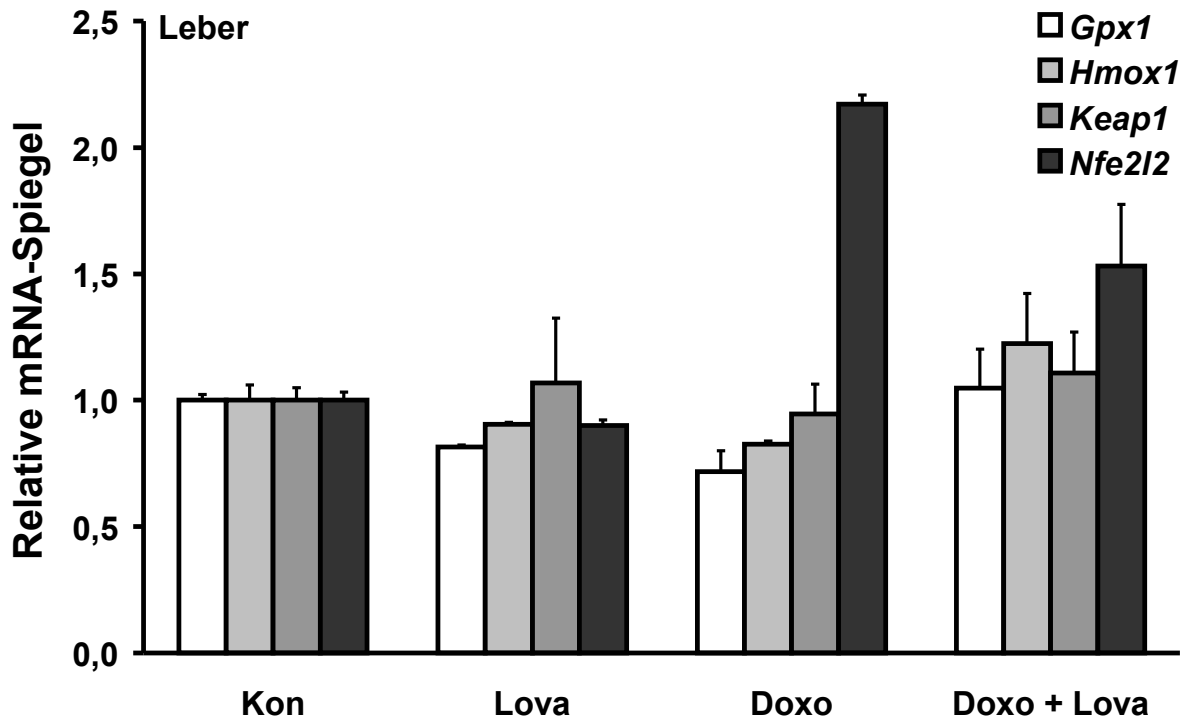
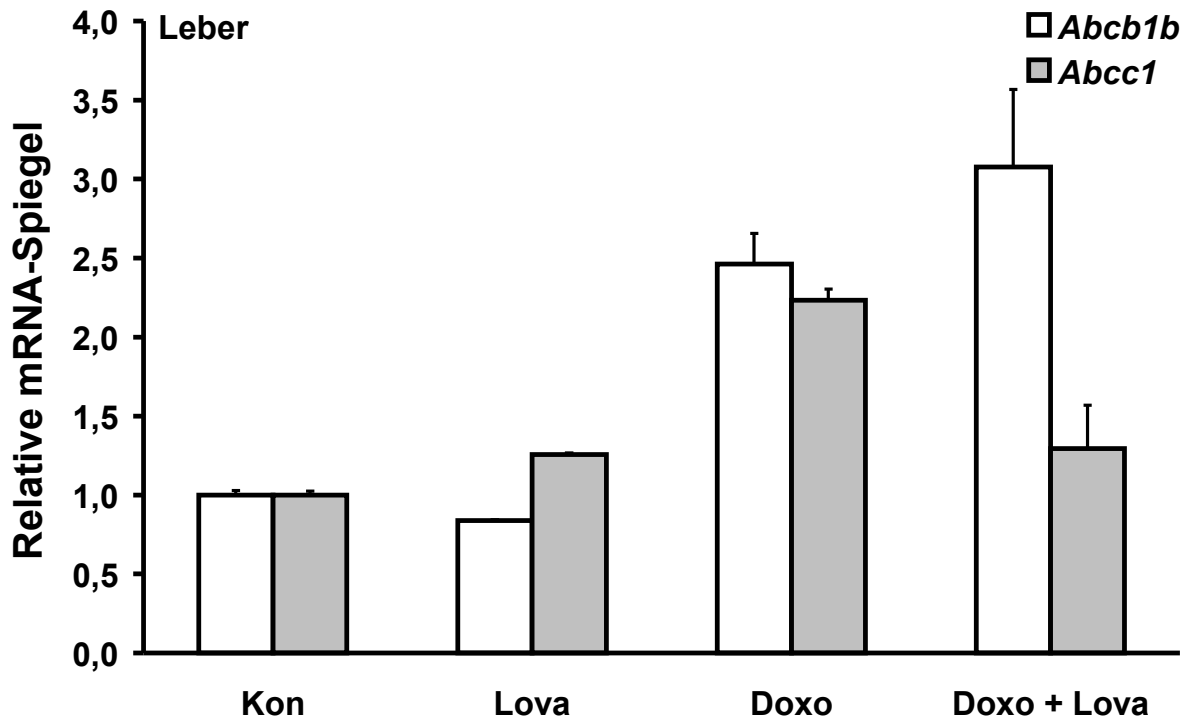


Abbildung 41: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit der Zellantwort auf oxidativen Stress assoziiert sind, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung. Die mRNA aus Lebern von jeweils 6 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

Die Doxorubicinbehandlung hatte in der Leber eine Erhöhung der mRNA-Spiegel von *Abcb1b* (*Mdr1*, „Multi Drug Resistance Protein 1“) und *Abcc1* (*Mrp1*, „Multiple Drug Response Protein 1“) zur Folge (Abbildung 42). Die Kobehandlung mit Lovastatin führte dazu, dass der Doxorubicin-induzierte Anstieg der mRNA-Menge von *Abcb1b* (*Mdr1*) geringfügig verstärkt wurde und sich der mRNA-Spiegel von *Abcc1* (*Mrp1*) wieder fast auf Kontrollniveau befand. Im Gegensatz zum Kurzzeitversuch hatte die Lovastatin-Kobehandlung im Langzeitversuch also einen Effekt auf Gene, die für Xenobiotkatransportproteine kodieren.

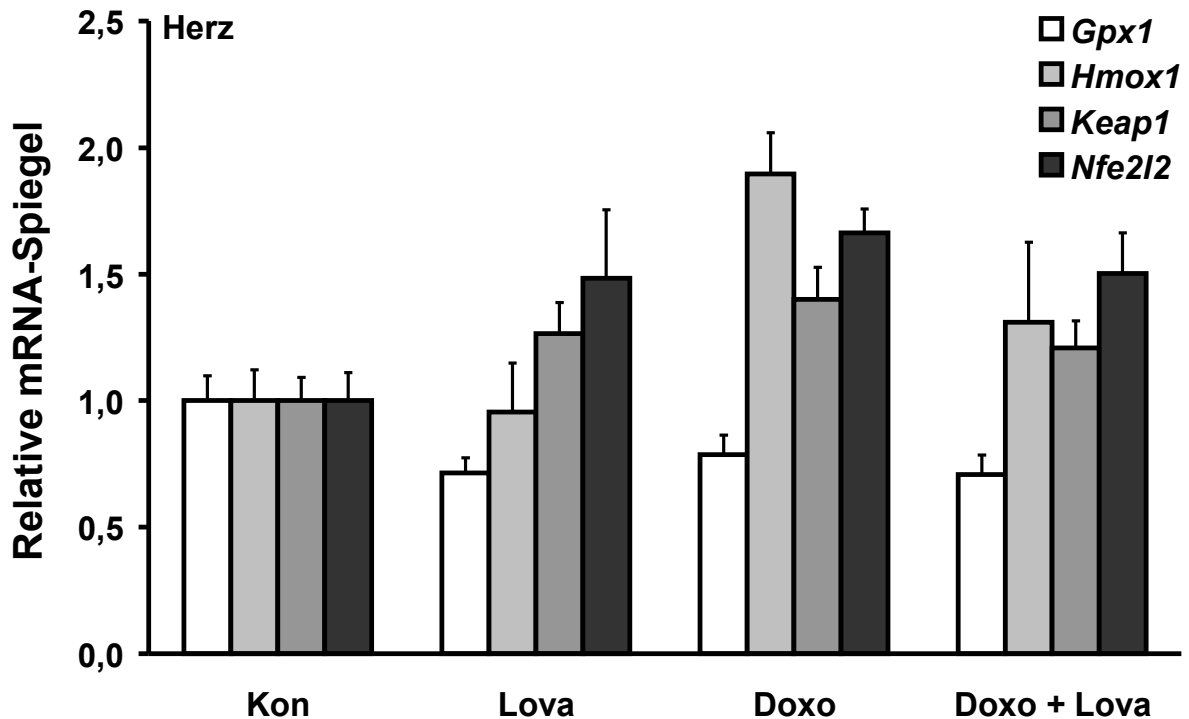
## Ergebnisse



**Abbildung 42: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen die für „Multi Drug Resistance“-Transporter kodieren, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Lebern von jeweils 6 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

Das Herz wurde ebenfalls in Bezug auf Expression von Transportern und Genen der oxidativen Stress Antwort untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte die Doxorubicinbehandlung in den Herzen zu einer Erhöhung des mRNA-Spiegels von Hämoxygenase 1 (*Hmox1*). In der Kobehandlungsgruppe fiel diese Erhöhung geringer aus. Die mRNA-Spiegel von *Gpx1*, *Keap1* und *Nfe2l2* waren in sämtlichen Gruppen nicht unterschiedlich zur Kontrollgruppe (Abbildung 43).

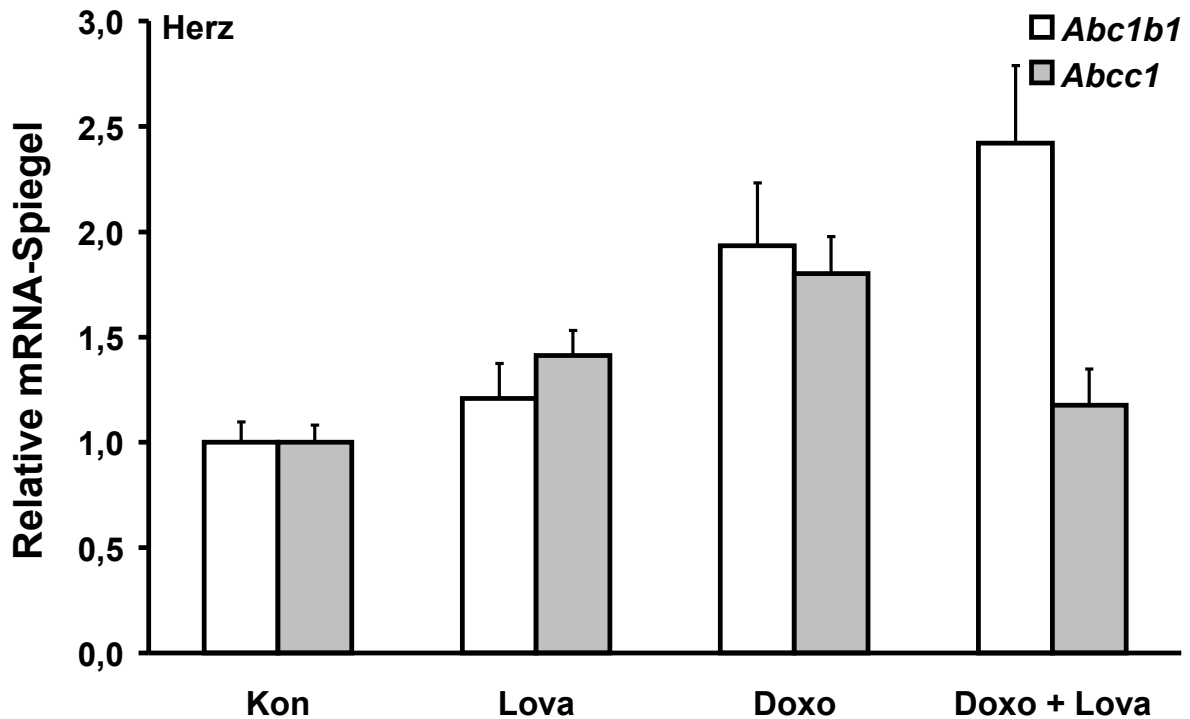
## Ergebnisse



**Abbildung 43: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die für Proteine der Zellantwort auf oxidativen Stress kodieren, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Herzen von jeweils 6 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

Bei der mRNA-Analyse von *Abcb1b* und *Abcc1* im Herzen (Abbildung 44) zeigte sich ein zu den Befunden aus der Leber ähnliches Muster (siehe Abbildung 42). Die Doxorubicinbehandlung hatte auch im Herzen eine Erhöhung der mRNA-Spiegel von *Abcb1b* (*Mdr1*, Multi Drug Resistance Protein 1) und *Abcc1* (*Mrp1*, „Multiple Drug Response Protein 1“) zur Folge. Die Kobehandlung mit Lovastatin bewirkte, dass die Doxorubicin-induzierte Erhöhung der mRNA-Menge von *Abcb1b* (*Mdr1*) geringfügig verstärkt wurde und die von *Abcc1* (*Mrp1*) wieder fast auf Kontrollniveau war.

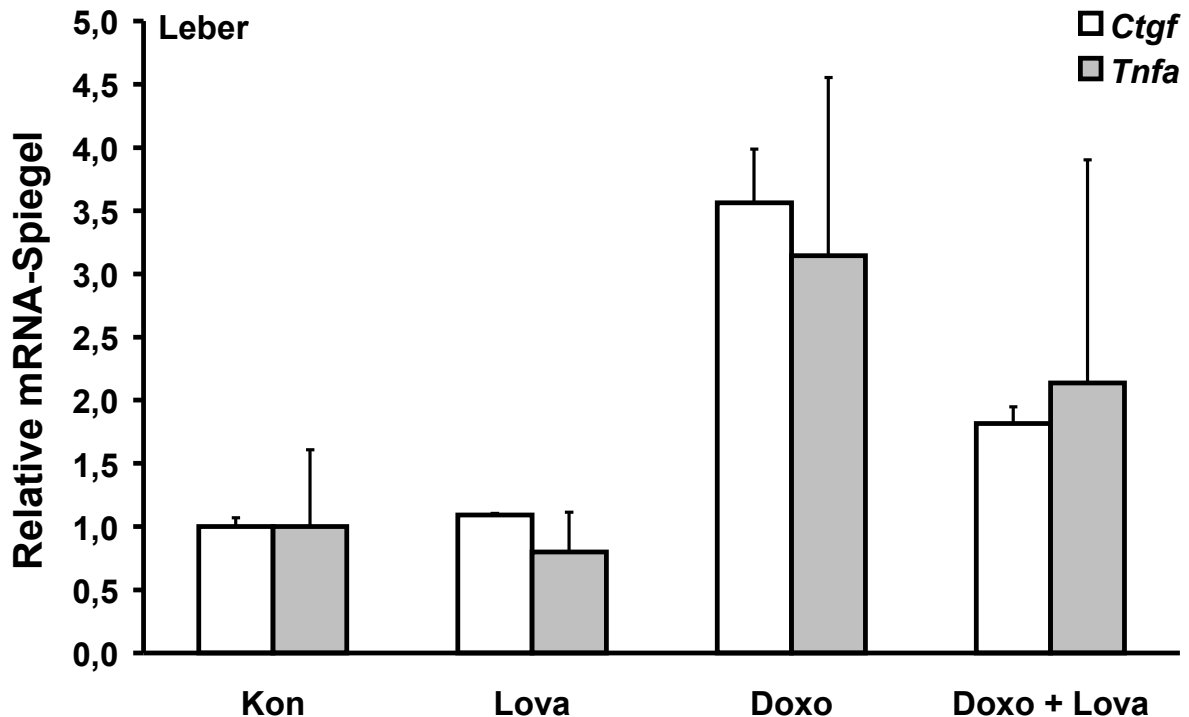
## Ergebnisse



**Abbildung 44: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die für Xenobiotikatransporter kodieren, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Herzen von jeweils 6 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

Anschließend wurde die mRNA-Expression von *Ctgf* und *Tnfa* in der Leber analysiert. Acht Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung waren die mRNA-Spiegel von *Ctgf* und *Tnfa* mehr als dreifach erhöht (Abbildung 45). Die Kobehandlung mit Lovastatin reduzierte diese Erhöhung um ca. die Hälfte, was in diesem Versuch für eine antiinflammatorischen und antifibrotischen Wirkung der Statinkobehandlung spricht.

## Ergebnisse

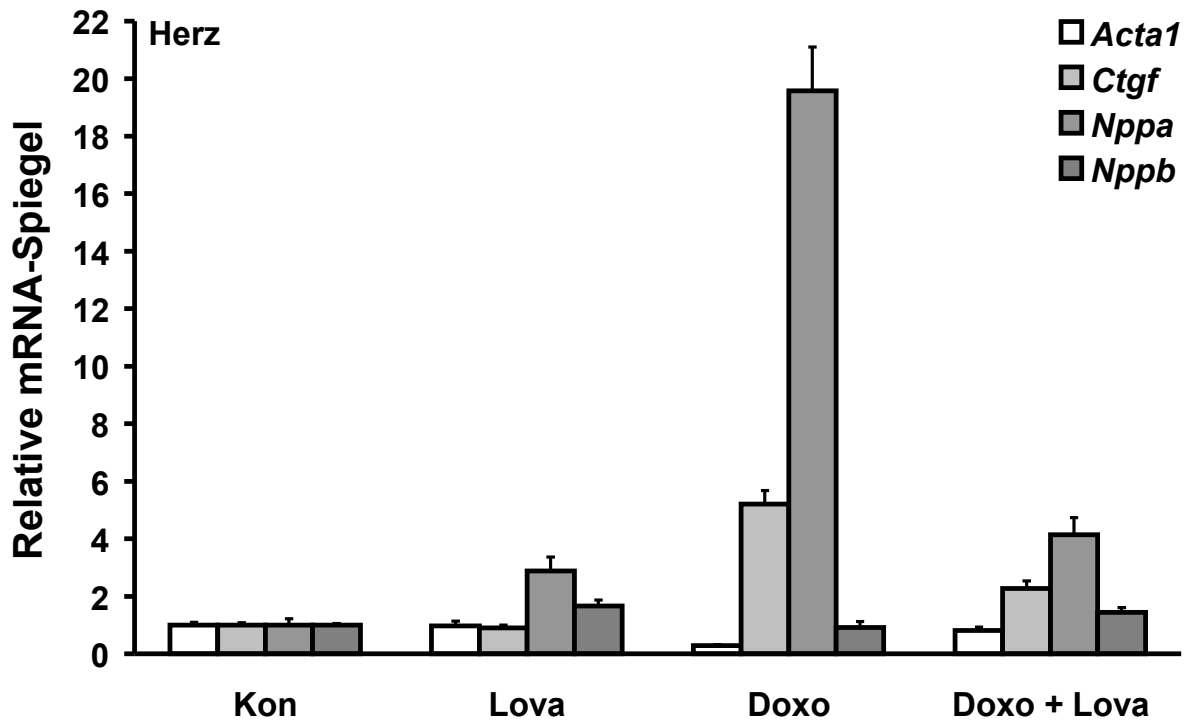


**Abbildung 45: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit Inflammation und Fibrose assoziiert sind, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA wurde im Fall von *Ctgf* aus den Lebern von jeweils 5 Tieren zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Für die Analyse von *Tnfa* wurde aus jeder einzelnen mRNA eine jeweilige cDNA synthetisiert ( $n = 5$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Menge relativ zur Kontrolle (*Ctgf*:  $n = 3$ ; *Tnfa*:  $n = 5$  in Duplikaten).

Bei der aus Herzen isolierten mRNA wurde sich auf die Analyse solcher Gene beschränkt, die mit beginnender Fibrose und Hypertrophie assoziiert sind (Abbildung 46). Insbesondere Hypertrophie gilt als frühes Anzeichen für Doxorubicintoxizität im Herzen (Chen et al., 2001). Die Doxorubicinbehandlung führte zu einem zwanzigfach erhöhten Spiegel von *Nppa*-mRNA („Natriuretic Peptide Type A“). Die erhöhte Expression von *Nppa* gilt als molekularer Surrogatmarker für Hypertrophie und Fibrose im Atrium (Chang et al., 2011; Nishikimi et al., 2011). Die Lovastatin-Kobehandlung führte zu einem wesentlich geringeren *Nppa*-Spiegel im Vergleich zur ausschließlich mit Doxorubicin behandelten Gruppe. Der molekulare Marker für Hypertrophie und Fibrose in den Ventrikeln, *Nppb* („Natriuretic Peptide Type B“) (Chang et al., 2011; Nishikimi et al., 2011), war in sämtlichen Gruppen unauffällig. Der Spiegel von *Acta1*-mRNA (Actin, alpha 1, Skeletal Muscle) war ausschließlich in den Herzen der mit Doxorubicin behandelten Gruppe stark verringert, was ebenfalls im Zusammenhang mit Doxorubicin-induzierter Hypertrophie und Fibrose stehen kann (Lijnen und Petrov, 1999). Wie in der Leber war auch im Herz die mRNA-

## Ergebnisse

Menge von *Ctgf* nach Doxorubicinbehandlung erhöht und wurde durch die Kobehandlung mit Lovastatin abgeschwächt. Zusammen implizieren diese Daten, dass sich die Behandlung mit Lovastatin im Langzeitversuch günstig auf Doxorubicin-induzierte Fibrose und Hypertrophie im Herzen auswirkt.



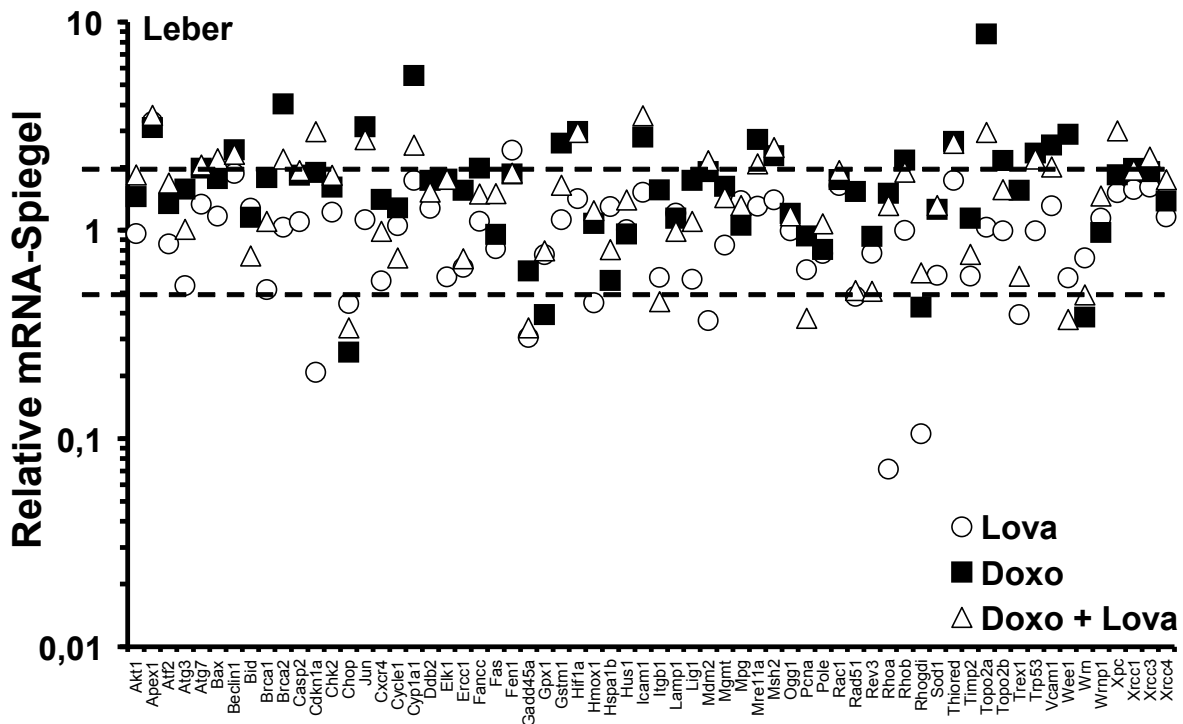
**Abbildung 46: Real-Time-RT-PCR-Analyse der mRNA-Spiegel von Genen, die mit Hypertrophie und Fibrose im Herz assoziiert sind, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Herzen von jeweils 5 Tieren zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR in Triplikaten analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Menge relativ zur Kontrolle.

Analog zum Kurzzeitversuch wurde mittels „Real-Time-RT-PCR-Array“ mit aus Herz und Leber isolierter mRNA ein breites Screening nach veränderter Expression von solchen Genen durchgeführt, die als induzierbar durch DNA-schädigende Agenzien beschrieben sind, bzw. in direktem funktionellen Zusammenhang mit genotoxininduzierbaren Stressantworten stehen.

Abbildung 47 zeigt die Ergebnisse des „PCR-Arrays“ für aus Leber isolierte mRNA. Die dauerhafte Lovastatinbehandlung führte zu einer Herunterregulation der Expression von 14 % der untersuchten Gene. Die Expression von 3 % der Gene war hochreguliert und 83 % per Definition nicht reguliert (siehe Material und Methoden, 2.15.2 und 2.16). Die regelmäßige Lovastatinbehandlung in dem 24 Tage

## Ergebnisse

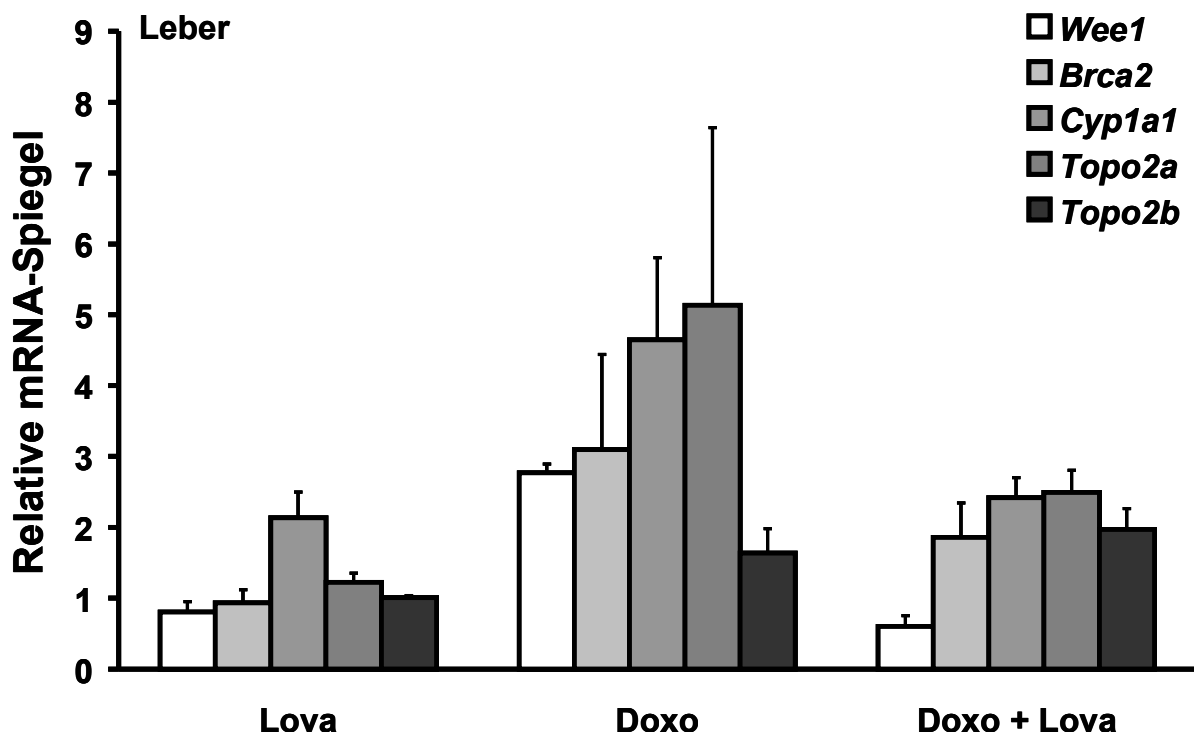
andauernden Experiment hatte wie zu erwarten nur im geringen Maße eine Hochregulationen der untersuchten Genexpressionen zur Folge. Beim Großteil der analysierten Gene blieb die Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe unverändert und nur bei wenigen der betrachteten Gene war die Expression verringert. Die wiederholte Doxorubicinbehandlung führte bei 6 % der untersuchten Gene zu einer Herunterregulation der mRNA-Expression, 63 % waren nicht reguliert und 31 % hochreguliert. Wie erwartet führte die Doxorubicinexposition hauptsächlich zu einer Hochregulation der Gene, die in Zusammenhang mit DNA-Schadens- und Stressantworten stehen. In der Kobehandlungsgruppe wurde die Expression von 9 % der Gene herunter-, 30 % hochreguliert und 61 % nicht reguliert. In der Gesamtheit betrachtet unterschied sich das Expressionsmuster der Kobehandlung in der Leber also nur marginal von dem der Monobehandlung mit Doxorubicin.



**Abbildung 47: „94-Gen-Real-Time-RT-PCR-Array“-Screening in der Leber, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Lebern von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert (n = 1). Dargestellt sind die behandelten Gruppen relativ zur Kontrollgruppe. Es sind ausschließlich die relativen mRNA-Spiegel derjenigen Gene dargestellt, die die Qualitätskriterien erfüllten (siehe Material und Methoden).

## Ergebnisse

Die Expression von ausgewählten, stark regulierten Genen wurde anschließend mittels Real-time-RT-PCR-Analyse in Triplikaten verifiziert (Abbildung 48). Die Doxorubicinbehandlung führte in der Leber zu einer Erhöhung der mRNA-Spiegel von Genen, die mit Zellzykluskontrolle (*Wee1*), DNA-Doppelstrangbruchreparatur (*Brca2*) und dem Fremdstoffmetabolismus (*Cyp1a1*) in Verbindung stehen. Den größten Effekt hatte die Doxorubicinbehandlung auf den mRNA-Spiegel von Topoisomerase II alpha (*Topo2a*). Eine erhöhte *Topo2a*-Expression gilt als Marker für Zellproliferation (Heck und Earnshaw, 1986). Unabhängig davon ist zu beachten, dass die Bindung von Doxorubicin an *Topo2a* und *Topo2b* als Hauptursache für die Doxorubicin-induzierte Zytotoxizität gilt (Tewey et al., 1984). Die Erhöhung des mRNA-Spiegels nach Doxorubicinexposition könnte somit auch eine Antwort der Zelle auf Doxorubicin-induzierte *Topo2a*-Inhibition sein. Die Kobehandlung mit dem Statin senkte sämtliche mRNA-Spiegel, die durch die alleinige Doxorubicinapplikation erhöht wurden. Einzig der mRNA-Spiegel von *Topo2b* blieb unbeeinflusst. Die alleinige Lovastatinbehandlung hatte, außer auf den zweifachen Anstieg der Expression von *Cyp1a1*, *per se* keinen Einfluss auf die untersuchte Genexpression.



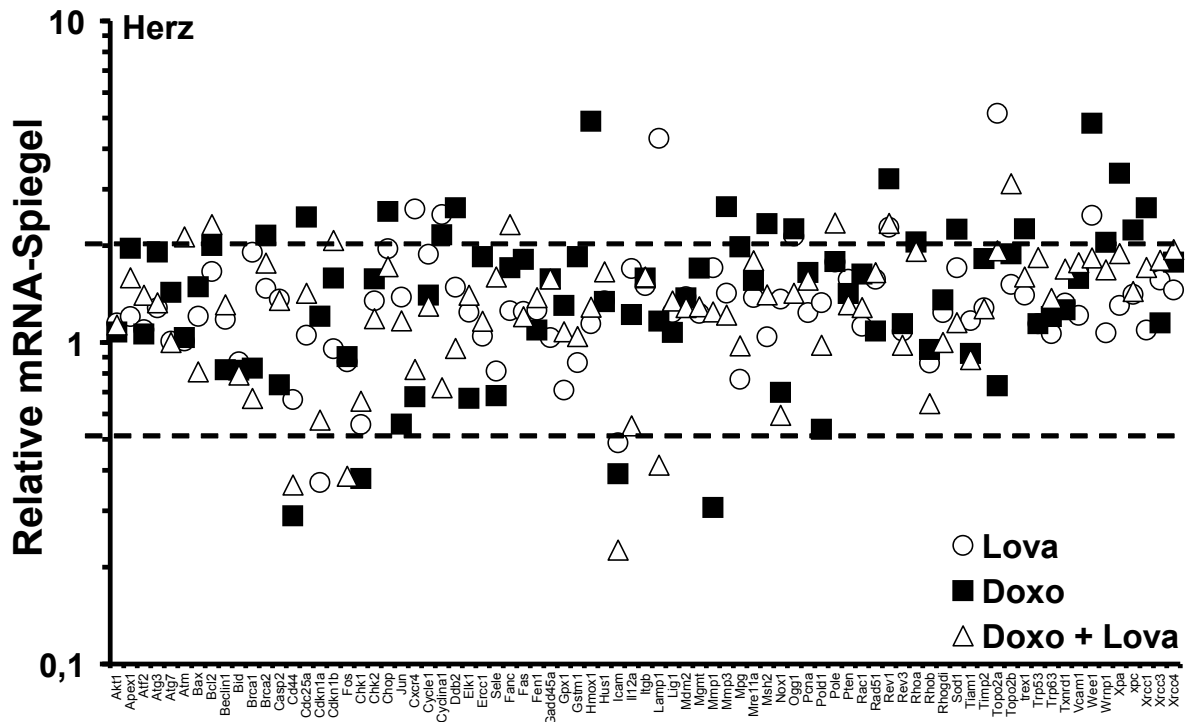
**Abbildung 48: Verifizierung der Expression ausgewählter Gene aus dem PCR-Array-Screening, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Lebern von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

## Ergebnisse

---

Anschließend wurde auch aus dem Herz isolierte mRNA wie oben beschrieben mittels „PCR-Array“ untersucht (Abbildung 49). Die Analyse zeigte, dass die Lovastatinbehandlung bei 11 % der untersuchten Gene zu einem höheren mRNA-Spiegel relativ zur Kontrollgruppe führte. 3 % der Gene waren im Vergleich zur Kontrollgruppe herunterreguliert und 86 % per Definition nicht reguliert. Wie erwartet, hatte die Statinbehandlung allein keinen Effekt auf die Expression des Großteils der untersuchten Gene. Es zeigte sich ein selektiver Statineffekt auf eine bestimmte Untergruppe von Genen dieses Arrays. Die Doxorubicinbehandlung führte bei 6 % der untersuchten Gene zu einem im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren mRNA-Spiegel. Zu 27 % waren die mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher, zu 67 % nicht reguliert. Die Monobehandlung mit Doxorubicin führte somit zu einer veränderten Expression von über 30 % der analysierten Gene. In der Kobehandlungsgruppe waren 5 % der mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe runterreguliert, 9 % wiesen einen signifikant höheren relativen mRNA-Spiegel auf und 86 % der Gene waren nicht reguliert. Im Vergleich zur Monobehandlung mit Doxorubicin wurden in Folge der Kobehandlung mit dem Statin also nur halb so viele Gene reguliert.

## Ergebnisse

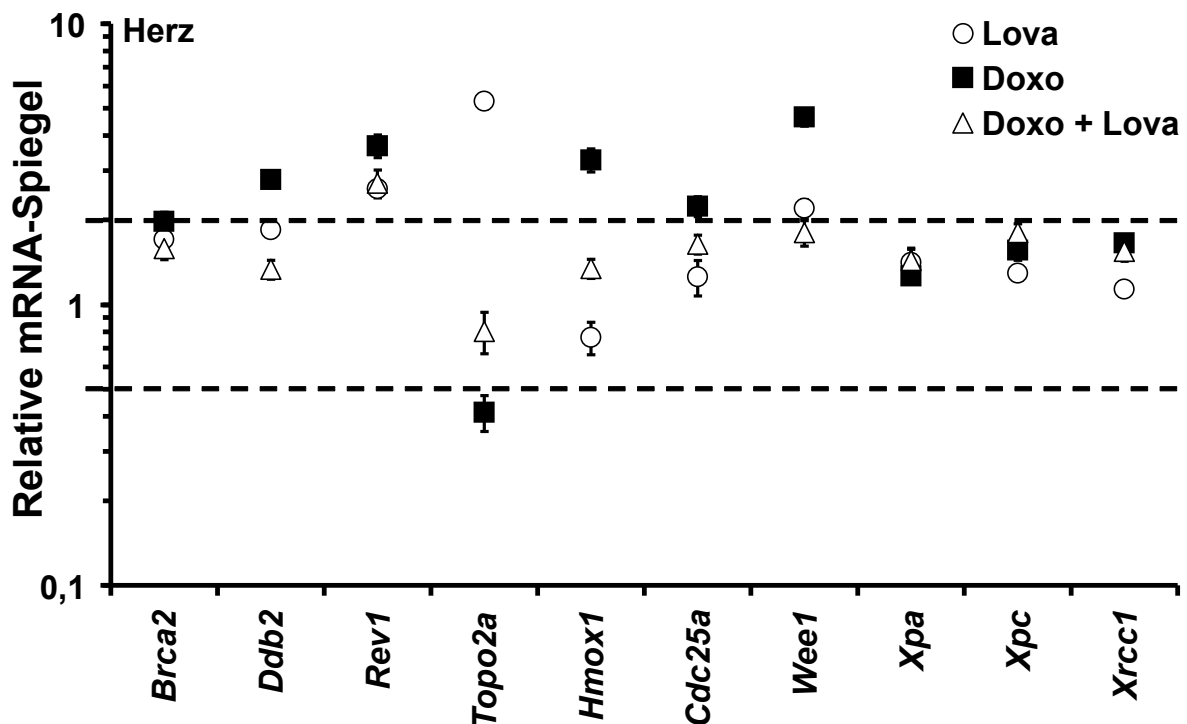


**Abbildung 49: „94-Gen-Real-Time-RT-PCR-Array“-Screening von aus Herzen isolierter mRNA, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Herzen von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert (n = 1). Dargestellt sind die behandelten Gruppen relativ zur Kontrollgruppe. Es sind ausschließlich die relativen mRNA-Spiegel derjenigen Gene dargestellt, die die Qualitätskriterien erfüllten (siehe Material und Methoden).

Auch hier wurde die Expression von ausgewählten, stark regulierten Genen mittels Real-Time-RT-PCR-Analysen in Triplikaten verifiziert. Abbildung 50 zeigt die relative Expression derjenigen Gene, deren mRNA-Spiegel durch die Behandlungen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich modifiziert wurden. Die Verifikation der im „PCR-Array“ untersuchten mRNA-Spiegel im Herz zeigte, dass sich durch die Doxorubicinbehandlung die Expression von mit DNA-Reparatur assoziierten Genen (*Brca2*, *Ddb2*, *Rev1*) verdoppelte bis verdreifachte. Die Kobehandlung mit dem Statin reduzierte diesen Anstieg. Der mRNA-Spiegel von *Topo2a* war in der mit Doxorubicin behandelten Gruppe relativ zur Kontrollgruppe geringer. Dieser Effekt wurde durch die Kobehandlung aufgehoben. Die *Hmox1*-mRNA-Menge stieg durch die Doxorubicinbehandlung an, was ebenfalls durch die Statinkobehandlung reduziert wurde. Die Doxorubicinbehandlung führte außerdem zu einem Anstieg des mRNA-Spiegels von Genen, die mit Zellzykluskontrolle assoziiert sind (*Wee1*, *Cdc25a*). Auch hier führte die Kobehandlung mit dem Statin zu einer Minderung. Die

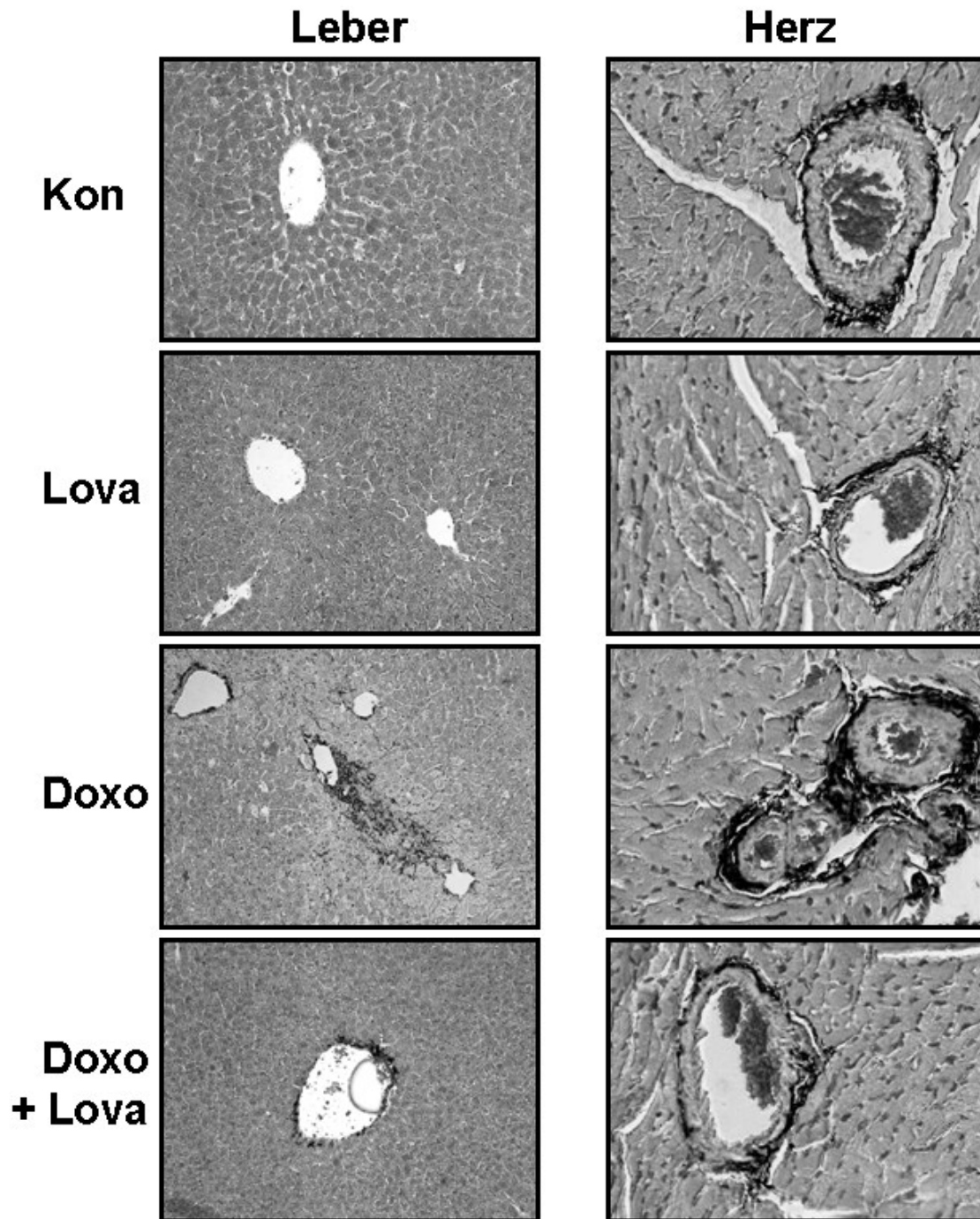
## Ergebnisse

Überprüfung der mRNA Spiegel von *Xpa*, *Xpc* und *Xrcc1* konnte das Ergebnis der mit Unikaten durchgeführten „PCR-Array“-Analyse nicht bestätigen.



**Abbildung 50: Verifizierung der mRNA-Expressionen aus dem PCR-Array-Screening, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die mRNA aus Herzen von jeweils 5 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Quantifizierung der mRNA-Mengen relativ zur Kontrolle (n = 3).

Um fibrotisches Leber- und Herzgewebe direkt sichtbar zu machen, wurden histologische Organschnitte mittels Masson-Goldner Färbung angefärbt (siehe Material und Methoden, 2.19.2). Hierbei wurden insbesondere perivaskuläre Bereiche betrachtet. In den mit Doxorubicin behandelten Tieren war eine Häufung von kollagenreichen Arealen zu sehen (Abbildung 51). In der Kobehandlungsgruppe trat diese Häufung seltener und weniger ausgeprägt auf.



**Abbildung 51: Fibrosenachweis durch Anfärbung von kollagenreichem Gewebe mittels Masson-Goldner Färbung in Leber- und Herzschnitten, 8 Tage nach der dritten Doxorubicinbehandlung.** Die Schnitte wurden wie in Material und Methoden beschrieben angefärbt. Abgebildet sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen (Leberschnitte mit 10x Vergrößerung, Herzschnitte mit 20x Vergrößerung). grau, mit Azophloxin angefärbtes Leber- / Herzgewebe; schwarz, mit Lichtgrün SF angefärbtes kollagenreiches Gewebe

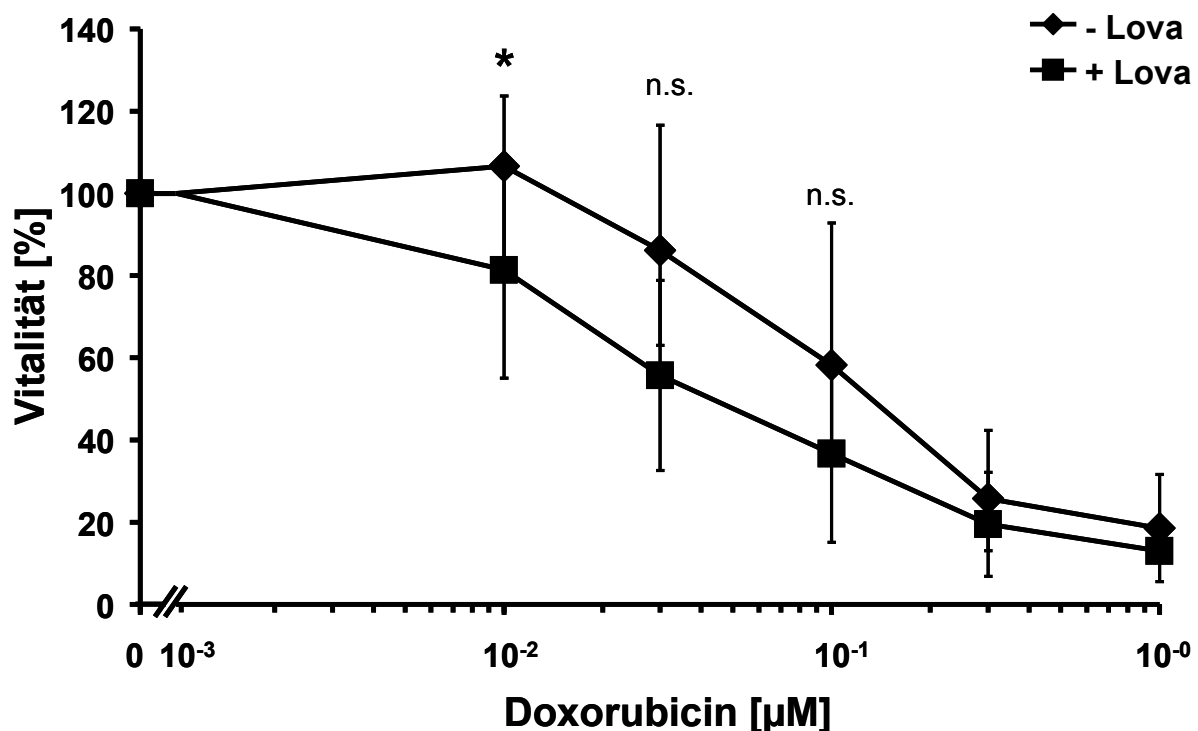
### **3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Lovastatin auf subakute Doxorubicintoxizität**

Von den analysierten Genexpressionen, die mit einer Antwort auf oxidativen Stress in Zusammenhang stehen, wurde die Doxorubicin-induzierte Hochregulation von *Hmox1* im Herzen und von *Nfe2l2* in der Leber abgeschwächt. Bei den betrachteten Xenobiotikatransportern führte sowohl in der Leber, als auch im Herzen die Doxorubicinexposition zu einer Hochregulation, auf welche die Lovastatin-Kobehandlung unterschiedliche Wirkungen hatte. Die Mäuse erlitten durch die Doxorubicinbehandlung einen schweren Leberschaden (gemessen an Gldh-, Gpt-Serumkonzentrationen), der bei der Kobehandlung mit dem Statin nicht auftrat. Das gleiche galt für Kardiotoxizität (gemessen am cTn-I-Serumspiegel). Die Lovastatin-Kobehandlung wirkte sich außerdem günstig auf das Blutbild der Tiere aus. Molekulare Marker für frühe fibrotische Ereignisse, sowie für Inflammation und Hypertrophie waren in der Leber und im Herzen nach der Doxorubicinbehandlung stark erhöht. Das Statin war auch hier in der Lage, dies zu reduzieren. Mittels „PCR-Array“-Screening wurde festgestellt, dass die mit Doxorubicin behandelten Tiere in der Leber und im Herzen eine Hochregulation der mRNA von an Zellzykluskontrolle beteiligten Faktoren, sowie von DNA-Reparatur und Fremdstoffmetabolismus assoziierten Genen aufwiesen. Am stärksten wurde *Topo2a* - ein molekularer Marker für Zellproliferation und Zielstruktur von Doxorubicin - in der Leber hochreguliert. Die Statin-Kobehandlung schwächte die Doxorubicin-induzierte Expressionserhöhung dieser Gene in der Leber in jedem Fall ab. Im Gegensatz zur Leber wurde die *Topo2a*-mRNA Menge im Herzen durch die Doxorubicinapplikation stark runterreguliert. Auch hier bewirkte die Kobehandlung mit dem Statin, dass die Expression nahe dem Kontrollniveau blieb.

### 3.9 Untersuchung zum Einfluss von Lovastatin auf das antineoplastische Potential von Doxorubicin im Xenotransplantationsexperiment

Doxorubicin wird als First-Line-Therapeutikum in der Chemotherapie von Fibrosarkomen verwendet (Spira und Ettinger, 2002). Für die Durchführung eines Xenotransplantationsexperiments wurden humane Fibrosarkomzellen (HT-1080) gewählt. Diese besitzen onkogenes Ras und sind als metastasierend beschrieben (Geiser et al., 1989; Rasheed et al., 1974).

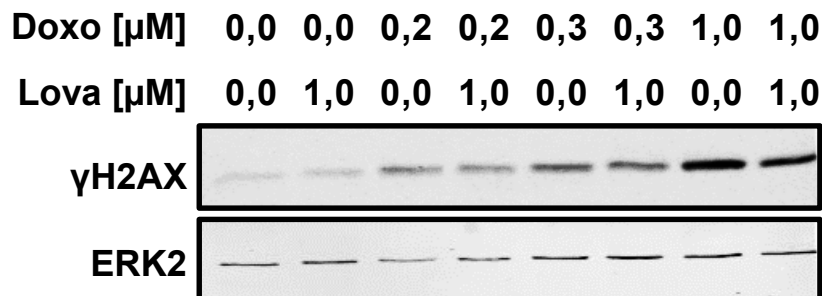
Bevor die Zellen für die Xenotransplantation verwendet wurden, wurde mittels WST-1-Assay (siehe Material und Methoden, 2.21.1) der Einfluss von Doxorubicin und Lovastatin auf die Zellvitalität *in vitro* analysiert (Abbildung 52). Die Doxorubicinbehandlung führte wie erwartet mit steigender Konzentration zu einem Verlust der Zellvitalität. Die Kobehandlung mit dem Statin hatte bei geringen Doxorubicindosen einen signifikant sensibilisierenden Effekt.



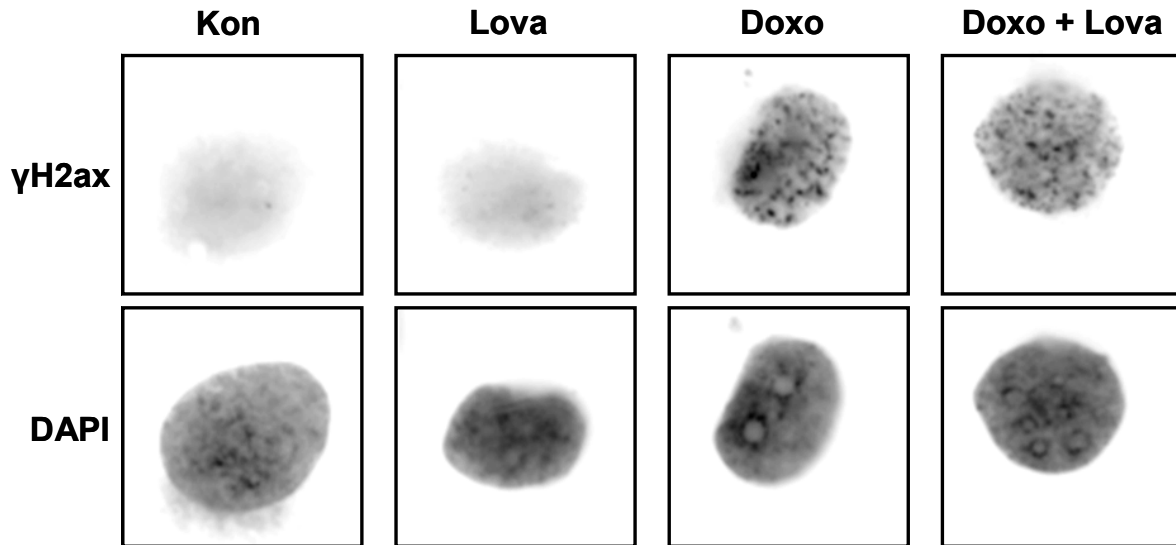
**Abbildung 52: WST-Assay zur Vitalitätsbestimmung der humanen Fibrosarkomzellen (HT-1080) *in vitro*.** Die Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben 16 h mit einer subtoxischen Lovastatinosis (1 µM) vorbehandelt und anschließend einer Pulsbehandlung (1 h) mit der jeweiligen Doxorubicinosis unterzogen (0,001-1 µM). 48 h später wurde die Zellvitalität mittels WST-Assay bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 6-7). Die jeweilige Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt (unbehandelt / nur Lovastatin-behandelt). \*, signifikanter Unterschied zwischen Lovastatinvorbehandlung (+ Lova) und keiner Vorbehandlung (- Lova) ( $p \leq 0,05$ ); n.s., nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ )

## Ergebnisse

Da die Fibrosarkomzellen nicht durch das Statin geschützt wurden, wurde angenommen, dass Lovastatin bei diesen transformierten Zellen, im Gegensatz zu primären humanen Endothelzellen und Rattenkardiomyoblasten (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011), eventuell auch keinen Einfluss auf die Doxorubicin-induzierte Phosphorylierung von  $\gamma$ H2ax hat. Um dies zu überprüfen wurde phosphoryliertes H2ax mittels Western Blot in HT-1080 Zellextrakten detektiert, (Abbildung 53) sowie  $\gamma$ H2ax-Foci immunhistochemisch nachgewiesen (Abbildung 54). Die Western Blot Analyse ergab, dass die Behandlung mit Doxorubicin zu einem dosisabhängigen Anstieg der Menge an phosphoryliertem H2ax führte. Die Vorbehandlung mit Lovastatin hatte keinen Einfluss auf diese Menge. Die mikroskopische Auswertung von  $\gamma$ H2AX-Foci in den Zellkernen der HT-1080 führte ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Lovastatin keinen Einfluss auf die Menge an phosphorylierten H2AX in den HT-1080 hatte.



**Abbildung 53: Repräsentativer Western Blot zum Nachweis von phosphoryliertem H2AX in HT-1080 Zellextrakten.** HT-1080 Zellen wurden für 16 h mit 1  $\mu$ M Lovastatin behandelt und anschließend für eine Stunde mit der jeweils dargestellten Doxorubicindosis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wie in Material und Methoden beschrieben lysiert und die Proteinextrakte mittels Western Blot analysiert. Das Bild zeigt einen repräsentativen  $\gamma$ H2AX Western Blot und das Referenzprotein ERK2.



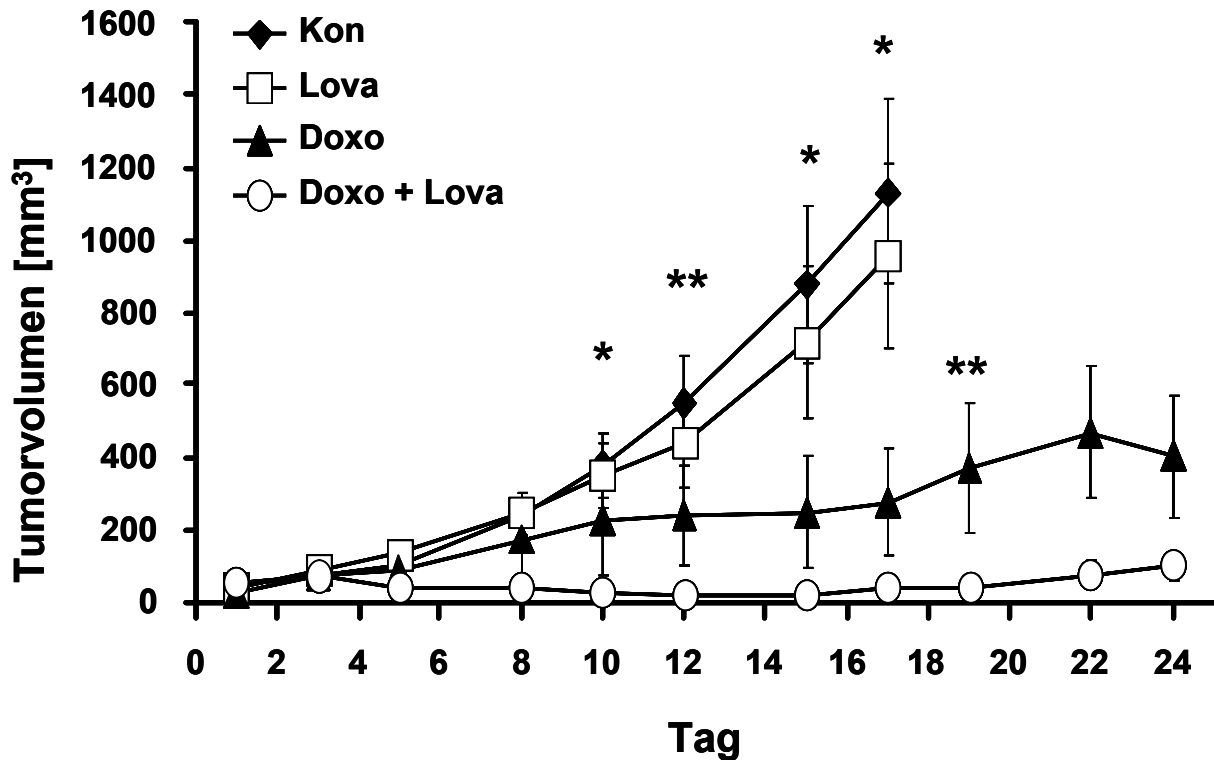
**Abbildung 54: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von H2AX-Foci in HT-1080.** HT-1080 Zellen wurden für 16 h mit 1  $\mu$ M Lovastatin behandelt und anschließend für eine Stunde mit 1  $\mu$ M Doxorubicin inkubiert. Die Anfärbung der  $\gamma$ H2AX-Foci wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (100x Vergrößerung). Die Bilder zeigen repräsentative Zellkerne.

### 3.10 Xenotransplantationsexperiment

Immundefizienten Mäusen (Rag2<sup>-/-</sup>/BALB/c) wurden  $4 \times 10^6$  humane Fibrosarkomzellen (HT-1080) subkutan injiziert. Nach fünf Tagen Inkubationszeit wurden die Tiere nach dem gleichen Schema behandelt, wie diejenigen aus dem Doxorubicin-Langzeitversuch (siehe Material und Methoden, 2.9, Abbildung 5).

Fünf Tage nach der subkutanen Injektion der Zellen in die linke und rechte Flanke der Tiere wurde mittels Messschieber alle zwei Tage das Tumolvolumen bestimmt. Dieses wurde mittels der Formel  $\frac{1}{2} \times (\text{Länge} \times \text{Breite}^2)$  abgeschätzt (Feleszko et al., 2000). In die Endauswertung gingen ausschließlich solche Tumore mit ein, die in der Woche nach der Injektion stetiges Wachstum aufwiesen (Abbildung 55). Die Monotherapie mit Lovastatin hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorstadium. Die Doxorubicinbehandlung führte wie erwartet zu einer Wachstumsinhibition, welche durch die Kombination mit Lovastatin signifikant verstärkt wurde.

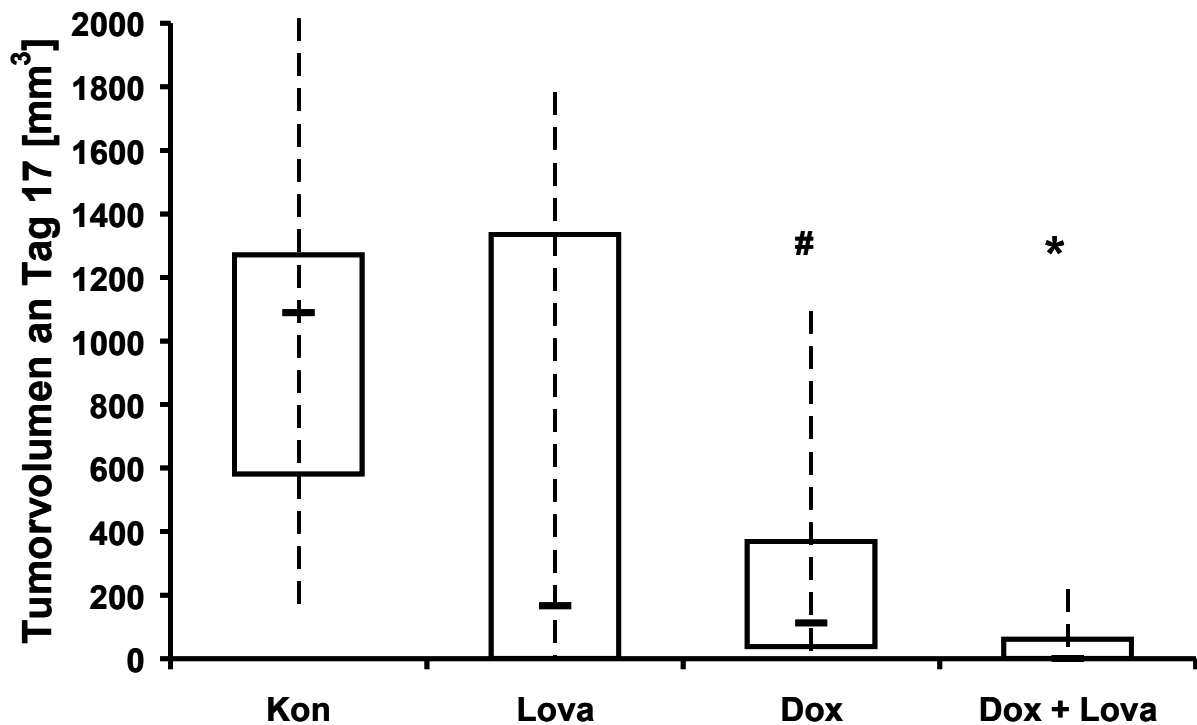
## Ergebnisse



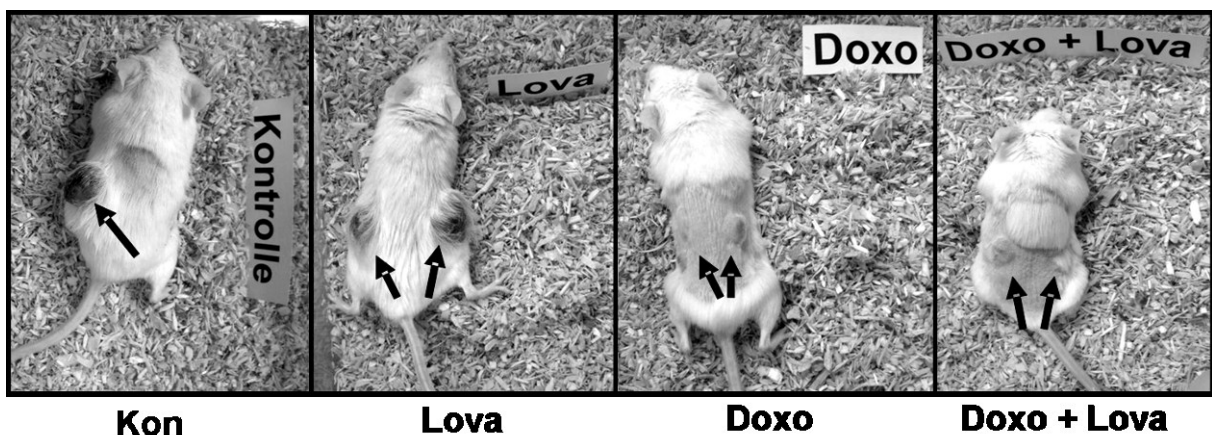
**Abbildung 55: Tumorstadium im Zeitverlauf des Xenotransplantationsversuchs.** Das Tumorstadium wurde wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. Die Doxorubicin- und Lovastatinbehandlung erfolgte identisch zum Behandlungsschema des Langzeitversuchs mit Doxorubicin (siehe Material und Methoden). Die Lovastatinbehandlung (Tag 1 und 2) begann nach fünftägiger Inkubationszeit der subkutan injizierten HT1080 Zellen ( $4 \times 10^6$  Zellen in jede Flanke). Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardfehler des Mittels (SEM). Die Experimente mit den Tieren aus der unbehandelten Gruppe und der monotherapeutisch mit Lovastatin behandelten Gruppe wurden an Tag 17 des Experiments auf Grund der Tumorstöße vorzeitig beendet. Es wurden nur diejenigen Tumore ausgewertet, die von der Injektion bis zu Tag 3 des Experiments stetiges Wachstum verzeichneten ( $n = 6-9$ ). \*, signifikanter Unterschied bei Doxo vs. Doxo + Lova ( $p \leq 0,05$ ); \*\*, hoch signifikanter Unterschied bei Doxo vs. Doxo + Lova ( $p \leq 0,01$ )

In Abbildung 56 ist das Tumorstadium an Tag 17 des Experiments (24 h nach der dritten Doxorubicinapplikation) im Detail dargestellt. Zusätzlich liefert Abbildung 57 einen optischen Eindruck der Tiere und Tumore von Tag 15 (sechs Tage nach der zweiten Doxorubicindosis). Aus Abbildung 56 geht hervor, dass die Tumorstößen in den verschiedenen Gruppen stark heterogen waren. Dennoch sah man sowohl bei den mit Doxorubicin behandelten, als auch bei den mit Lovastatin kobehandelten Tieren eine Tumorstadiumsinhibition, die durch die Kobehandlung signifikant stärker ausfiel als bei alleiniger Behandlung mit Doxorubicin. Auf den Fotos sind relativ große Tumore an den Flanken von repräsentativen Mäusen aus der Kontrollgruppe und der alleinig mit Lovastatin behandelten Gruppe zu sehen. Bei dem Tier aus der Doxorubicin-Gruppe fallen die Tumore sehr klein aus und in der Kobehandlungsgruppe ist fast nur noch Narbengewebe zu sehen.

## Ergebnisse



**Abbildung 56: Tumorzvolumen an Tag 17 des Experimentes im Detail.** Die Tumore wurden wie in Material und Methoden beschrieben vermessen (n = 6-9). Die schwarzen, horizontalen Balken geben den Median an, die Kästen repräsentieren das 25. und 75. Perzentil, die gestrichelten senkrechten Linien repräsentieren Maximum und Minimum. #, signifikanter Unterschied bei Kon vs. Doxo ( $p \leq 0,05$ ); \*, signifikanter Unterschied bei Doxo vs. Doxo + Lova ( $p \leq 0,05$ )



**Abbildung 57: Fotos von repräsentativen Rag2<sup>-/-</sup>/BALB/c Mäusen an Tag 15 des Xenotransplantationsexperiments.** Die Doxorubicin- und Lovastatinbehandlung erfolgte identisch zum Behandlungsschema des Langzeitversuchs (siehe Material und Methoden). Die Lovastatinbehandlung (Tag 1 und 2) erfolgte nach fünftägiger Inkubationszeit der subkutan injizierten HT1080 Zellen ( $4 \times 10^6$  Zellen in jede Flanke).

### **3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Xenotransplantationsexperiment**

Im Xenotransplantationsexperiment unterstützte eine Lovastatin-Kombibehandlung signifikant die antineoplastische Wirkung von Doxorubicin. Eine Monotherapie mit dem Statin erwies sich als unwirksam.

## 4 Diskussion

### 4.1 Protektive Wirkung von Lovastatin auf die Organtoxizität einer Ganzkörperbestrahlung mit ionisierender Strahlung

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden BALB/c-Mäuse mit 6 Gy Gammastrahlung ganzkörperbestrahlt und 4 h bzw. 24 h später untersucht. Die verwendete Dosis von 6 Gy entspricht in etwa der LD<sub>50</sub> bei BALB/c-Mäusen, 30 Tage nach Bestrahlung (Kinashi et al., 1997; Maisin et al., 1991; Mori et al., 1994). Für die Analyse cholesterinsenkungsunabhängiger zytoprotektiver und/oder anti-tumor Effekte von Lovastatin werden Mäuse in der Regel mit Dosen von 1 bis 16 mg x kg<sup>-1</sup> (p.o.) behandelt (Ajith et al., 2006; Alonso et al., 1998; Feleszko et al., 2000; Feleszko et al., 2002), wobei eine orale Verabreichung von 1-2 mg x kg<sup>-1</sup> dem entspricht, was Patienten zur Senkung des Cholesterinspiegels bekommen (Alonso et al., 1998). Im Zuge einer Phase I Studie zum neuroprotektiven Potential von Lovastatin bei Schlaganfällen wurde die Empfehlung ausgesprochen, beim Menschen eine tägliche Dosis von 8 mg x kg<sup>-1</sup> nicht zu überschreiten um unerwünschte Nebenwirkungen der Statintherapie zu vermeiden (Elkind et al., 2009). In einer weiteren Phase I Studie, in der das Potential von Lovastatin als Verstärker der Antitumorwirksamkeit von Chemo- und Strahlentherapien untersucht wurde, traten selbst bei Patienten, die über Wochen 25 mg x kg<sup>-1</sup> pro Tag einnahmen keine relevanten Nebenwirkungen auf (Thibault et al., 1996). Bei Mäusen liegt die LD<sub>50</sub> von Lovastatin bei > 1000 mg x kg<sup>-1</sup> (Endo, 1979). Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten wurde maximal viermal die Woche eine Dosis von 10 mg x kg<sup>-1</sup> verabreicht, die von den Tieren gut vertragen wurde und als moderate bis hohe Dosis angesehen werden kann.

Phosphoryliertes H2AX (Serin 139) ist ein etablierter Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche (Harper und Elledge, 2007; Olive, 2004; Rothkamm et al., 2003). Im Kurzzeit-Strahlungsversuch (akute IR-Toxizität) hatte die Lovastatinvorbehandlung keinen Einfluss auf den mittels Western Blot und Immunfluoreszenz gemessenen, durch ionisierende Strahlung induzierten,  $\gamma$ H2AX-Spiegel in der Leber. Dennoch waren auf mRNA-Ebene günstige Effekte der Statinvorbehandlung auf molekulare Marker für Inflammation und Fibrose erkennbar, die somit wahrscheinlich DNA-schadensunabhängig vermittelt wurden. Im subakuten Experiment, in dem die Tiere mit 2x 2,5 Gy bestrahlt wurden, waren Leber und Darm

in Bezug auf die gemessenen Inflammations- und Fibrosemarker im Gegensatz zum Kurzzeit-Experiment unauffällig. Es ist hierbei zu beachten, dass die kumulative Dosis von 5 Gy in diesem Experiment nah an die LD<sub>50</sub> einer akuten TBI heranreicht. Die drei bis viermal die Woche oral applizierte Lovastatindosis von 10 mg x kg<sup>-1</sup> wurde von den Tieren gut toleriert.

### 4.1.1 Einfluss von Lovastatin auf strahleninduzierte Leberschäden

Vier Stunden nach TBI reduzierte die Lovastatinvorbehandlung die strahleninduzierte Phosphorylierung von Nfkb1a (IκB-alpha) und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nfkb1 (Nf-kappa-b) (Ostrau et al., 2009) sowie die Erhöhung der mRNA-Spiegel von Inflammations- und Fibrosesurrogatmarkern (*Tnfa*, *Ctgf*) in der Leber. Nach der fraktionierten Bestrahlung mit 2x 2,5 Gy waren in der Leber die analog zum Kurzzeitversuch gemessenen Toxizitätspunkte unauffällig. Dies könnte mit dem regenerativen Potential der Leber zusammenhängen, da die Analyse der Leberextrakte in diesem Versuch 14 Tage nach der zweiten TBI durchgeführt wurde.

*In vitro* reduzieren Simvastatin, Pravastatin und Atorvastatin in humanen Hepatocyten den mRNA- und Proteinspiegel von Il6 (Arnaud et al., 2005). Die verminderte Expression von Il6 wird auf eine Statin-induzierte Reduktion der Rac1-Isoprenylierung zurückgeführt (McCarty, 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Statinbehandlung von HepG2 Zellen *in vitro* eine Phosphorylierung von Mdm2 bewirkt, was zu einer verringerten p53-vermittelten DNA-Schadensantwort führt (Paajarvi et al., 2005). Es gibt bisher leider keine vergleichende Literatur zur Statinwirkung auf unerwünschte Nebeneffekte einer Bestrahlung der Leber.

### 4.1.2 Einfluss von Lovastatin auf strahleninduzierte Schädigung der Lunge

14 Tage nach der zweiten TBI konnte in der Lunge eine strahleninduzierte Hochregulation von Inflammations- und Fibrosesurrogatmarkern (*Tgfb1*, *Il6*) detektiert werden, welche durch die Lovastatin-Kobehandlung geringer ausfiel. Die Lunge gilt in der Regel als relativ resistent gegenüber ionisierender Strahlung (Rubin und Casarett, 1968). Allerdings bezieht sich diese Resistenz auf lokale Einzeldosen. Bei fraktionierter Thorax- oder Ganzkörperbestrahlungen reagiert die Lunge weitaus

sensitiver. Dies spiegelt sich in der Entstehung von Lungenfibrosen wider, die zu einem kompletten Funktionsverlust des Organs führen können (Stone et al., 2003).

Die gemessene Milderung der Expression von Fibrose- und Inflammationsurrogatmarkern in der Lunge stimmt mit publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen überein. Diese zeigten, dass 15-30 Wochen nach einer Thoraxbestrahlung sowohl eine Behandlung mit Statinen, als auch eine pharmakologische Inhibition der Rho-Kinase mittels Y-27632, die Entstehung von Lungenfibrosen mindern kann (Monceau et al., 2010). In Mausexperimenten mit dem Strahlenmimetikum Bleomycin konnte eine Behandlung mit Pravastatin eine Bleomycin-induzierte Erhöhung der Expression von *Tgfb* und *Ctgf* in den Lungen der Tiere (14 Tage und 21 Tage nach Bleomycinexposition) reduzieren (Kim et al., 2010). Zusätzlich reduzierte die Pravastatinbehandlung den Tnfa-Proteinspiegel in mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnener Flüssigkeit signifikant (3, 14 und 21 Tage nach der Bleomycinbehandlung). Überträgt man diese Erkenntnisse auf den Menschen, könnte sich eine Lovastatin-Kobehandlung lindernd auf die Ausbildung von Lungenfibrosen auswirken, die aus fraktionierter Bestrahlung mit niedrigen bis moderaten Strahlendosen resultieren. Gerade im Fall der strahlenbasierten Therapie von Lungenkarzinomen könnte sich die Verträglichkeit einer Thoraxbestrahlung durch Lovastatin verbessern.

Dass im Langzeitversuch im Gegensatz zur Lunge keine Strahleneffekte in der Leber detektiert wurden, liegt möglicherweise daran, dass dieses Organ ein stärkeres regeneratives Potential hat oder die Folgeschäden (insbesondere Fibrosen) zu einem späteren Zeitpunkt als dem im Experiment gewählten auftreten. Für zukünftige Experimente sollte eine gezielte fraktionierte Organbestrahlung mit höheren kumulativen Dosen, sowie spätere Analysezeitpunkte in Betracht gezogen werden.

### 4.1.3 Einfluss von Lovastatin auf strahleninduzierte Schädigung des Darms

Im Darm, der als besonders strahlensensitiv gilt (Coia et al., 1995; Rubin und Casarett, 1968), wurde durch die Statinvorbehandlung im Kurzzeitversuch die Expression der Fibrosesurrogatmarker *Tgfb* und *Ctgf* günstig beeinflusst. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Ratten durch Statinvorbehandlung vor fibrotischen Folgeereignissen einer fraktionierten

Bestrahlung des Darms geschützt werden können (Gervaz et al., 2009; Haydont et al., 2007a; Haydont et al., 2005). Die Milderung der Fibrose wurde hierbei hauptsächlich auf die Inhibierung des Rho/ROCK-Signalweges und damit einhergehenden reduzierten Tgfb/Ctgf-abhängigen profibrotischen Ereignissen zurückgeführt. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass sich eine direkte Inhibition der Rho Kinase ähnlich günstig auswirkt, wie eine Behandlung mit Statinen (Bourgier et al., 2005; Haydont et al., 2007b).

Es wird angenommen, dass die Inhibition kleiner GTPasen, im Speziellen die Hemmung von RhoA und Rac1, zur Folge hat, dass die Expression der profibrotischen Zytokine Tgfb und Ctgf reprimiert wird, was in Folge zu einer verringerten Fibrosenbildung führt (Adam et al., 2010; Rashid et al., 2009) (Abbildung 58). Die mRNA-Expression des molekularen Fibrosemarkers *Ctgf* erwies sich allgemein als besonders robuster Marker für Zytotoxizität, der sowohl nach Bestrahlung, als auch nach Doxorubicinbehandlung (siehe unten) in verschiedenen Organen anstieg und in jedem der Fälle durch die Statinbehandlung günstig beeinflusst, also gehemmt, wurde.

Es ist zu erwähnen, dass am Ende des subakuten Experiments (14 Tage nach der zweiten TBI) keine mikroskopisch detektierbaren morphologischen Veränderungen in der Leber, dem Darm oder der Lunge auftraten. In histologischen Schnittpräparaten (Hämatoxylin/Eosin-Färbung) wurde keine Häufung apoptotischer oder nekrotischer Zellen beobachtet und auch keine Anzeichen von beginnender Inflammation oder Fibrose. Das benutzte Bestrahlungsschema führte somit unter den experimentellen Bedingungen zu keinen schwerwiegenden Organschäden. Dies bestätigten auch die im Blutserum gemessenen Leber- und Nierenparameter. Die gewählten Strahlendosen reichten jedoch aus, um die Expression der oben genannten proinflammatorischen und profibrotischen Gene zu verändern.

#### 4.1.4 Einfluss von Lovastatin auf strahleninduzierte Hämatotoxizität

Bei einer Ganzkörperbestrahlung reagieren nicht nur Darm und Lunge besonders sensitiv, sondern auch das Knochenmark (Rubin und Casarett, 1968). Im Knochenmark sind die hämatopoetischen Stammzellen permanent für die Bildung neuer Blutzellen aktiv. Da weiße Blutkörperchen einen Zellkern besitzen, nimmt ihre Zahl oder Funktionsfähigkeit sowohl durch die direkte Strahlenschädigung, als auch durch zytotoxische Wirkungen der Strahlung auf die hematopoetischen Stammzellen,

ab. Interessanterweise gehen bei einer Ganzkörperbestrahlung *in vivo* mehr Lymphozyten zu Grunde, als bei direkter Bestrahlung der gleichen Zellen *in vitro*. Dieses Phänomen wird auf unterschiedliche Aktivierung von NF $\kappa$ B1 (NF-kappa-B) und die Bildung von Stickstoffmonoxid *in vivo* und *in vitro* zurückgeführt (Sharma et al., 2010). Es ist bekannt, dass die Hemmung von kleinen GTPasen zu einer Inhibierung von NF $\kappa$ B1 und zu Hochregulation von Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) führt (Gnad et al., 2000; Sawada und Liao, 2009). Zumindest die Lymphozytenfraktion könnte durch die Lovastatinbehandlung auf diesem Wege zum Teil vor strahleninduzierter Apoptose geschützt werden.

Da die Lebensdauer von Leukozyten - zumindest im Menschen - nur wenige Tage bis Wochen beträgt, war die gemessene Reduktion von weißen Blutkörperchen in den bestrahlten Mäusen zu erwarten. Im 24 Tage dauernden Experiment kam es zu einer identischen Abnahme der Leukozytenzahlen in der bestrahlten und Lovastatin-kobehandelten Gruppe. Es gab in der mit dem Statin kobehandelten Gruppe allerdings Unterschiede im Differentialblutbild. Die Kobehandlung senkte z.B. die nach Strahlung relativ zur Kontrollgruppe erhöhte Menge an eosinophilen Granulozyten. Ein Anstieg dieser Granulozytensubpopulation tritt meist in Verbindung mit Allergien und Überempfindlichkeitsreaktionen auf (Stone et al., 2010). Es ist schwierig den Effekt der Bestrahlung und der Lovastatinbehandlung auf das Differentialblutbild zu deuten, da in der Literatur meist nur auf die absolute Zu- oder Abnahme der Gesamtfaktionen in „Vorher-/Nachheranalysen“ eingegangen wird. Da relative Werte betrachtet worden sind, muss es sich außerdem nicht zwangsläufig um einen absoluten Anstieg in den Fraktionen handeln. Die relativ erhöhten Fraktionen könnten außerdem daraus resultieren, dass diese im Vergleich zu den anderen Leukozyten durch Bestrahlung weniger geschädigt wurden. Da z.B. die Fraktion basophiler Granulozyten lediglich 0-1 % der Gesamtleukozytenpopulation beträgt, wirken sich schon geringe Schwankungen stark auf die relativen Werte aus. Thrombozyten besitzen eine ähnliche Lebensdauer wie Leukozyten, sind jedoch kernlos. Die Analyse der Thrombozytenzahlen ergab, dass die Statinkobehandlung die durch die Bestrahlung verringerte Thrombozytenzahl auf Kontrollniveau hielt. Auf eine Thrombopenie folgt in der Regel eine Überschussreaktion des Körpers, die sogar zu einer Thrombozytose führen kann (Tanum, 1984). Je nach Stärke des Knochenmarkschadens und dem Analysezeitpunkt nach Schadenssetzung, kann man also sowohl eine Erhöhung, als auch eine Reduzierung der Thrombozytenzahl

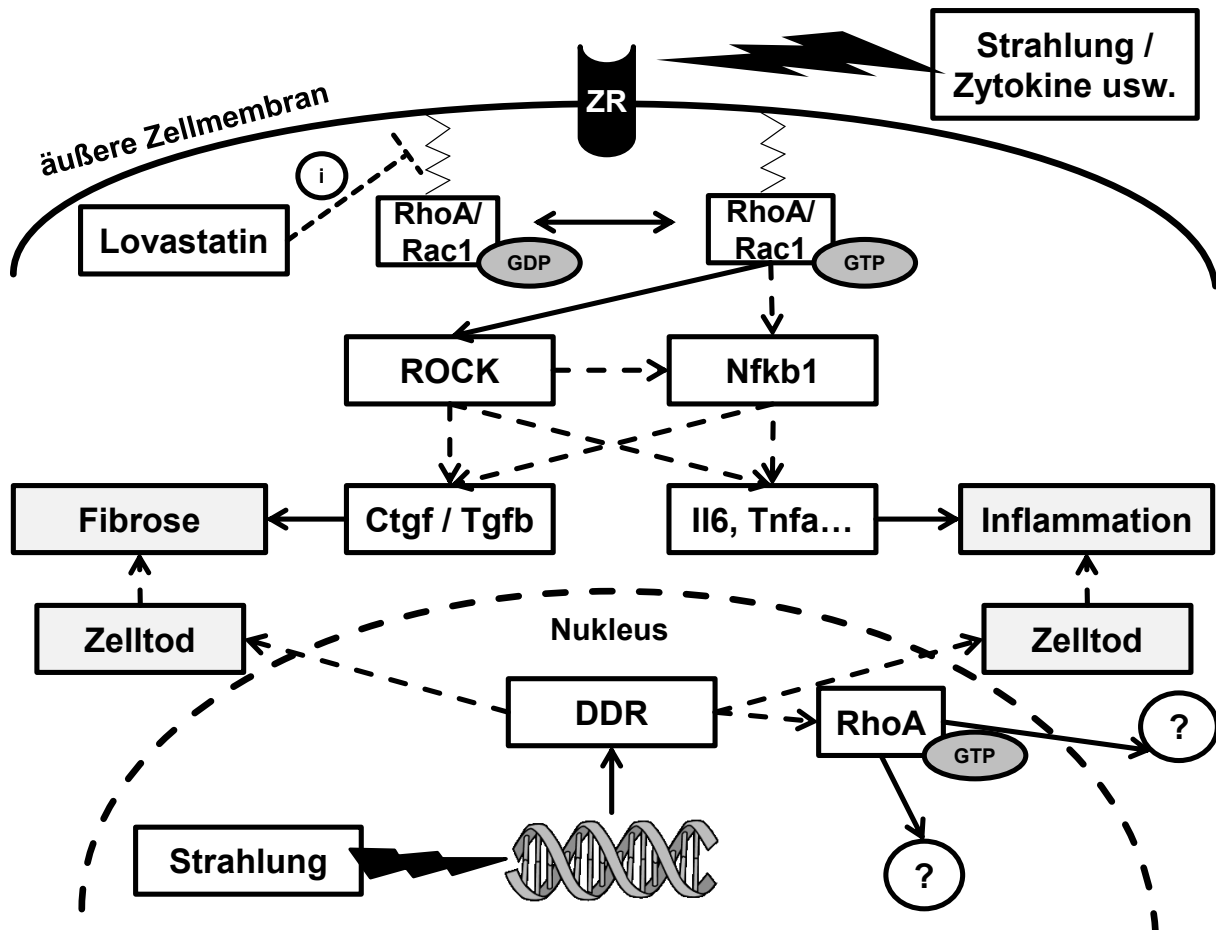
detektieren oder gar keine Veränderung. Sowohl eine Thrombozytopenie, als auch eine Thrombozytose sind schädlich für den Organismus, da eine zu geringe Zahl von Thrombozyten Blutungen begünstigen und eine zu hohe Zahl zu einer Verstopfung des Gefäßsystems führen kann. Zwei Wochen nach der letzten Strahlendosis war in der ausschließlich bestrahlten Gruppe die Thrombozytenzahl relativ zur Kontrollgruppe verringert. In der Gruppe, die mit dem Statin kobehandelt wurde, blieb die Zahl hingegen auf Kontrollniveau. Es wäre möglich, dass die Statinbehandlung selektiv die Vorläuferzellen von Thrombozyten (Megakaryoblasten) schützt, aber nicht die von Leukozyten. Alternativ könnte sich die Behandlung mit Lovastatin auf die Abschnürung der Thrombozyten von Megakaryozyten ausgewirkt haben. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnliche Thrombozytenzahl in der Lovastatin-kobehandelten Gruppe könnte jedoch auch daraus resultieren, dass eine kompensierende Überschussreaktion in der kobehandelten Gruppe bereits stattgefunden hat. Statine besitzen zwar antithrombotische Wirkung (Tailor et al., 2004; Undas et al., 2002), es sind allerdings nur sehr wenige Fälle beschrieben, in denen die Standard-Statintherapie Thrombopenien ausgelöst oder verstärkt hat (Vrettos et al., 2010).

### **4.2 Modulation organspezifischer DNA-Schadensantwort durch Lovastatin nach Ganzkörperbestrahlung**

Die Inhibierung der Funktion kleiner GTPasen in Verbindung mit Bestrahlung (IR), einer Behandlung mit Doxorubicin oder Etoposid führt dazu, dass - wie im HUVEC-Modell gezeigt - die DNA-Schadensantwort (DDR) modifiziert wird (Damrot et al., 2006; Nubel et al., 2006). Lovastatin verminderte in diesen Experimenten z.B. die durch die Noxen induzierte Stabilisierung des Tumorsuppressors TRP53 und von p21 (CDKN1A). Das Statin reduzierte außerdem die erhöhte Aktivität von AKT, CHEK1, NFKB1 und SAPK/JNK. Auf Ebene des DNA-Schadens konnte in den Bestrahlungsexperimenten mit HUVEC gezeigt werden, dass die Behandlung mit Lovastatin zwar die Stressantwort nach DNA-Schädigung reduziert, sich aber nicht auf die Menge an initialen DNA-Schäden oder die Reparaturkapazität der Zellen auswirkt (Nubel et al., 2006). Für vaskuläre glatte Muskelzellen ist hingegen beschrieben, dass eine Statinvorbehandlung *in vivo* zu einer beschleunigten DNA-Reparatur nach Bestrahlung führen kann (Mahmoudi et al., 2008). In einer Studie an

Arteriosklerosepatienten wurde festgestellt, dass genomische Schäden in Folge von atherosklerotischen Plaques durch eine Simvastatinbehandlung reduziert werden können. Die Behandlung mit dem Statin wirkte hierbei der Häufigkeit von Schwesterchromatidaustausch entgegen (Pernice et al., 2006). Zusammengefasst gibt es Hinweise, dass Statine nicht nur als Modulatoren der DNA-Schadensantwort agieren können, sondern auch die genomische Stabilität positiv beeinflussen können.

In jüngster Zeit wurde beschrieben, dass die kleinen regulatorischen GTPasen RhoA und Rac1 nicht nur im Zytosol und an der inneren Zellmembran lokalisiert sein können, sondern auch im Zellkern. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die kleine GTPase RhoA bei Strahlenexposition im Zellkern akkumuliert und über den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) Net1 im Nukleus aktiviert werden kann (Dubash et al., 2011). Es wird daher angenommen, dass RhoA in der Modulation der DDR involviert sein könnte (Abbildung 58). Es ist bisher allerdings nicht bekannt wodurch der Transport von RhoA in den Kern vermittelt wird. Die Verhinderung der Verankerung von RhoA in der inneren Zellmembran durch die Statinbehandlung könnte einen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen zytosolischem und nukleärem RhoA haben und somit dessen Rolle in der DDR modifizieren. Auf mögliche Funktionen von kernständigem Rac1 wird später näher eingegangen, da sie wahrscheinlich größere Relevanz bei Doxorubicin-induzierten DNA-Schäden haben (siehe 4.6).



**Abbildung 58: Modell der Minderung von DDR, Inflammation und Fibrose als Folge von RhoA- und Rac1-Inhibition durch Lovastatin.** ZR, Zellrezeptoren; Rac1, „ras-related C3 botulinum toxin substrate 1“ („rho family, small GTP binding protein Rac1“); RhoA, „ras homolog gene family, member A“; GDP, Guanosindiphosphat; GTP, Guanosintriphosphat; Ctgf, „connective tissue growth factor“; Tgfb, „transforming growth factor beta; Il6, Interleukin 6; Tnfa, „tumor necrosis factor alpha“); Nfkb1, „nuclear factor kappa B“; DDR, „DNA damage response; i, inhibiert; ?, unbekannter Effekt; gestrichelt, indirekter Effekt

### 4.3 Protektive Wirkung von Lovastatin auf die Organtoxizität einer Behandlung mit Doxorubicin

Bei Mäusen liegt die LD<sub>50</sub> von Doxorubicin bei einmaliger intraperitonealer Verabreichung bei ~11 mg x kg<sup>-1</sup> (MSDS, „Material Safety Datasheet“, Bedford Laboratories). Die verwendeten 10 mg x kg<sup>-1</sup> im Kurzzeitversuch waren also nah an der LD<sub>50</sub> und sind somit als hohe Dosis anzusehen. Die schwerwiegendsten Nebenwirkungen einer Doxorubicinbehandlung bei Mensch und Tier sind dilatatorische Effekte auf das Herz. Doch ähnlich wie bei der Behandlung mit ionisierender Strahlung kommt es auch zu unspezifischer Inflammation und Fibrose im gesamten System. Nach Kardiotoxizität werden Knochenmarksdepression (Harris

et al., 1975) und Hepatotoxizität (El-Sayyad et al., 2009; Kalender et al., 2005; Kimura et al., 2000; Llesuy und Arnaiz, 1990) als die relevantesten unerwünschten Nebenwirkungen einer Chemotherapie mit Doxorubicin beschrieben. Die Leber ist insbesondere dann von der Toxizität von Doxorubicin betroffen, wenn bereits eine Vorschädigung, z.B. durch eine Hepatitisinfektion, vorliegt (King und Perry, 2001). Gleichzeitig ist dieses Organ auch der Ort, an dem Statine metabolisch aktiviert werden und ihre größte Wirkung auf den Mevalonatweg haben.

In Versuchen mit Rattenkardiomyoblasten (H9c2) konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sich die Protektion vor Doxorubicin-induziertem DNA-Schaden durch Lovastatin auf eine Hemmung von Rac1 zurückführen lässt und unabhängig von reaktiven Sauerstoffspezies ist (Huelsenbeck et al., 2011). Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass klinisch günstige, von der Cholesterinsenkung unabhängige, Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren hauptsächlich auf die Inhibition von Rac1 zurückgeführt werden können (Rashid et al., 2009). Die Regulierung von Rac1 hat mannigfaltige Bedeutungen für die Zelle. Neben der Remodulation des Zytoskeletts wirkt sie sich auf die Funktion der NADPH Oxidase (Heyworth et al., 1993; Mizuno et al., 1992), von Nf-κB (Montaner et al., 1998; Sulciner et al., 1996), ERK (Laboureau et al., 2004), PI3K (Bokoch et al., 1996; Du et al., 2011; Murga et al., 2002; Tolia et al., 1995), p38 (Katsoulidis et al., 2005), JNK (Coso et al., 1996; Minden et al., 1995) sowie AKT aus (Jiang et al., 2003; Murga et al., 2002) und somit auf Proliferation, Apoptose und Überleben der Zelle (Brown et al., 2006; Walker und Olson, 2005).

### 4.3.1 Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierte Hepatotoxizität

Im Kurzzeit- wie im Langzeitversuch schützte die Statin- oder Kobehandlung vor Doxorubicintoxizität in der Leber. Dies spiegelte sich in einer reduzierten Expression von Inflammations- und Fibrosesurrogatmarkern wider, sowie in geringeren Blutplasmaspiegeln von Leberenzymen und in einer reduzierten Zahl an perivaskulären kollagenreichen Arealen in Färbungen von histologischen Schnittpräparaten. Diese protektiven Effekte der Statinbehandlung könnten zum Teil auf einer Reduktion des Doxorubicin-induzierten DNA-Schadens beruhen, da bei Vorbehandlung mit dem Statin weniger phosphoryliertes H2ax Protein detektiert werden konnte, als in der ausschließlich mit Doxorubicin behandelten Gruppe. Eine Reduktion des initialen Doxorubicin-induzierten DNA-Schadens wurde *in vitro* bei

Versuchen mit HUVEC und H9c2 Zellen ebenfalls beobachtet (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011). In Übereinstimmung mit den Daten aus der Leber kam es auch bei diesen *in vitro* Versuchen zu einer ca. 50 %igen Abnahme der detektierten Menge an phosphoryliertem H2ax Protein, wenn die Zellen mit Lovastatin vorbehandelt wurden. Da die Phosphorylierung von H2AX an Serin 139 nur ein indirekter Marker für DNA-Doppelstrangbrüche ist, wurde der DNA-Schaden in den Experimenten mit H9c2 zusätzlich mittels neutralem Comet Assay nachgewiesen, was die Ergebnisse aus der  $\gamma$ H2AX-Detektion bestätigte (Huelsenbeck et al., 2011). Wie bereits für ionisierende Strahlung beschrieben (siehe 4.1 und 4.2), kann eine Statinbehandlung grundsätzlich sowohl DNA-schadensabhängige, als auch DNA-schadensunabhängige Stressantworten der Leber verringern. Es ist darum schwierig zu differenzieren, zu welchem Anteil die protektiven Effekte des Statins auf einer DNA-Schadensprävention, einer Modifikation der DNA-Schadensantwort oder der Reduktion der Stressantwort beruhen.

Die Detektion zytotoxischer Effekte einer Doxorubicinbehandlung auf die Leber hat praktische Bedeutung für die Klinik. Leberwerte werden während einer Chemotherapie permanent kontrolliert, um bei Bedarf die Zytostatikadosis zu reduzieren oder die Therapie auszusetzen. Die Doxorubicinbehandlung führte im Langzeitversuch acht Tage nach der letzten Doxorubicinapplikation zu einem im Vergleich zur Kontroll- und Kobehandlungsgruppe deutlichen Anstieg der GPT und GLDH Serumspiegel. Beide Enzyme sind klinisch etablierte Routinemarker zur Diagnose von Leberschäden und bieten den stärksten Beweis für die hepatoprotektive Wirkung der Statinbehandlung. Die Statinbehandlung allein ergab bei keinem der gemessenen Endpunkte Hinweise auf Hepatotoxizität. Dies war zu erwarten, da Statine – wie aus ihrer klinischen Anwendung bei Hypercholesterinämie bekannt – als nicht hepatotoxisch gelten und selbst wenn eine Lebererkrankung vorliegt, sogar eher heilungsfördernd wirken können (Bader, 2010).

Eine Abschwächung von unspezifischen inflammatorischen Prozessen in der Leber durch Statine wurde erst in jüngerer Zeit beschrieben (Calisto et al., 2010; Moreno et al., 2009). Die Behandlung mit Atorvastatin senkte die durch Sepsis erhöhten Spiegel von Tnfa und Il6, sowie die durch Angiotensin II-induzierte Expression von Il6 und Icam1. *In vitro* hemmen Statine in Leberzellen die von Interleukin 6 vermittelte Synthese von CRP (Arnaud et al., 2005; Mayer et al., 2007) und die Angiotensin II-induzierte Expression von Icam1, Tgfb, Il8 und pro-Kollagen I (Moreno et al., 2009).

Diese Befunde zum antiinflammatorischen und antifibrotischen Charakter einer Statinbehandlung stimmen mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit vorgestellten Kurzzeit- und Langzeitversuche mit Doxorubicin und Lovastatin überein. Zum Einfluss von Statinen auf Doxorubicin-induzierte Hepatotoxizität liegen zurzeit noch keine publizierten Befunde vor. Das hepatoprotektive Potential von Lovastatin bei einer Behandlung mit Doxorubicin ist in dieser Studie erstmalig gezeigt.

Ließen sich diese Daten auf den Menschen übertragen, könnte man durch die Gabe von Statinen die therapeutische Breite von Doxorubicin möglicherweise erhöhen. Man darf dabei jedoch nicht außer Acht lassen, dass Leberschäden nur bedingt die Toxizität von Doxorubicin auf das Normalgewebe widerspiegelt, da Hepatotoxizität nicht den klinisch relevanten, dosislimitierenden Faktor darstellt.

### 4.3.2 Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität

Kardiotoxizität ist der bedeutsamste dosislimitierende Faktor bei einer Doxorubicin-basierten Chemotherapie (Chlebowski, 1979). Die molekularen Mechanismen der Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität sind nach wie vor unklar. Als Ursache wird z.B. die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (Simunek et al., 2009) und die Interaktion mit Topoisomerase II beta im Herzen diskutiert (Lyu et al., 2007). In der Leber und in *in vitro* Experimenten mit HUVEC und H9c2 (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011) konnte der Schutzeffekt des Statins vor Doxorubicin-induzierter Zytotoxizität und Apoptose auf eine Reduzierung des initialen DNA-Schadens, sowie auf die Modifikation der DNA-Schadensantwort zurückgeführt werden. Eine mögliche Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies wurde dabei ausgeschlossen (Huelsenbeck et al., 2011).

Anders als bei der Leber war es beim Herz der Mäuse nicht möglich das phosphorylierte H2ax Protein mittels Western Blot oder Immunfärbung nachzuweisen. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass die Doxorubicinbehandlung in den Herzen keine Doppelstrangbrüche verursacht hat. Die Prozedur zur Analyse phosphorylierter Proteine aus Mäuseherzen mittels Western Blot erwies sich als schwierig. Davon unabhängig könnte der in den Herzen induzierte DNA-Schaden unterhalb des Detektionslimits des Analyseverfahrens liegen.

Im 24-tägigen Versuch führte die Doxorubicinbehandlung zu einem Anstieg verschiedener Marker für Kardiotoxizität, welche sämtlich durch die Statinbehandlung gemildert wurden. Die Statinkobehandlung zeigte beispielsweise günstige Effekte auf die Expression von Hypertrophie- und Fibrosesurrogatmarker. Ursächlich hierfür könnte die Verringerung der Prenylierung der kleinen GTPasen RhoA und Rac1 sein. Die Entstehung von Hypertrophie im Herz durch Angiotensin II-Überexpression, Überdruck oder oxidativen Stress kann durch die Reduktion von Rac1-vermittelter Signaltransduktion verhindert werden (Laufs et al., 2002; Liao, 2004; Nakagami et al., 2003). Die Prävention einer beginnenden Fibrose durch Lovastatin könnte eine Auswirkung der Hemmung des „RhoA / Rac1 → CTGF Signalweges“ sein, wie bereits für die Strahlenversuche beschrieben (siehe 4.3.1). Außerdem ist davon auszugehen, dass zumindest ein Teil des Schutzeffekts der Statinbehandlung auf geringerem initialen DNA-Schaden beruht, wie es die Ergebnisse aus der Leber, den H9c2 Zellen und den HUVEC nahelegen.

Ein erhöhter Wert von kardialem Troponin I im Serum gilt als spezifischer Marker für Herzschäden nach einem Herzinfarkt, operativen Eingriffen am Herzen oder Behandlung mit Anthrazyklinen (Antman et al., 1996; Gaze und Collinson, 2005; Kerr et al., 2009). Vier Stunden nach der dritten Doxorubicinbehandlung wurde ein erhöhter Serumwert von ca.  $1,6 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$  detektiert. Bei Kobehandlung mit Lovastatin blieb diese Erhöhung komplett aus. Eine Arbeitsgruppe, die das Serum von CD-1 Mäusen 24 h nach einer Doxorubicinapplikation von  $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  (i.p.) analysiert hat, detektierte cTn-I-Serumspiegel von  $\sim 1,4 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$  (Ascensao et al., 2005). Bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom sinkt die Überlebensrate signifikant ab Troponin I-Serumwerten von  $>0,4 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$  (Antman et al., 1996). Werte  $>0,2 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$  werden als Hinweis auf einen akuten Myokardinfarkt gesehen (Barber et al., 2007). Die Höhe des in den BALB/c-Mäusen gemessenen Serumspiegels kann also als Surrogatmarker für einen schweren Herzschaden angesehen werden.

Die Verwendung von Statinen zur Kardioprotektion vor und während einer Doxorubicintherapie erscheint als besonders attraktiv, da Statine seit langem klinisch als Lipidsenker etabliert und gut verträglich sind. Sie könnten gegebenenfalls zulassungsüberschreitend zur Unterstützung antineoplastischer Therapien eingesetzt werden, ohne die Notwendigkeit aufwendiger prä-klinischer und klinischer Studien. Außerdem böten sie eine Alternative zu Dexrazoxan, das wegen der Bildung von Sekundärtumoren (Tebbi et al., 2007), dem ungeklärten Mechanismus seiner

kardioprotektiven Wirkung (Hasinoff und Patel, 2009) und möglichem negativen Einfluss auf den Therapieerfolg umstritten ist (Swain und Vici, 2004).

Im Langzeitversuch konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Lovastatinbehandlung einen Einfluss auf das antioxidative Potential der Organe hatte, sowie Xenobiotikamembrantransporterexpression stimulierte. Ein Einfluss auf diese Transporter wäre während einer Doxorubicintherapie eher unerwünscht, da sich das zytotoxische Potential von Doxorubicin auf Tumorzellen durch Inhibierung von Importern oder Stimulation von Exportern verringern könnte. Um diese oder andere Möglichkeiten auszuschließen, wurde ein Xenotransplantationsexperiment durchgeführt.

#### **4.4 Mögliche Einflüsse von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies**

In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wird inzwischen wie selbstverständlich auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies als herzscheidender Mechanismus von Doxorubicin verwiesen. Dabei ist die Beweislage für ROS als Ursache bei klinisch relevanten Doxorubicindosen nach wie vor schwach. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann eine Statinbehandlung durch Hemmung von Rac1 zur Inhibition der NADPH Oxidase und NFkB1 führen (Cheng et al., 2006; Delbosc et al., 2002; Gao et al., 2010; Miyano et al., 2006). Yoshida et al., (2009) konnten zeigen, dass sowohl bei der Vorbehandlung mit Pitavastatin, als auch durch direkte Rac1-Inhibition mittels NSC23766, Rattenkardiomyozyten vor Doxorubicin-induzierter Zytotoxizität geschützt werden. Dies wurde auf eine Reduktion des oxidativen DNA-Schadens zurückgeführt. Bei mildernden Wirkungen von Statinen auf Inflammation wird häufig auf ihr antioxidatives Potential verwiesen (Hayashi et al., 2005; Kowalski et al., 2004). In den Experimenten mit HUVEC und H9c2 konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen von Yoshida et al. (2009) gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies bei klinisch relevanten Doxorubicindosen ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) keine Rolle spielen. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Vielzahl publizierter Daten, die zusammengefasst belegen, dass reaktive Sauerstoffspezies in diesem Konzentrationsbereich gar nicht erst entstehen (Gewirtz, 1999).

*In vivo* konnte nach Applikation von  $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  Doxorubicin kein Effekt auf die Expression der Gene, die für antioxidative Enzyme und deren Regulatoren kodieren detektiert werden. Nur im Herzen kam es zu einer Hochregulation der Expression von Hämoxxygenase I, die von der Lovastatinbehandlung nicht beeinflusst wurde. Im Langzeitversuch wurde im Herzen ebenfalls eine leichte Hochregulation von *Hmox1* beobachtet. Sämtliche andere Marker der antioxidativen Zellantwort blieben unverändert. In der Leber wurde unter den analysierten molekularen Marken für antioxidative Zellantworten nur *Nfe2l2* durch die Doxorubicinbehandlung hochreguliert und durch die Kobehandlung mit Lovastatin gemildert. *Nfe2l2* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription von antioxidativen Enzymen reguliert. Die Expression dieser Enzyme war jedoch trotz höherer Expression von *Nfe2l2* nicht beeinflusst. Selbst wenn *in vivo* nach Applikation der hohen Doxorubicindosis ( $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ ) reaktive Sauerstoffspezies entstanden sein sollten, bleibt ihre Relevanz fraglich und der beobachtete Schutzeffekt von Lovastatin wahrscheinlich von ihnen unabhängig.

Reaktive Sauerstoffspezies wirken nicht ausschließlich zytotoxisch; bei intrinsischer Produktion in geringen physiologischen Mengen dienen sie außerdem als Signalmoleküle, die unter anderem Thyrosinphosphatasen inhibieren (Aslan und Ozben, 2003; D'Autreaux und Toledano, 2007). In intermediären Konzentrationen können sie den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B1 aktivieren (Gloire et al., 2006). NF-kappa-B wird typischerweise rezeptorvermittelt aktiviert und ist in der Modulation des Immunsystems und in inflammatorischem Geschehen involviert (Hayden et al., 2006). Es ist bekannt, dass eine Behandlung mit Doxorubicin NF $\kappa$ B1 induzieren kann (Karin et al., 2002).

*In vivo* führte die Kobehandlung mit Lovastatin sowohl in den Strahlungsexperimenten, als auch in den Experimenten mit Doxorubicin zu einer auf molekularer Ebene detektierten verminderten inflammatorischen Antwort. In Experimenten mit HUVEC verhinderte die Lovastatinvorbehandlung eine Doxorubicin-induzierte Degradation des NF $\kappa$ B1-Repressors NF $\kappa$ BIA (I-kappa-B-alpha) (Damrot et al., 2006) und somit eine Aktivierung von NF $\kappa$ B1. Es ist bekannt, dass durch Inhibition kleiner GTPasen die zytokinrezeptorvermittelte und/oder Zytotoxin-induzierte Aktivierung von NF $\kappa$ B1 geringer ausfallen bis ausbleiben kann (Bardeleben et al., 2002; Damrot et al., 2006; Das und White, 1997; Gnad et al.,

2001; Tago et al., 2010). Einer Induktion von NF $\kappa$ B1 wird in der Regel eine antiapoptotische Rolle zugeschrieben (Wang et al., 1996). Im Gegensatz dazu hat eine Inhibition von NF $\kappa$ B1 in Glioblastomzellen zur Folge, dass weniger Doxorubicin-induzierte Apoptose auftritt (Karl et al., 2009). Je nach Zelltyp und schädigendem Agens führt eine Aktivierung von NF $\kappa$ B1 nicht zwangsläufig zur Inhibition von Apoptose, sondern kann Apoptose unter Umständen sogar verstärken.

Da NF $\kappa$ B1 sowohl nach DNA-Schädigungen, als auch durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert werden kann, könnte die beobachtete geringere NF $\kappa$ B1-Aktivität in Folge einer Statinbehandlung aus einer reduzierten DNA-Schadensmenge und/oder aus durch Rac1-Inhibition verminderter ROS-Produktion stammen. Unabhängig davon ob reaktive Sauerstoffspezies nun eine Rolle für die Doxorubicintoxizität spielen oder nicht, könnte eine Statinbehandlung sowohl die Entstehung, als auch die Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies mildern.

### **4.5 Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierten Zellzyklusarrest**

Doxorubicin löst in klinisch relevanten Dosen einen Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus proliferierender Zellen aus und in supraklinischen Dosen einen G1-Arrest (Barlogie et al., 1976; Krishan und Frei, 1976). Für Lovastatin ist in transformierten Zellen ab einer Dosis von 2-10  $\mu$ M die Induktion eines reversiblen G1-Arrests beschrieben und bei relativ hohen Dosen (> 50  $\mu$ M) zusätzlich G2-Arrest (Jakobisiak et al., 1991). Während Topoisomerase II beta in allen Phasen des Zellzyklus mehr oder weniger gleich exprimiert wird, wird Topoisomerase II alpha hauptsächlich in der S-Phase exprimiert (Capranico et al., 1992; Goswami et al., 1996). Dies ist wahrscheinlich der Hauptgrund dafür, dass Doxorubicin primär stark proliferierende Zellen schädigt. Da Topoisomerase II alpha in der G1-Phase nur in geringem Maße exprimiert wird, könnte ein Statin-induzierter, reversibler G1-Arrest in teilungsaktiven, nicht-transformierten Zellen zu einer geringeren Zahl von Doxorubicin-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen führen. Der Zelle würde außerdem durch den bereits etablierten Zellzyklusarrest mehr Zeit für die DNA-Reparatur gegeben werden. Die Vergrößerung des Zeitfensters für eine erfolgreiche DNA-Reparatur könnte die Entscheidung der Zelle zwischen Apoptose und Überleben in Richtung Überleben verschieben. Dass eine Statinbehandlung im Gegensatz dazu die meisten

transformierten Zellen nicht schützt, liegt möglicherweise daran, dass diese häufig eine atypische Aktivität kleiner GTPasen aufweisen (z.B. onkogenes Ras). Darauf kann zumindest partiell ihre Chemoresistenz und Überlebensfähigkeit beruhen.

Bei den zu schützenden Normalgewebszellen handelt es sich in der Regel nicht um proliferierende Zellen (von proliferierenden Leberzellen nach Schädigung und hämatopoetischen Stammzellen abgesehen). Dennoch wurde auf Expressionsebene sowohl nach der Doxorubicin-, als auch nach der Lovastatinbehandlung ein Anstieg der Expression von Zellzyklusassoziierten Genen in Leber und Herz detektiert. Lovastatin modifizierte hierbei die Doxorubicin-induzierten Expressionsänderungen. Die biologische Relevanz dieser Veränderung bleibt unklar und es gibt zur Zeit keine vergleichbaren Publikationen. Die Expressionsänderung dieser Gene könnte jedoch mit der Initiation der DDR in Zusammenhang stehen.

### **4.6 Mögliche Einflüsse von Lovastatin auf Topoisomerase II-Isoformen**

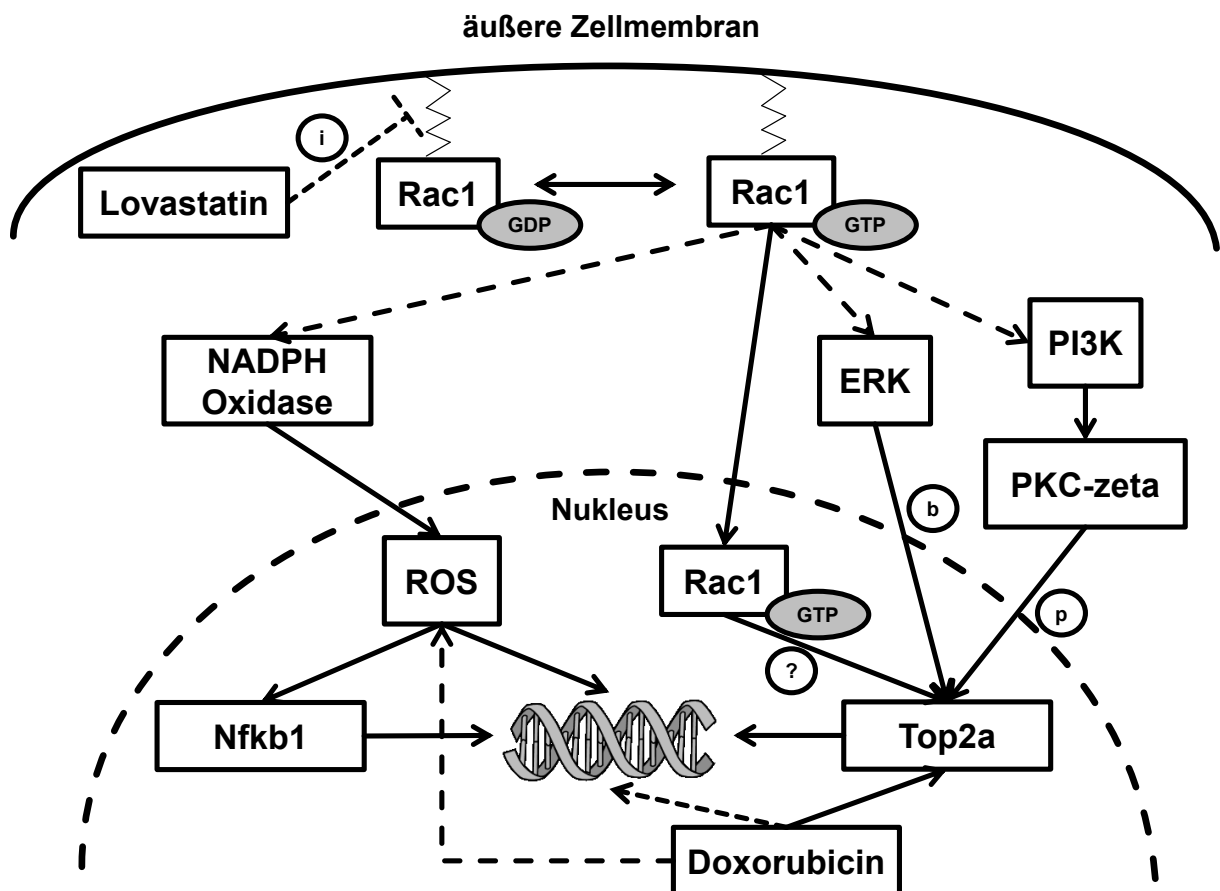
Die Statinkobehandlung schützte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht vor der Entstehung von gammastrahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (siehe 4.1 und 4.2). Im Gegensatz dazu wurde Anhand von Experimenten mit HUVEC und Ratten Kardiomyoblasten (H9c2) gezeigt, dass Lovastatin die Menge an initialen, durch Doxorubicin oder Etoposid verursachten DNA-Doppelstrangbrüchen reduzieren kann und in Folge dessen der Anteil an apoptotischen Zellen verringert wird (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011). In den Mäuselebern aus dem akuten Doxorubicin-Experiment sah man analog zu den *in vitro* Experimenten mit HUVEC und H9c2 einen ähnlichen genprotektiven Effekt des Statins. Es ist anzunehmen, dass dieser spezifische Effekt auf einer bisher nicht charakterisierten Beeinflussung von Topoisomerase II Isoformen durch Lovastatin beruht. Dies wird dadurch bekräftigt, dass die Statinbehandlung *in vitro* sowohl bei einer Doxorubicinbehandlung, als auch bei einer Behandlung mit Etoposid ähnliche protektive Effekte zeigte (Huelsenbeck et al., 2011). Anders als Doxorubicin interkaliert Etoposid weder in die DNA, noch generiert es reaktive Sauerstoffspezies und ist somit ein spezifischerer Topoisomerase II Inhibitor (van Maanen et al., 1988). Auf Expressionsebene hatte sowohl die Doxorubicin-, als auch die Lovastatinbehandlung, in der Leber und im Herzen einen Einfluss auf die Menge an

Topoisomerase II alpha mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je mehr TOP2A von Zellen exprimiert wird, umso sensitiver reagieren sie in der Regel auf Topoisomerase II-Gifte wie Doxorubicin (Brown et al., 1995; Burgess et al., 2008). Hinzu kommt, dass Topoisomerase II alpha ein Marker für Proliferation ist (Konstantinidou et al., 2001) und erhöhte Expression somit auch ein Hinweis auf Geweberegeneration sein kann. Sowohl die Doxorubicinbehandlung, als auch die Lovastatinbehandlung führte je nach Behandlungsschema und betrachtetem Organ zu unterschiedlicher Änderung der *Top2a*-Expression in Herz und Leber. In den *in vitro* Versuchen mit Rattenkardiomyoblasten wurde auf Proteinebene kein Einfluss vom Statin auf den Top2a-Proteinspiegel detektiert (Huelsenbeck et al., 2011). Der Schutzeffekt des Statins lässt sich also wahrscheinlich nicht einfach dadurch erklären, dass die Statinbehandlung die basale oder Doxorubicin-induzierte Expression von Top2a auf mRNA oder Proteinebene mindert.

Topoisomerasen sind im Zellkern lokalisiert und kleine GTPasen, deren Aktivierung durch Statine inhibiert wird, in der Regel an der inneren Zellmembran. Darum galt es bisher als unwahrscheinlich, dass kleine GTPasen direkt mit Topoisomerasen interagieren können. Für die kleinen GTPasen RhoA und Rac1 wurde jedoch vor kurzem die Möglichkeit einer Kerntranslokation beschrieben. Wird Rac1 an der inneren Zellmembran aktiviert, kann es mit Hilfe des Kernimportproteins Karyopherin alpha 2 in den Zellkern transportiert werden (Sandrock et al., 2010). Bei Immunpräzipitation von kernständigem Rac1 wurde unter anderem mit Rac1 assoziierte Topoisomerase II alpha detektiert. Laut den publizierten Daten, kann nur an der Zellmembran aktiviertes Rac1 in den Zellkern transportiert werden. Es ist vorstellbar, dass die Inhibition der Aktivierung von Rac1 durch Statine dazu führt, dass eine geringe Menge aktives Rac1 in den Zellkern transloziert. Die fehlende Interaktion von aktivem Rac1 mit Topoisomerase II alpha könnte dann dazu führen, dass Doxorubicin nicht mehr irreversibel an dieses Enzym binden kann und somit weniger spaltbare Komplexe („cleavable complexes“) und als Konsequenz weniger DNA-Doppelstrangbrüche entstehen. Auf die möglichen Funktionen von kernständigem RhoA in Zusammenhang mit ionisierender Strahlung wurde bereits weiter oben eingegangen (siehe 4.2).

Unabhängig von einer möglichen direkten Interaktion mit Enzymen der Topoisomerase II Familie, besitzt Rac1 nachgeschaltete Effektoren (z.B. PI3-Kinasen), die ebenfalls mit Topoisomerasen interagieren können. So phosphoryliert

z.B. PKC-zeta, ein der PI3K nachgeschalteter Effektor, Topoisomerase II Isoformen (Filomenko et al., 2002; Plo et al., 2002). ERK1/2 modifiziert Topoisomerasen direkt und unabhängig von Phosphorylierung (Rodriguez und Crespo, 2011). Eine Störung dieser Signalkaskaden in Folge der Inhibition von Rac1 könnte dazu führen, dass die Bindung von Doxorubicin an Topoisomerase II nur noch eingeschränkt möglich ist. Der Schutz vor Doxorubicin-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen durch Lovastatin könnte somit auf der Prävention von Rac1-vermittelten direkten und indirekten Modifikationen der Topoisomerase II beruhen (Abbildung 59).



**Abbildung 59: Modell der molekularen Mechanismen des protektiven Effekts von Lovastatin vor Doxorubicin-induzierten DNA-Schäden via Rac1 Inhibition.** Rac1, ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1); GDP, Guanosindiphosphat; GTP, Guanosintriphosphat; NADPH, Nicotinamidadeninukleotidphosphat; ERK, extrazellulär regulierte Kinasen; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinasen; PKC-zeta, Proteinkinase C zeta; ROS, reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygene species“); Nfkb1, Nuclear factor kappa B; Top2a, Topoisomerase II alpha; b, bindet; p, phosphoryliert; ?, unbekannter Effekt; gestrichelt, indirekter Effekt

### **4.7 Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierte Zytotoxizität im Xenotransplantationsexperiment**

Bei einer Doxorubicin-Chemotherapie in Verbindung mit Lovastatin hätte die Statinbehandlung nicht nur im Normalgewebe, sondern auch in entarteten Zellen inhibitorische Wirkung auf kleine GTPasen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Statine verschiedene transformierte Zelllinien gegenüber Chemotherapeutika sensitivieren können (Agarwal et al., 1999a; Agarwal et al., 1999b; Fritz, 2005; Gao et al., 2010; Podhorecka et al., 2010; Taylor-Harding et al., 2010). Zum Nachteil des Patienten wäre, wenn die Statinbehandlung nicht nur gesundes Gewebe, sondern auch die entarteten Zellen vor Doxorubicin-induzierter Zytotoxizität schützen würde. Die Kobehandlung mit Lovastatin zeigte im Xenotransplantationsexperiment jedoch keinerlei negative Effekte auf die antineoplastische Wirkung von Doxorubicin. Die Tumore reagierten im Gegenteil sogar signifikant sensitiver auf die Doxorubicinbehandlung. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Daten von anderen publizierten Xenotransplantationsversuchen in denen Lovastatin die antineoplastischen Effekte von Doxorubicin auf Melanome, Fibrosarkome, Colon- und Lungenkarzinome *in vivo* verstärkte (Feleszko et al., 2000; Feleszko et al., 2002). Diese Experimente belegten darüber hinaus ebenfalls, dass Lovastatin sich nicht als monotherapeutisches Chemostatikum eignet.

### **4.8 Ausblick**

In zukünftigen Versuchen mit ionisierender Strahlung sollte angestrebt werden, die kumulative Strahlendosis zu erhöhen, indem gezielt nur einzelne Organe, wie Darm, Lunge und Leber fraktioniert bestrahlt werden. In dem Zusammenhang wäre auch die Analyse eines organspezifischen, konditionellen Rac1- und/oder RhoA-Knockoutsystems von Interesse. Ein interessanter pharmakologischer Ansatz für künftige *in vivo* Versuche wäre, mit bisher klinisch nicht etablierten Rac1-Inhibitoren zu arbeiten, sofern diese von den Tieren gut vertragen würden. Damit könnte der aus den Experimenten mit H9c2 gesicherte Befund, dass die DNA-protectiven Effekte des Statins auf einer Rac1-Inhibition beruhen, *in vivo* verifiziert werden

Damit der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies *in vivo* für den protectiven Effekt des Statins komplett ausgeschlossen werden kann und um abzusichern, dass die Eigenschaft von Doxorubicin als Topoisomeraseinhibitor die größte Rolle beim

Schutz vor DNA-Doppelstrangbrüchen durch Lovastatin spielt, sollten ähnliche Tierversuche mit dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid durchgeführt werden. Um die Verbindung zwischen einer Rac1-Inhibition und der Wirksamkeit von Topoisomerase II-Giften zu untermauern wäre eine direkte *in vitro* Messung der Zu- und Abnahme von spaltbaren Komplexen („cleaveable complexes“) in Folge einer Exposition mit Doxorubicin und Etoposid in Verbindung mit Statinen oder Rac1-Inhibitoren ein sinnvoller Analyseendpunkt.

Um ausschließen zu können, dass die beobachteten protektiven Effekte ausschließlich bei der Kombination von Lovastatin und Doxorubicin auf Grund von nicht charakterisierten Besonderheiten dieser Substanzen auftreten, sollten verschiedene Statinderivate zusammen mit verschiedenen Doxorubicinderivaten getestet werden. Statt eines pharmakologischen Ansatzes mit den „schmutzigen“ Statinen, könnten zudem die molekularen Ziele der Inhibition – insbesondere RhoA und Rac1 – spezifisch mittels „Knockout“- oder „Knockdown“-Modellen *in vitro* sowie *in vivo* untersucht werden.

Die molekularen Mechanismen, die den Schutzeffekt des Statins vermitteln, sollten durch *in vitro* Experimente näher untersucht werden. Insbesondere eine Translokation von Rac1 und RhoA in den Zellkern und die direkten und indirekten Auswirkungen von Rac1 auf die Topoisomerasen, sowie von Rac1 und RhoA auf *Ctgf*-Expression.

Um eingrenzen zu können, wie relevant der Schutzeffekt der Statine auf Ebene der DNA-Schadensantwort oder auf Ebene von rezeptorvermittelter Apoptose ist, sollte in Zukunft *in vitro* die Wirkung von Statinen und Inhibitoren kleiner Rho-GTPasen auf Substanzen untersucht werden, die ausschließlich DNA-Schäden verursachen bzw. ausschließlich rezeptorvermittelte Apoptose auslösen. Für das erstere ist ionisierende Strahlung nur bedingt geeignet, da die durch Ionisierung von Wasser entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies nicht nur die DNA, sondern sämtliche Zellkomponenten schädigen und sogar Membranrezeptoren aktivieren können (Dent et al., 2003). Als Alternative böte sich z.B. das zytolethal-distendierende Toxin („cytolethal distending toxin“, CDT) an. Dieses Toxin gelangt in den Zellkern und führt dort auf Grund seiner DNase I-ähnlichen Aktivität Doppelstrangbrüche in die DNA ein, ohne darüber hinaus bekannte Einflüsse auf die Zelle zu haben (Jinadasa et al., 2011). Um den Einfluss der Inhibition kleiner GTPasen auf rezeptorvermittelte

## Diskussion

---

Apoptose näher zu untersuchen, könnte man (entkernte) Zellen mit Zytokinen der TNF- oder TGF-Familie stimulieren.

### 5 Zusammenfassung

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) sind klinisch etablierte Cholesterinsenker, die bei üblichen lipidsenkenden Konzentrationen nur selten unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen. Über die Inhibition der intrinsischen Cholesterinbiosynthese hinaus zeigen Statine jedoch auch sogenannte pleiotrope Effekte, die in einer Vielzahl biologischer Antworten münden. Ein Großteil dieser Wirkungen wird auf die Inhibition kleiner Rho-GTPasen (Rho = „ras homolog“) zurückgeführt, die einen weiteren Effekt der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase darstellt.

*In vitro* schützt das älteste Statinderivat Lovastatin (Lova) primäre humane Endothelzellen (HUVEC) vor der Zytotoxizität von ionisierender Strahlung (IR) und Doxorubicin (Doxo) (Bardeleben et al., 2002; Damrot et al., 2006; Nubel et al., 2006). Die Übertragbarkeit dieses Befundes auf ein *in vivo* Mausmodell sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Dafür wurden BALB/c-Mäuse mit ionisierender Strahlung oder Doxorubicin behandelt ( $\leq 48$  h mit jeweils einer einzelnen hohen Dosis sowie über 24 Tage mit mehreren geringen Dosen) und der Einfluss einer Kobehandlung mit Lovastatin auf verschiedene Toxizitätsendpunkte untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Statinbehandlung unter den gewählten experimentellen Bedingungen Normalgewebe vor Doxorubicin- und strahleninduzierter Toxizität schützt, ohne gleichzeitig protektiv auf transformierte Zellen zu wirken. Dieser Effekt ist wahrscheinlich von einer Inhibition der Funktion der kleinen GTPasen Rac1 und RhoA und einer daraus folgenden Modifizierung der DNA-Schadensantwort abhängig, jedoch vermutlich unabhängig vom antioxidativen Potential oder der Cholesterinsenkung.

Im Kurzzeitversuch hatte die Statinvorbehandlung der Mäuse keinen Einfluss auf die Bildung von initialen strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in der Leber. Lovastatin wirkte sich jedoch auf strahleninduzierte Stressantworten aus, was sich in einer Minderung der Expression von Inflammations- und Fibrosesurrogatmarkern in Leber und Darm widerspiegelte.

Bei fraktionierter Ganzkörperbestrahlung über einen Zeitraum von 24 Tagen wurde in der Lunge der Tiere ein Anstieg von molekularen Inflammations- und Fibrosesurrogatmarkern detektiert, der ebenfalls bei Statinkobehandlung ausblieb.

## Zusammenfassung

---

Zudem verhinderte die Kobehandlung mit Lovastatin eine strahleninduzierte Abnahme der Thrombozytenzahl, ohne sich auf die verringerte Leukozytenzahl im Blut auszuwirken. Die Analyse des Differentialblutbilds ergab, dass die Strahlenexposition eine Zunahme der Fraktion eosinophiler Granulozyten zur Folge hatte, die bei Kobehandlung mit dem Statin nicht auftrat. Insgesamt zeigte sich ein selektiver und organspezifischer Schutzeffekt der Statinbehandlung vor IR-induzierter Normalgewebstoxizität.

Die intraperitoneale Verabreichung einer hohen Dosis Doxorubicin induzierte DNA-Doppelstrangbrüche in der Leber, deren Menge durch die Statinvorbehandlung um ca. 50 % reduziert wurde. Dieser genoprotektive Effekt war unabhängig von einer Änderung des Doxorubicinimports oder -exports. Die Expression von Genen, die für Xenobiotikatransporter kodieren oder für Proteine, die mit Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Zusammenhang stehen, wurde durch die Kobehandlung mit Lovastatin nicht beeinflusst. Die Expression von proinflammatorischen und profibrotischen Genen fiel besonders in der Leber und im Herzen durch die Lovastatin-Kobehandlung geringer aus, als in der nur mit Doxorubicin behandelten Gruppe. Zudem verringerte Lovastatin die durch Doxorubicin induzierte Hochregulation von für den AP1-Komplex kodierenden Genen sowie von Zellzykluskontrollfaktoren. Die Lovastatinvorbehandlung führte darüber hinaus im Herzen zu einem reduzierten mRNA-Spiegel der Topoisomerasen II alpha und beta.

Im 24-tägigen Experiment, in dem die Mäuse wiederholt mit Doxorubicin behandelt wurden, konnten schwere Herz- und Leberschäden detektiert werden (gemessen an Gldh-, Gpt- sowie cTn-I-Serumkonzentrationen), die bei einer Kobehandlung mit dem Statin nicht auftraten. Die Lovastatin-Kobehandlung verhinderte eine Doxorubicin-induzierte Abnahme der Leukozytenzahl. Molekulare Marker für frühe fibrotische Ereignisse, sowie für Inflammation und Hypertrophie waren in der Leber und im Herzen nach der Doxorubicinbehandlung stark erhöht. Das Statin war auch hier in der Lage, diese toxischen Wirkungen des Anthrazyklins zu mindern. Auch die Doxorubicin-induzierte Expression von Surrogatmarkern für Zellantworten auf oxidativen Stress wurde in der Leber abgeschwächt. Die mit Doxorubicin behandelten Tiere wiesen außerdem in der Leber und im Herzen eine Hochregulation der mRNA von an der Zellzykluskontrolle beteiligten Faktoren sowie

## Zusammenfassung

---

von DNA-Reparatur und Fremdstoffmetabolismus assoziierten Genen auf. Am stärksten wurde Topoisomerase II alpha (Top2a) - ein molekularer Marker für Zellproliferation und bedeutsame Zielstruktur von Doxorubicin - in der Leber hochreguliert. Die Statin-Kobehandlung verhinderte all diese Doxorubicin-induzierten Expressionsänderungen partiell bis komplett. Im Gegensatz zur Leber wurde die Top2a-mRNA Menge im Herzen durch die Doxorubicinapplikation stark runterreguliert. Auch hier bewirkte die Kobehandlung mit dem Statin, dass die Expression nahe dem Kontrollniveau blieb.

In einem Xenotransplantationsexperiment unterstützte die Statinbehandlung das antineoplastische Potential von Doxorubicin.

Erkenntnisse aus vorhergegangenen *in vitro* Versuchen mit HUVEC und H9c2 konnten zum somit großen Teil auf das Mausmodell übertragen werden. Sie stehen im Einklang mit Ergebnissen anderer Gruppen, welche die Inhibition kleiner GTPasen mit einer geringeren, durch zytotoxische Substanzen induzierten, Inflammation und Fibrose korrelieren konnten. Eine Kobehandlung mit Lovastatin während einer Krebstherapie erscheint somit als vielversprechende Möglichkeit Doxorubicin- oder strahleninduzierte Nebenwirkungen auf Normalgewebe zu mildern, während die antineoplastische Wirksamkeit der Therapeutika verstärkt wird.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adam, O., Lavall, D., Theobald, K. et al. Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and n-cadherin expression in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 55, 469-80 (2010).
- Adams, J. E., 3rd, Bodor, G. S., Davila-Roman, V. G. et al. Cardiac troponin i. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 88, 101-6 (1993).
- Adams, M. J., Lipshultz, S. E., Schwartz, C. et al. Radiation-associated cardiovascular disease: Manifestations and management. *Seminars in radiation oncology* 13, 346-56 (2003).
- Adamson, P., Marshall, C. J., Hall, A. et al. Post-translational modifications of p21rho proteins. *The Journal of biological chemistry* 267, 20033-8 (1992).
- Agarwal, B., Bhendwal, S., Halmos, B. et al. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 5, 2223-9 (1999a).
- Agarwal, B., Rao, C. V., Bhendwal, S. et al. Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology* 117, 838-47 (1999b).
- Agarwal, S., Tafel, A. A. & Kanaar, R. DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA repair* 5, 1075-81 (2006).
- Aguda, B. D. A quantitative analysis of the kinetics of the g(2) DNA damage checkpoint system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11352-7 (1999).
- Ajith, T. A., Harikumar, K. B., Thasna, H. et al. Proapoptotic and antitumor activities of the hmg-coa reductase inhibitor, lovastatin, against dalton's lymphoma ascites tumor in mice. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 366, 322-8 (2006).
- Alonso, D. F., Farina, H. G., Skilton, G. et al. Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast cancer research and treatment* 50, 83-93 (1998).
- Antman, E. M., Tanasijevic, M. J., Thompson, B. et al. Cardiac-specific troponin i levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine* 335, 1342-9 (1996).
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G. et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *s. Peuceetius* var. *Caesius*. Reprinted from *biotechnology and bioengineering*, vol. Xi, issue 6, pages 1101-1110 (1969). *Biotechnology and bioengineering* 67, 704-13 (2000).
- Ardati, A., Stolley, P., Knapp, D. E. et al. Statin-associated rhabdomyolysis. *Pharmacoepidemiology and drug safety* 14, 287 (2005).

## Literaturverzeichnis

---

- Arnaud, C., Burger, F., Steffens, S. et al. Statins reduce interleukin-6-induced c-reactive protein in human hepatocytes: New evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1231-6 (2005).
- Arnold, D. E., Gagne, C., Niknejad, N. et al. Lovastatin induces neuronal differentiation and apoptosis of embryonal carcinoma and neuroblastoma cells: Enhanced differentiation and apoptosis in combination with dbcamp. *Mol Cell Biochem* 345, 1-11 (2010).
- Arora, R., Liebo, M. & Maldonado, F. Statin-induced myopathy: The two faces of janus. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 11, 105-12 (2006).
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J. et al. Endurance training attenuates doxorubicin-induced cardiac oxidative damage in mice. *International journal of cardiology* 100, 451-60 (2005).
- Aslan, M. und Ozben, T. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxidants & redox signaling* 5, 781-8 (2003).
- Bader, T. The myth of statin-induced hepatotoxicity. *The American journal of gastroenterology* 105, 978-80 (2010).
- Banath, J. P., Klokov, D., MacPhail, S. H. et al. Residual gammaH2ax foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC cancer* 10, 4 (2010).
- Bar-Sagi, D. und Hall, A. Ras and rho gtpases: A family reunion. *Cell* 103, 227-38 (2000).
- Barber, M., Morton, J. J., Macfarlane, P. W. et al. Elevated troponin levels are associated with sympathoadrenal activation in acute ischaemic stroke. *Cerebrovascular diseases* 23, 260-6 (2007).
- Bardeleben, R. V., Dunkern, T., Kaina, B. et al. The hmg-coa reductase inhibitor lovastatin protects cells from the antineoplastic drugs doxorubicin and etoposide. *International journal of molecular medicine* 10, 473-9 (2002).
- Bardou, M., Barkun, A. & Martel, M. Effect of statin therapy on colorectal cancer. *Gut* 59, 1572-85 (2010).
- Barlogie, B., Drewinko, B., Johnston, D. A. et al. The effect of adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid cell line. *Cancer research* 36, 1975-9 (1976).
- Bellosta, S., Ferri, N., Bernini, F. et al. Non-lipid-related effects of statins. *Annals of medicine* 32, 164-76 (2000).
- Berkey, F. J. Managing the adverse effects of radiation therapy. *American family physician* 82, 381-8, 394 (2010).
- Berndt, N., Hamilton, A. D. & Sebt, S. M. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 11, 775-91 (2011).

## Literaturverzeichnis

---

- Berroeta, C., Provenchere, S., Mongredien, A. et al. [the use of cardiac troponins (t or i) measurement in cardiology and various clinical settings]. *Ann Fr Anesth Reanim* 25, 1053-63 (2006).
- Bjorkhem-Bergman, L., Acimovic, J., Torndal, U. B. et al. Lovastatin prevents carcinogenesis in a rat model for liver cancer. Effects of ubiquinone supplementation. *Anticancer Res* 30, 1105-12 (2010).
- Blackwell, T. S. und Christman, J. W. Sepsis and cytokines: Current status. *Br J Anaesth* 77, 110-7 (1996).
- Blum, R. H. und Carter, S. K. Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Annals of internal medicine* 80, 249-59 (1974).
- Bokoch, G. M. und Der, C. J. Emerging concepts in the ras superfamily of gtp-binding proteins. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7, 750-9 (1993).
- Bokoch, G. M., Vlahos, C. J., Wang, Y. et al. Rac gtpase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *The Biochemical journal* 315 ( Pt 3), 775-9 (1996).
- Bos, J. L. Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer research* 49, 4682-9 (1989).
- Bourgier, C., Haydont, V., Milliat, F. et al. Inhibition of rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 54, 336-43 (2005).
- Brown, G. A., McPherson, J. P., Gu, L. et al. Relationship of DNA topoisomerase ii alpha and beta expression to cytotoxicity of antineoplastic agents in human acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Cancer research* 55, 78-82 (1995).
- Brown, J. H., Del Re, D. P. & Sussman, M. A. The rac and rho hall of fame: A decade of hypertrophic signaling hits. *Circulation research* 98, 730-42 (2006).
- Burgess, D. J., Doles, J., Zender, L. et al. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9053-8 (2008).
- Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A. et al. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26, 883-91 (2005).
- Calisto, K. L., Carvalho Bde, M., Ropelle, E. R. et al. Atorvastatin improves survival in septic rats: Effect on tissue inflammatory pathway and on insulin signaling. *PLoS one* 5, e14232 (2010).
- Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C. A. et al. Different patterns of gene expression of topoisomerase ii isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochimica et biophysica acta* 1132, 43-8 (1992).

## Literaturverzeichnis

---

- Chang, L., Kiriazis, H., Gao, X. M. et al. Cardiac genes show contextual swi/snf interactions with distinguishable gene activities. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 6, 760-8 (2011).
- Chen, C., Mireles, R. J., Campbell, S. D. et al. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors with *abcb1*, *abcc2*, and *oatp1b1*. *Drug Metab Dispos* 33, 537-46 (2005).
- Chen, Q. M., Tu, V. C., Purdon, S. et al. Molecular mechanisms of cardiac hypertrophy induced by toxicants. *Cardiovasc Toxicol* 1, 267-83 (2001).
- Cheng, G., Diebold, B. A., Hughes, Y. et al. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by *rac1*. *The Journal of biological chemistry* 281, 17718-26 (2006).
- Chlebowski, R. T. Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: A review. *West J Med* 131, 364-8 (1979).
- Choi, H. S., Park, E. S., Kang, H. J. et al. Dexrazoxane for preventing anthracycline cardiotoxicity in children with solid tumors. *Journal of Korean medical science* 25, 1336-42 (2010).
- Coia, L. R., Myerson, R. J. &Tepper, J. E. Late effects of radiation therapy on the gastrointestinal tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31, 1213-36 (1995).
- Coleman, C. N. Modulating the radiation response. *Stem cells* 14, 10-5 (1996).
- Coso, O. A., Teramoto, H., Simonds, W. F. et al. Signaling from g protein-coupled receptors to c-jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric g proteins acting on a ras and *rac1*-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 271, 3963-6 (1996).
- Crawford, D. R. und Davies, K. J. Adaptive response and oxidative stress. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10, 25-8 (1994).
- D'Autreaux, B. und Toledano, M. B. Ros as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ros homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 813-24 (2007).
- Damrot, J., Nubel, T., Epe, B. et al. Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. *Br J Pharmacol* 149, 988-97 (2006).
- Das, K. C. und White, C. W. Activation of *nf-kappab* by antineoplastic agents. Role of protein kinase c. *The Journal of biological chemistry* 272, 14914-20 (1997).
- Davignon, J., Jacob, R. F. &Mason, R. P. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis* 15, 251-8 (2004).
- Deepa, P. R. und Varalakshmi, P. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chem Biol Interact* 146, 201-10 (2003).

## Literaturverzeichnis

---

- Delbosc, S., Morena, M., Djouad, F. et al. Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors, are able to reduce superoxide anion production by nadph oxidase in thp-1-derived monocytes. *Journal of cardiovascular pharmacology* 40, 611-7 (2002).
- Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J. et al. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiation research* 159, 283-300 (2003).
- Di Paolo, G. und Kim, T. W. Linking lipids to alzheimer's disease: Cholesterol and beyond. *Nature reviews. Neuroscience* 12, 284-96 (2011).
- Dietschy, J. M. und Weis, H. J. Cholesterol synthesis by the gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition* 24, 70-6 (1971).
- Dimarco, A., Gaetani, M., Orezzi, P. et al. 'Daunomycin', a new antibiotic of the rhodomycin group. *Nature* 201, 706-7 (1964).
- Dimitroulakos, J., Thai, S., Wasfy, G. H. et al. Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leukemia & lymphoma* 40, 167-78 (2000).
- Dimitroulakos, J., Ye, L. Y., Benzaquen, M. et al. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: Therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 7, 158-67 (2001).
- Drinitsina, S. V. und Zateishchikov, D. A. [antioxidant properties of statins]. *Kardiologiya* 45, 65-72 (2005).
- Du, J., Xu, R., Hu, Z. et al. Pi3k and erk-induced rac1 activation mediates hypoxia-induced hif-1alpha expression in mcf-7 breast cancer cells. *PloS one* 6, e25213 (2011).
- Dubash, A. D., Guilluy, C., Srougi, M. C. et al. The small gtpase rhoa localizes to the nucleus and is activated by net1 and DNA damage signals. *PLoS One* 6, e17380 (2011).
- Dubost, M., Ganter, P., Maral, R. et al. [a new antibiotic with cytostatic properties: Rubidomycin]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* 257, 1813-5 (1963).
- El-Sayyad, H. I., Ismail, M. F., Shalaby, F. M. et al. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-fu) on the liver of male albino rats. *International journal of biological sciences* 5, 466-73 (2009).
- Elkind, M. S., Sacco, R. L., Macarthur, R. B. et al. High-dose lovastatin for acute ischemic stroke: Results of the phase i dose escalation neuroprotection with statin therapy for acute recovery trial (neustart). *Cerebrovascular diseases* 28, 266-75 (2009).
- Ellenbroek, S. I. und Collard, J. G. Rho gtpases: Functions and association with cancer. *Clinical & experimental metastasis* 24, 657-72 (2007).
- Endo, A. Monacolin k, a new hypocholesterolemic agent produced by a monascus species. *The Journal of antibiotics* 32, 852-4 (1979).

## Literaturverzeichnis

---

- Endo, A., Kuroda, M. & Tanzawa, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase by ml-236a and ml-236b fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS letters* 72, 323-6 (1976).
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A. Rho gtpases in cell biology. *Nature* 420, 629-35 (2002).
- Favero, G. M., M, F. O., Oliveira, K. A. et al. Simvastatin impairs murine melanoma growth. *Lipids Health Dis* 9, 142 (2010).
- Feleszko, W., Balkowiec, E. Z., Sieberth, E. et al. Lovastatin and tumor necrosis factor-alpha exhibit potentiated antitumor effects against ha-ras-transformed murine tumor via inhibition of tumor-induced angiogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 81, 560-7 (1999).
- Feleszko, W., Mlynarczuk, I., Balkowiec-Iskra, E. Z. et al. Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. *Clin Cancer Res* 6, 2044-52 (2000).
- Feleszko, W., Mlynarczuk, I., Olszewska, D. et al. Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicin in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 100, 111-8 (2002).
- Fernandez-Medarde, A. und Santos, E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & cancer* 2, 344-58 (2011).
- Filomenko, R., Poirson-Bichat, F., Billerey, C. et al. Atypical protein kinase c zeta as a target for chemosensitization of tumor cells. *Cancer research* 62, 1815-21 (2002).
- Fitzgerald, J. P., Chou, S. Y., Franco, I. et al. Atorvastatin ameliorates tubulointerstitial fibrosis and protects renal function in chronic partial ureteral obstruction cases. *The Journal of urology* 182, 1860-8 (2009).
- Fritz, G. Hmg-coa reductase inhibitors (statins) as anticancer drugs (review). *Int J Oncol* 27, 1401-9 (2005).
- Fritz, G. Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy. *Current cancer drug targets* 9, 626-38 (2009).
- Fritz, G., Henninger, C. & Huelsenbeck, J. Potential use of hmg-coa reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. *British medical bulletin* 97, 17-26 (2011).
- Fritz, G. und Kaina, B. Rho gtpases: Promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 6, 1-14 (2006).
- Fromigue, O., Hamidouche, Z. & Marie, P. J. Statin-induced inhibition of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme a reductase sensitizes human osteosarcoma cells to anticancer drugs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 325, 595-600 (2008).

## Literaturverzeichnis

---

- Futterman, L. G. und Lemberg, L. Statin pleiotropy: Fact or fiction? American journal of critical care : an official publication, American Association of Critical-Care Nurses 13, 244-9 (2004).
- Gao, J., Jia, W. D., Li, J. S. et al. Combined inhibitory effects of celecoxib and fluvastatin on the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. J Int Med Res 38, 1413-27 (2010).
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. The Journal of cell biology 119, 493-501 (1992).
- Gaze, D. C. und Collinson, P. O. Cardiac troponins as biomarkers of drug- and toxin-induced cardiac toxicity and cardioprotection. Expert opinion on drug metabolism & toxicology 1, 715-25 (2005).
- Geiser, A. G., Anderson, M. J. & Stanbridge, E. J. Suppression of tumorigenicity in human cell hybrids derived from cell lines expressing different activated ras oncogenes. Cancer research 49, 1572-7 (1989).
- Gervaz, P., Morel, P. & Vozenin-Brotans, M. C. Molecular aspects of intestinal radiation-induced fibrosis. Curr Mol Med 9, 273-80 (2009).
- Gewirtz, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochemical pharmacology 57, 727-41 (1999).
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. Nf-kappab activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. Biochemical pharmacology 72, 1493-505 (2006).
- Gnad, R., Aktories, K., Kaina, B. et al. Inhibition of protein isoprenylation impairs rho-regulated early cellular response to genotoxic stress. Mol Pharmacol 58, 1389-97 (2000).
- Gnad, R., Kaina, B. & Fritz, G. Rho gtpases are involved in the regulation of nf-kappab by genotoxic stress. Experimental cell research 264, 244-9 (2001).
- Goldman, R. The clinical evaluation of renal function. Calif Med 85, 376-80 (1956).
- Goswami, P. C., Roti Roti, J. L. & Hunt, C. R. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase  $\alpha$  during s phase is regulated by mrna stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. Molecular and cellular biology 16, 1500-8 (1996).
- Graaf, M. R., Richel, D. J., van Noorden, C. J. et al. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. Cancer Treat Rev 30, 609-41 (2004).
- Grundy, S. M. Cholesterol metabolism in man. The Western journal of medicine 128, 13-25 (1978).
- Hall, A. The cytoskeleton and cancer. Cancer metastasis reviews 28, 5-14 (2009).

## Literaturverzeichnis

---

- Hamilton-Craig, I. Statin-associated myopathy. *The Medical journal of Australia* 175, 486-9 (2001).
- Harper, J. W. und Elledge, S. J. The DNA damage response: Ten years after. *Mol Cell* 28, 739-45 (2007).
- Harris, P. A., Garai, A. S. &Valenzuela, M. A. Reduction of doxorubicin (adriamycin) bone marrow toxicity. *Journal of pharmaceutical sciences* 64, 1574-6 (1975).
- Hasinoff, B. B. und Patel, D. The iron chelator dp44mt does not protect myocytes against doxorubicin. *Journal of inorganic biochemistry* 103, 1093-101 (2009).
- Hayashi, T., Hamakawa, K., Nagotani, S. et al. Hmg coa reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons. *Brain research* 1037, 52-8 (2005).
- Hayden, M. S., West, A. P. &Ghosh, S. Nf-kappab and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-80 (2006).
- Haydont, V., Bourgier, C., Pocard, M. et al. Pravastatin inhibits the rho/ccn2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. *Clin Cancer Res* 13, 5331-40 (2007a).
- Haydont, V., Bourgier, C. &Vozenin-Brotans, M. C. Rho/rock pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. *The British journal of radiology* 80 Spec No 1, S32-40 (2007b).
- Haydont, V., Mathe, D., Bourgier, C. et al. Induction of ctgf by tgf-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 76, 219-25 (2005).
- Heck, M. M. und Earnshaw, W. C. Topoisomerase ii: A specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* 103, 2569-81 (1986).
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S. et al. Principles of interleukin (il)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374, 1-20 (2003).
- Herman, E. H. und Ferrans, V. J. Reduction of chronic doxorubicin cardiotoxicity in dogs by pretreatment with (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (icrf-187). *Cancer research* 41, 3436-40 (1981).
- Herman, E. H., Ferrans, V. J., Myers, C. E. et al. Comparison of the effectiveness of (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (icrf-187) and n-acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles. *Cancer research* 45, 276-81 (1985).
- Herman, E. H., Ferrans, V. J., Young, R. S. et al. Effect of pretreatment with icrf-187 on the total cumulative dose of doxorubicin tolerated by beagle dogs. *Cancer research* 48, 6918-25 (1988).

## Literaturverzeichnis

---

- Heyworth, P. G., Knaus, U. G., Settleman, J. et al. Regulation of nadph oxidase activity by rac gtpase activating protein(s). *Molecular biology of the cell* 4, 1217-23 (1993).
- Holmberg, M., Sandberg, C., Nygren, P. et al. Effects of lovastatin on a human myeloma cell line: Increased sensitivity of a multidrug-resistant subline that expresses the 170 kda p-glycoprotein. *Anti-cancer drugs* 5, 598-600 (1994).
- Hubchak, S. C., Sparks, E. E., Hayashida, T. et al. Rac1 promotes tgf-beta-stimulated mesangial cell type i collagen expression through a pi3k/akt-dependent mechanism. *American journal of physiology. Renal physiology* 297, F1316-23 (2009).
- Huelsenbeck, J., Henninger, C., Schad, A. et al. Inhibition of rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell death & disease* 2, e190 (2011).
- Hulbert, M. The present status of radiotherapy and chemotherapy in the treatment of chronic leukaemia; a review. *Postgraduate medical journal* 30, 93-9 (1954).
- Hwang, K. E., Na, K. S., Park, D. S. et al. Apoptotic induction by simvastatin in human lung cancer a549 cells via akt signaling dependent down-regulation of survivin. *Invest New Drugs* (2010).
- Jaffe, A. B. und Hall, A. Rho gtpases: Biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 247-69 (2005).
- Jakobisiak, M., Bruno, S., Skierski, J. S. et al. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3628-32 (1991).
- Jeggo, P. A. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation research* 150, S80-91 (1998).
- Jensen, B. V., Skovsgaard, T. &Nielsen, S. L. Functional monitoring of anthracycline cardiotoxicity: A prospective, blinded, long-term observational study of outcome in 120 patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 13, 699-709 (2002).
- Jiang, K., Zhong, B., Ritchey, C. et al. Regulation of akt-dependent cell survival by syk and rac. *Blood* 101, 236-44 (2003).
- Jinadasa, R. N., Bloom, S. E., Weiss, R. S. et al. Cytolethal distending toxin: A conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* 157, 1851-75 (2011).
- Johnson, R. D. und Jasin, M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The EMBO journal* 19, 3398-407 (2000).
- Kalender, Y., Yel, M. &Kalender, S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin e and catechin. *Toxicology* 209, 39-45 (2005).
- Kamigaki, M., Sasaki, T., Serikawa, M. et al. Statins induce apoptosis and inhibit proliferation in cholangiocarcinoma cells. *Int J Oncol* 39, 561-8 (2011).

## Literaturverzeichnis

---

- Karin, M. The regulation of ap-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351, 127-34 (1996).
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. et al. Nf-kappab in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nature reviews. Cancer* 2, 301-10 (2002).
- Karl, S., Pritschow, Y., Volcic, M. et al. Identification of a novel pro-apoptotic function of nf-kappab in the DNA damage response. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 4239-56 (2009).
- Katsoulidis, E., Li, Y., Mears, H. et al. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 25, 749-56 (2005).
- Katz, M. S. Therapy insight: Potential of statins for cancer chemoprevention and therapy. *Nature clinical practice. Oncology* 2, 82-9 (2005).
- Kaufmann, S. H. und Hancock, R. Topoisomerase ii as a target for anticancer chemotherapy. *Acta Biochim Pol* 42, 381-93 (1995).
- Kawai, Y., Sato-Ishida, R., Motoyama, A. et al. Place of pitavastatin in the statin armamentarium: Promising evidence for a role in diabetes mellitus. *Drug design, development and therapy* 5, 283-97 (2011).
- Kerr, G., Ray, G., Wu, O. et al. Elevated troponin after stroke: A systematic review. *Cerebrovascular diseases* 28, 220-6 (2009).
- Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, V. et al. Synchronization of tumor and normal cells from g1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer research* 51, 3602-9 (1991).
- Khosravi-Far, R., Cox, A. D., Kato, K. et al. Protein prenylation: Key to ras function and cancer intervention? *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 3, 461-9 (1992).
- Kim, J. W., Rhee, C. K., Kim, T. J. et al. Effect of pravastatin on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 37, 1055-63 (2010).
- Kimura, T., Fujita, I., Itoh, N. et al. Metallothionein acts as a cytoprotectant against doxorubicin toxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 292, 299-302 (2000).
- Kinashi, Y., Ono, K. & Abe, M. The micronucleus assay of lymphocytes is a useful predictive assay of the radiosensitivity of normal tissue: A study of three inbred strains of mice. *Radiation research* 148, 341-7 (1997).
- King, P. D. und Perry, M. C. Hepatotoxicity of chemotherapy. *The oncologist* 6, 162-76 (2001).
- Kishimoto, T. The biology of interleukin-6. *Blood* 74, 1-10 (1989).

## Literaturverzeichnis

---

- Kleinrock, M. in *The Use of Medicines in the United States: Review of 2010* (IMS Institute for Healthcare Informatics, Parsippany, 2011).
- Koch, G., Benz, C., Schmidt, G. et al. Role of rho protein in lovastatin-induced breakdown of actin cytoskeleton. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 283, 901-9 (1997).
- Kochuparambil, S. T., Al-Husein, B., Goc, A. et al. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of akt and reduced prostate-specific antigen expression. *J Pharmacol Exp Ther* 336, 496-505 (2011).
- Konstantinidou, A. E., Patsouris, E., Korkolopoulou, P. et al. DNA topoisomerase  $\alpha$  expression correlates with cell proliferation but not with recurrence in intracranial meningiomas. *Histopathology* 39, 402-8 (2001).
- Konstantinopoulos, P. A., Karamouzis, M. V. & Papavassiliou, A. G. Post-translational modifications and regulation of the ras superfamily of gtpases as anticancer targets. *Nature reviews. Drug discovery* 6, 541-55 (2007).
- Kouvaris, J. R., Kouloulis, V. E. & Vlahos, L. J. Amifostine: The first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *The oncologist* 12, 738-47 (2007).
- Kowalski, J., Pawlicki, L., Grycewicz, J. et al. Plasma antioxidative activity during atorvastatin and fluvastatin therapy used in coronary heart disease primary prevention. *Fundamental & clinical pharmacology* 18, 93-6 (2004).
- Kowalski, J., Pawlicki, L., Grycewicz, J. et al. [estimation of antioxidative effect of atorvastatin and fluvastatin used in primary prevention of coronary heart disease--effect on lipid peroxidation]. *Wiad Lek* 58, 386-90 (2005).
- Kozar, K., Kaminski, R., Legat, M. et al. Cerivastatin demonstrates enhanced antitumor activity against human breast cancer cell lines when used in combination with doxorubicin or cisplatin. *International journal of oncology* 24, 1149-57 (2004).
- Kreisberg, R. A. Reductase inhibitor therapy of hypercholesterolemia. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 102, 153-63; discussion 163-5 (1991).
- Krishan, A. und Frei, E., 3rd. Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphoblasts. *Cancer research* 36, 143-50 (1976).
- Kurata, T., Miyazaki, K., Kozuki, M. et al. Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged app mice. *Brain research* 1371, 161-70 (2011).
- Laboureau, J., Dubertret, L., Lebreton-De Coster, C. et al. Erk activation by mechanical strain is regulated by the small g proteins rac-1 and rhoa. *Experimental dermatology* 13, 70-7 (2004).
- Lardizabal, J. A. und Deedwania, P. C. Benefits of statin therapy and compliance in high risk cardiovascular patients. *Vascular health and risk management* 6, 843-53 (2010).

## Literaturverzeichnis

---

- Laubli, H. und Borsig, L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 20, 169-77 (2010).
- Laufs, U., Kilter, H., Konkol, C. et al. Impact of hmg coa reductase inhibition on small gtpases in the heart. *Cardiovascular research* 53, 911-20 (2002).
- Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J. et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by hmg coa reductase inhibitors. *Circulation* 97, 1129-35 (1998).
- Li, W. und Kong, A. N. Molecular mechanisms of nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular carcinogenesis* 48, 91-104 (2009a).
- Li, W. und Kong, A. N. Molecular mechanisms of nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 48, 91-104 (2009b).
- Li, X. und Heyer, W. D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research* 18, 99-113 (2008).
- Liao, J. K. Statin therapy for cardiac hypertrophy and heart failure. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 52, 248-53 (2004).
- Lieber, M. R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of biological chemistry* 283, 1-5 (2008).
- Lijnen, P. und Petrov, V. Antagonism of the renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21, 363-74 (1999).
- Llesuy, S. F. und Arnaiz, S. L. Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology* 63, 187-98 (1990).
- Ludman, A., Venugopal, V., Yellon, D. M. et al. Statins and cardioprotection--more than just lipid lowering? *Pharmacology & therapeutics* 122, 30-43 (2009).
- Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C. P. et al. Topoisomerase ii beta mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer research* 67, 8839-46 (2007).
- Machesky, L. M. und Hall, A. Rho: A connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends in cell biology* 6, 304-10 (1996).
- Mahmoudi, M., Gorenne, I., Mercer, J. et al. Statins use a novel nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 103, 717-25 (2008).
- Maisin, J. R., Wambersie, A., Gerber, G. B. et al. Life-shortening and disease incidence in mice after exposure to gamma rays or high-energy neutrons. *Radiation research* 128, S117-23 (1991).

## Literaturverzeichnis

---

- Maltese, W. A. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 4, 3319-28 (1990).
- Martirosyan, A., Clendening, J. W., Goard, C. A. et al. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: Potential therapeutic relevance. BMC cancer 10, 103 (2010).
- Mayer, C., Gruber, H. J., Landl, E. M. et al. Rosuvastatin reduces interleukin-6-induced expression of c-reactive protein in human hepatocytes in a stat3- and c/ebp-dependent fashion. International journal of clinical pharmacology and therapeutics 45, 319-27 (2007).
- McCarty, M. F. Reduction of serum c-reactive protein by statin therapy may reflect decreased isoprenylation of rac-1, a mediator of the il-6 signal transduction pathway. Medical hypotheses 60, 634-9 (2003).
- Miller, A. C. und Samid, D. Tumor resistance to oxidative stress: Association with ras oncogene expression and reversal by lovastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation. International journal of cancer. Journal international du cancer 60, 249-54 (1995).
- Minden, A., Lin, A., Claret, F. X. et al. Selective activation of the jnk signaling cascade and c-jun transcriptional activity by the small gtpases rac and cdc42hs. Cell 81, 1147-57 (1995).
- Miyano, K., Ueno, N., Takeya, R. et al. Direct involvement of the small gtpase rac in activation of the superoxide-producing nadph oxidase nox1. The Journal of biological chemistry 281, 21857-68 (2006).
- Mizuno, T., Kaibuchi, K., Ando, S. et al. Regulation of the superoxide-generating nadph oxidase by a small gtp-binding protein and its stimulatory and inhibitory gdp/gtp exchange proteins. The Journal of biological chemistry 267, 10215-8 (1992).
- Monceau, V., Pasinetti, N., Schupp, C. et al. Modulation of the rho/rock pathway in heart and lung after thorax irradiation reveals targets to improve normal tissue toxicity. Current drug targets 11, 1395-404 (2010).
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L. et al. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappa b by the rho family of gtpases. The Journal of biological chemistry 273, 12779-85 (1998).
- Moreno, M., Ramalho, L. N., Sancho-Bru, P. et al. Atorvastatin attenuates angiotensin ii-induced inflammatory actions in the liver. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 296, G147-56 (2009).
- Mori, N., Okumoto, M., Yonezawa, M. et al. Factors related to resistance to hematopoietic death in mice. Journal of radiation research 35, 1-10 (1994).
- Murga, C., Zohar, M., Teramoto, H. et al. Rac1 and rhog promote cell survival by the activation of pi3k and akt, independently of their ability to stimulate jnk and nf-kappa b. Oncogene 21, 207-16 (2002).

## Literaturverzeichnis

---

- Nakagami, H., Jensen, K. S. & Liao, J. K. A novel pleiotropic effect of statins: Prevention of cardiac hypertrophy by cholesterol-independent mechanisms. *Annals of medicine* 35, 398-403 (2003).
- Neta, R. Modulation of radiation damage by cytokines. *Stem Cells* 15 Suppl 2, 87-94 (1997).
- Nishikimi, T., Kuwahara, K. & Nakao, K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* 57, 131-40 (2011).
- Noma, K., Oyama, N. & Liao, J. K. Physiological role of rocks in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology* 290, C661-8 (2006).
- Nubel, T., Damrot, J., Roos, W. P. et al. Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 12, 933-9 (2006).
- Numazawa, S. und Yoshida, T. Nrf2-dependent gene expressions: A molecular toxicological aspect. *J Toxicol Sci* 29, 81-9 (2004).
- O'Toole, C. und Unsgaard, B. Clinical status and rate of recovery of blood lymphocyte levels after radiotherapy for bladder cancer. *Cancer Res* 39, 840-3 (1979).
- Obi, C., Wysokinski, W., Karnicki, K. et al. Inhibition of platelet-rich arterial thrombus in vivo: Acute antithrombotic effect of intravenous hmg-coa reductase therapy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1271-6 (2009).
- Olive, P. L. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone h2ax phosphorylation. *Methods Cell Biol* 75, 355-73 (2004).
- Olson, M. F., Ashworth, A. & Hall, A. An essential role for rho, rac, and cdc42 gtpases in cell cycle progression through g1. *Science* 269, 1270-2 (1995).
- Opal, S. M. und DePalo, V. A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117, 1162-72 (2000).
- Ostrau, C., Hulsenbeck, J., Herzog, M. et al. Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage in vivo. *Radiother Oncol* 92, 492-9 (2009).
- Paajarvi, G., Roudier, E., Crisby, M. et al. Hmg-coa reductase inhibitors, statins, induce phosphorylation of mdm2 and attenuate the p53 response to DNA damage. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 476-8 (2005).
- Palinski, W. New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21, 3-5 (2001).
- Papadopoulos, G., Delakas, D., Nakopoulou, L. et al. Statins and prostate cancer: Molecular and clinical aspects. *Eur J Cancer* 47, 819-30 (2011).

## Literaturverzeichnis

---

- Parri, M. und Chiarugi, P. Rac and rho gtpases in cancer cell motility control. *Cell communication and signaling* : CCS 8, 23 (2010).
- Pastwa, E. und Malinowski, M. Non-homologous DNA end joining in anticancer therapy. *Current cancer drug targets* 7, 243-50 (2007).
- Patel, S., Mason, R. M., Suzuki, J. et al. Inhibitory effect of statins on renal epithelial-to-mesenchymal transition. *American journal of nephrology* 26, 381-7 (2006).
- Patel, S., Takagi, K. I., Suzuki, J. et al. Rhogtpase activation is a key step in renal epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 16, 1977-84 (2005).
- Pernice, F., Floccari, F., Caccamo, C. et al. Chromosomal damage and atherosclerosis. A protective effect from simvastatin. *European journal of pharmacology* 532, 223-9 (2006).
- Peskin, A. V. und Winterbourn, C. C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (wst-1). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 293, 157-66 (2000).
- Plo, I., Hernandez, H., Kohlhagen, G. et al. Overexpression of the atypical protein kinase c zeta reduces topoisomerase ii catalytic activity, cleavable complexes formation, and drug-induced cytotoxicity in monocytic u937 leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 31407-15 (2002).
- Podhorecka, M., Halicka, D., Klimek, P. et al. Simvastatin and purine analogs have a synergic effect on apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Ann Hematol* 89, 1115-24 (2010).
- Qi, X. F., Kim, D. H., Yoon, Y. S. et al. Involvement of oxidative stress in simvastatin-induced apoptosis of murine ct26 colon carcinoma cells. *Toxicol Lett* 199, 277-87 (2010).
- Quist-Paulsen, P. Statins and inflammation: An update. *Current opinion in cardiology* 25, 399-405 (2010).
- Raiteri, M., Arnaboldi, L., Quarato, P. et al. [the pharmacology of the statins: The evidence of a direct antiatherosclerotic action]. *Annali italiani di medicina interna : organo ufficiale della Societa italiana di medicina interna* 10 Suppl, 35S-42S (1995).
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M. et al. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (ht-1080). *Cancer* 33, 1027-33 (1974).
- Rashid, M., Tawara, S., Fukumoto, Y. et al. Importance of rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of hmg-coa reductase inhibitors. *Circ J* 73, 361-70 (2009).
- Relja, B., Meder, F., Wilhelm, K. et al. Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and g0/g1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells. *Int J Mol Med* 26, 735-41 (2010).
- Rich, T., Allen, R. L. &Wyllie, A. H. Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-83 (2000).

## Literaturverzeichnis

---

- Riganti, C., Doublier, S., Costamagna, C. et al. Activation of nuclear factor-kappa b pathway by simvastatin and rhoa silencing increases doxorubicin cytotoxicity in human colon cancer ht29 cells. *Molecular pharmacology* 74, 476-84 (2008).
- Riganti, C., Orecchia, S., Pescarmona, G. et al. Statins revert doxorubicin resistance via nitric oxide in malignant mesothelioma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 119, 17-27 (2006).
- Rodriguez, J. und Crespo, P. Working without kinase activity: Phosphotransfer-independent functions of extracellular signal-regulated kinases. *Science signaling* 4, re3 (2011).
- Rose, K. M. DNA topoisomerases as targets for chemotherapy. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2, 2474-8 (1988).
- Ross, G. M. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-related cancer* 6, 41-4 (1999).
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H. et al. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23, 5706-15 (2003).
- Roy, A. und Pahan, K. Prospects of statins in parkinson disease. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 17, 244-55 (2011).
- Rozados, V. R., Hinrichsen, L. I., Binda, M. M. et al. Lovastatin enhances the antitumoral and apoptotic activity of doxorubicin in murine tumor models. *Oncology reports* 19, 1205-11 (2008).
- Rozen, S. und Skaletsky, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* 132, 365-86 (2000).
- Rubin, P. und Casarett, G. W. Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. *Cancer* 22, 767-78 (1968).
- Saad, S. Y., Najjar, T. A. & Al-Rikabi, A. C. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* 43, 211-8 (2001).
- Sakaeda, T., Fujino, H., Komoto, C. et al. Effects of acid and lactone forms of eight hmg-coa reductase inhibitors on cyp-mediated metabolism and mdr1-mediated transport. *Pharm Res* 23, 506-12 (2006).
- Sakaeda, T., Takara, K., Kakumoto, M. et al. Simvastatin and lovastatin, but not pravastatin, interact with mdr1. *J Pharm Pharmacol* 54, 419-23 (2002).
- Salzer, W. L., Devidas, M., Carroll, W. L. et al. Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984-2001: A report from the children's oncology group. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 24, 355-70 (2010).

## Literaturverzeichnis

---

- Sandrock, K., Bielek, H., Schradi, K. et al. The nuclear import of the small gtpase rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin alpha2. *Traffic* 11, 198-209 (2010).
- Sanli, T., Liu, C., Rashid, A. et al. Lovastatin sensitizes lung cancer cells to ionizing radiation: Modulation of molecular pathways of radioresistance and tumor suppression. *J Thorac Oncol* 6, 439-50 (2011).
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. et al. Human multidrug resistance abcb and abcg transporters: Participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86, 1179-236 (2006).
- Sawada, N. und Liao, J. K. Targeting enos and beyond: Emerging heterogeneity of the role of endothelial rho proteins in stroke protection. *Expert Rev Neurother* 9, 1171-86 (2009).
- Schachter, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundamental & clinical pharmacology* 19, 117-25 (2005).
- Schmidmaier, R., Baumann, P., Simsek, M. et al. The hmg-coa reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylation of rho protein and activation of rho kinase. *Blood* 104, 1825-32 (2004).
- Sehested, M., Jensen, P. B., Sorensen, B. S. et al. Antagonistic effect of the cardioprotector (+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (icrf-187) on DNA breaks and cytotoxicity induced by the topoisomerase ii directed drugs daunorubicin and etoposide (vp-16). *Biochemical pharmacology* 46, 389-93 (1993).
- Sharma, D., Sandur, S. K., Rashmi, R. et al. Differential activation of nf-kappab and nitric oxide in lymphocytes regulates in vitro and in vivo radiosensitivity. *Mutat Res* 703, 149-57 (2010).
- Shimizu, N., Ohtsubo, M. & Minoshima, S. Mutationview/kmcancerdb: A database for cancer gene mutations. *Cancer science* 98, 259-67 (2007).
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P. et al. Rag-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate v(dj) rearrangement. *Cell* 68, 855-67 (1992).
- Sieczkowski, E., Lehner, C., Ambros, P. F. et al. Double impact on p-glycoprotein by statins enhances doxorubicin cytotoxicity in human neuroblastoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126, 2025-35 (2010).
- Simunek, T., Sterba, M., Popelova, O. et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological reports : PR* 61, 154-71 (2009).
- Sobki, S. H., Saadeddin, S. M. & Habbab, M. A. Cardiac markers used in the detection of myocardial injury. *Saudi medical journal* 21, 843-6 (2000).
- Spira, A. I. und Ettinger, D. S. The use of chemotherapy in soft-tissue sarcomas. *Oncologist* 7, 348-59 (2002).

## Literaturverzeichnis

---

- Squizzato, A., Galli, M., Romualdi, E. et al. Statins, fibrates, and venous thromboembolism: A meta-analysis. *European heart journal* 31, 1248-56 (2010).
- Stoll, L. L., McCormick, M. L., Denning, G. M. et al. Antioxidant effects of statins. *Drugs Today (Barc)* 40, 975-90 (2004).
- Stone, H. B., Coleman, C. N., Anscher, M. S. et al. Effects of radiation on normal tissue: Consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 4, 529-36 (2003).
- Stone, K. D., Prussin, C. & Metcalfe, D. D. Ige, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, S73-80 (2010).
- Sulciner, D. J., Irani, K., Yu, Z. X. et al. Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for nf-kappab activation. *Molecular and cellular biology* 16, 7115-21 (1996).
- Swain, S. M. und Vici, P. The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: Expert panel review. *Journal of cancer research and clinical oncology* 130, 1-7 (2004).
- Tago, K., Funakoshi-Tago, M., Sakinawa, M. et al. Kappab-ras is a nuclear-cytoplasmic small gtpase that inhibits nf-kappab activation through the suppression of transcriptional activation of p65/rela. *The Journal of biological chemistry* 285, 30622-33 (2010).
- Taylor, A., Lefer, D. J. & Granger, D. N. Hmg-coa reductase inhibitor attenuates platelet adhesion in intestinal venules of hypercholesterolemic mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286, H1402-7 (2004).
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal* 17, 5497-508 (1998).
- Tan, W., Palmby, T. R., Gavard, J. et al. An essential role for rac1 in endothelial cell function and vascular development. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 1829-38 (2008).
- Tanabe, K., Ikegami, Y., Ishida, R. et al. Inhibition of topoisomerase ii by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer research* 51, 4903-8 (1991).
- Tanum, G. The megakaryocyte DNA content and platelet formation after the sublethal whole body irradiation of rats. *Blood* 63, 917-20 (1984).
- Taylor-Harding, B., Orsulic, S., Karlan, B. Y. et al. Fluvastatin and cisplatin demonstrate synergistic cytotoxicity in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 119, 549-56 (2010).
- Tebbi, C. K., London, W. B., Friedman, D. et al. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric hodgkin's disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 493-500 (2007).

## Literaturverzeichnis

---

- Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A. et al. The selectins: Vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9, 866-73 (1995).
- Teicher, B. A. und Fricker, S. P. Cxcl12 (sdf-1)/cxcr4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 16, 2927-31 (2010).
- Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L. et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase ii. *Science* 226, 466-8 (1984).
- Thibault, A., Samid, D., Tompkins, A. C. et al. Phase i study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2, 483-91 (1996).
- Thompson, P. D., Clarkson, P. & Karas, R. H. Statin-associated myopathy. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 289, 1681-90 (2003).
- Tobert, J. A., Bell, G. D., Birtwell, J. et al. Cholesterol-lowering effect of mevlinolin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase, in healthy volunteers. *J Clin Invest* 69, 913-9 (1982).
- Tolias, K. F., Cantley, L. C. & Carpenter, C. L. Rho family gtpases bind to phosphoinositide kinases. *The Journal of biological chemistry* 270, 17656-9 (1995).
- Turchi, L., Chassot, A. A., Bourget, I. et al. Cross-talk between rho gtpases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury. *The Journal of investigative dermatology* 121, 1291-300 (2003).
- Undas, A., Brozek, J. & Musial, J. Anti-inflammatory and antithrombotic effects of statins in the management of coronary artery disease. *Clinical laboratory* 48, 287-96 (2002).
- Vaklavas, C., Chatzizisis, Y. S., Ziakas, A. et al. Molecular basis of statin-associated myopathy. *Atherosclerosis* 202, 18-28 (2009).
- van Maanen, J. M., Retel, J., de Vries, J. et al. Mechanism of action of antitumor drug etoposide: A review. *Journal of the National Cancer Institute* 80, 1526-33 (1988).
- Vanhoefler, U., Cao, S., Minderman, H. et al. Pak-104p, a pyridine analogue, reverses paclitaxel and doxorubicin resistance in cell lines and nude mice bearing xenografts that overexpress the multidrug resistance protein. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2, 369-77 (1996).
- Vaughan, C. J., Gotto, A. M., Jr. & Basson, C. T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 35, 1-10 (2000).
- Vaughan, C. J., Murphy, M. B. & Buckley, B. M. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348, 1079-82 (1996).

## Literaturverzeichnis

---

- Velculescu, V. E. und El-Deiry, W. S. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clinical chemistry* 42, 858-68 (1996).
- Vozenin-Brotons, M. C., Milliat, F., Sabourin, J. C. et al. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56, 561-72 (2003).
- Vrettos, I., Papageorgiou, S., Economopoulou, C. et al. Rosuvastatin-induced thrombocytopenia. *South Med J* 103, 676-8 (2010).
- Waldman, A. und Kritharides, L. The pleiotropic effects of hmg-coa reductase inhibitors: Their role in osteoporosis and dementia. *Drugs* 63, 139-52 (2003).
- Walker, K. und Olson, M. F. Targeting ras and rho gtpases as opportunities for cancer therapeutics. *Current opinion in genetics & development* 15, 62-8 (2005).
- Wang, C., Tao, W., Wang, Y. et al. Rosuvastatin, identified from a zebrafish chemical genetic screen for antiangiogenic compounds, suppresses the growth of prostate cancer. *Eur Urol* 58, 418-26 (2010).
- Wang, C. Y., Mayo, M. W. & Baldwin, A. S., Jr. Tnf- and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of nf-kappab. *Science* 274, 784-7 (1996).
- Wang, J. J., Cortes, E., Sinks, L. F. et al. Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patients with neoplastic disease. *Cancer* 28, 837-43 (1971).
- Wang, Y., Jin, X. Q., Wang, S. et al. Therapeutic efficacy and bone marrow protection of the mdr1 gene and over-dose chemotherapy with doxorubicin for rabbits with vx2 hepatocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5, 545-51 (2006).
- Waring, P. und Mullbacher, A. Cell death induced by the fas/fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol* 77, 312-7 (1999).
- Werner, M., Sacher, J. & Hohenegger, M. Mutual amplification of apoptosis by statin-induced mitochondrial stress and doxorubicin toxicity in human rhabdomyosarcoma cells. *British journal of pharmacology* 143, 715-24 (2004).
- Willey, J. Z. und Elkind, M. S. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors in the treatment of central nervous system diseases. *Archives of neurology* 67, 1062-7 (2010).
- Yamamoto, A., Sudo, H. & Endo, A. Therapeutic effects of ml-236b in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 35, 259-66 (1980).
- Yan, T., Deng, S., Metzger, A. et al. Topoisomerase ii{alpha}-dependent and -independent apoptotic effects of dexrazoxane and doxorubicin. *Molecular cancer therapeutics* 8, 1075-85 (2009).
- Yoshida, M., Shiojima, I., Ikeda, H. et al. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-atm-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of rac1 activity. *Journal of molecular and cellular cardiology* 47, 698-705 (2009).

## Literaturverzeichnis

---

- Zhang, W., Wu, J., Zhou, L. et al. Fluvastatin, a lipophilic statin, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through mitochondria-operated pathway. *Indian J Exp Biol* 48, 1167-74 (2010).
- Zhang, Y. W., Shi, J., Li, Y. J. et al. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57, 435-45 (2009).
- Zhao, H., Liao, Y., Minamino, T. et al. Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 31, 1977-87 (2008).
- Zhou, Q. und Liao, J. K. Pleiotropic effects of statins. - basic research and clinical perspectives. *Circ J* 74, 818-26 (2010).

## Publikationen und Kongressbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden aus Prioritätsgründen bereits publiziert und auf Tagungen vorgestellt.

### Liste der Publikationen

Ostrau, C., Huelsenbeck, J., Herzog, M. et al. Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage in vivo. *Radiother Oncol* 92, 492-9 (2009).

H. W. Bange, K. B., H. P. Hansen, A. Kock, R. Koppe, F. Malien, and C. Ostrau. Dissolved methane during hypoxic events at the boknis eck time series station (eckernförde bay, sw baltic sea). *Biogeosciences* 7, 1279-1284 (2010).

Henninger, C., Huelsenbeck, J., Schad, A. et al. Inhibition of rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell death & disease* 2, e190 (2011).

Fritz, G., Henninger, C. & Huelsenbeck, J. Potential use of hmg-coa reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. *British medical bulletin* 97, 17-26 (2011).

Henninger, C., Huelsenbeck, J., Grösch, S., Schad, A., Lackner, K.J., Kaina, B. and Fritz, G. The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* (**re-submission in progress**) (2012)

### Publizierte Abstracts

Ostrau C., Hülsenbeck J., Fritz G. Establishment of an in vivo system aiming at reducing organ side effects of antineoplastic therapeutics. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379, 340 (2009)

Huelsenbeck J., Ostrau C., Fritz G. Lovastatin attenuates cytotoxic side effects of doxorubicin in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379, 201 (2009)

Henninger C., Hülsenbeck J., Hamalukić M., Schad A., Torzewski M., Fritz G. Beneficial effects of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin on ionizing radiation- and doxorubicin-induced cytotoxicity in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 381, 178 (2010)

Huelsenbeck J., Henninger C., Fitz G. The early DNA damage response to doxorubicin in cardiomyoblasts is Rac1 dependent and independent of reactive oxygen species. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 381, 82 (2010)

Henninger C., Hülsenbeck J., Fritz G. Protection from Anthracycline-induced Liver Toxicity by Use of the HMG-CoA Reductase Inhibitor Lovastatin. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 383, V32 (2011)

### Kongressteilnahmen

#### Vorträge

Henninger C., Hülsenbeck J., Hamalukić M., et al.  
Beneficial effects of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin on ionizing radiation- and doxorubicin-induced cytotoxicity in vivo. 51. Jahrestagung der DGPT, Mainz, 23.-25.03.2010

Henninger C., Hülsenbeck J., Fritz G.  
Making the most out of the mouse: An integrated approach to maximize the output from in vivo mouse studies. ScieTalk, DKFZ Heidelberg, 08.05.2010

Henninger C., Hülsenbeck J., Fritz G.  
Protection from Anthracycline-induced Liver Toxicity by Use of the HMG-CoA Reductase Inhibitor Lovastatin. 77. Jahrestagung der DGPT, Frankfurt, 30.03.-01.04.2011

#### Posterpräsentationen

Ostrau C., Hülsenbeck J., Fritz G.  
Establishment of an in vivo system aiming at reducing organ toxicity of antineoplastic therapeutics. 50. Jahrestagung der DGPT, Mainz, 10.-12.03.2009

Henninger C., Hülsenbeck J., Schad A., Torzewski M., Fritz G.  
Beneficial effects of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin against genotoxic drug-induced cytotoxicity in vivo. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), Florenz, 20-25.08.2009

Henninger C., Hülsenbeck J., Hamalukić M., Fritz G.  
Ionizing radiation-induced normal tissue damage is attenuated by the HMG-CoA reductase inhibitor Lovastatin. 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), Essen, 30.09-02.10.2009

Henninger C., Hülsenbeck J., Fritz G.  
Lovastatin attenuates doxorubicin-induced side effects while potentiating its anti-tumor efficacy in vivo. ScieTalk, DKFZ Heidelberg, 08.05.2010

Henninger C., Hülsenbeck J., Fritz G.  
Lovastatin potentiates the antineoplastic efficacy of doxorubicin while protecting from normal tissue damage. 11th biannual international meeting of the German Society of DNA Repair Research (DGDR), Jena, 07.-10.09.2010