

Aus dem Institut für Toxikologie  
der Heinrich-Heine-Universität  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Regine Kahl

HEMMUNG DER EXPRESSION DER  
MANGAN SUPEROXID DISMUTASE  
DURCH ADRIAMYCIN IN KARDIOMYOZYTEN  
DER ERWACHSENEN RATTE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Johanna Katharina Sledziona

2009

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referentin: Univ.-Prof. Dr. med. Regine Kahl

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Meiner Familie zum Dank

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tumorentstehung.....	1
1.2 Adriamycin.....	3
1.3 Oxidativer Stress.....	11
1.4 Lipidperoxidation.....	13
1.5 Mangan Superoxid Dismutase.....	13
1.6 Fragestellung.....	14
<b>2. Material.....</b>	<b>16</b>
2.1 Lösungen und Puffer.....	16
2.2 Enzyme.....	20
2.3 Reaktionsansätze.....	20
2.4 Oligonukleotid.....	20
2.5 Radioaktivität.....	20
2.6 Chemikalien.....	21
2.7 Geräte.....	22
2.8 Hilfsmittel.....	23
<b>3. Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1 Versuchstiere.....	25
3.2 Versuchsausrüstung.....	25
3.3 Präparation von Kardiomyozyten .....	26
3.4 Kultivierung.....	27
3.5 Messung der Lipidperoxidation durch Nachweis von MDA.....	29

---

3.6	Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Test.....	30
3.7	Isolierung von RNA.....	30
3.8	Quantifizierung und Qualitätsprüfung der RNA.....	32
3.9	Northern Blot.....	32
3.9.1	Elektrophorese.....	33
3.9.2	Transfer.....	34
3.9.3	Herstellung von Sonden.....	35
3.9.3.1	Isolierung von cDNA-Sonden aus Plasmiden.....	36
3.9.4	Radioaktive Markierung.....	37
3.9.4.1	MnSOD cDNA-Sonde.....	37
3.9.4.2	18S rRNA-Sonde.....	38
3.9.5	Hybridisierung.....	38
3.9.5.1	Hybridisierung mit cDNA-Sonde.....	39
3.9.5.2	Hybridisierung mit RNA-Sonde.....	40
3.9.6	Autoradiographie.....	40
3.10	Densitometrie.....	41
3.11	Statistik.....	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
4.1	Lipidperoxidation – Nachweis von MDA.....	42
4.2	Viabilität – Bestimmung von Formazan.....	44
4.3	Densitometrie.....	45
4.3.1	Darstellung der MnSOD mRNA und 18S rRNA als Banden.....	45
4.3.1.1	Versuchsreihe mit 1 $\mu$ M Adriamycin.....	46
4.3.1.2	Versuchsreihe mit 10 $\mu$ M Adriamycin.....	47
4.3.1.3	Versuchsreihe mit 130 $\mu$ M Adriamycin.....	48

---

4.3.2	Auswertung der densitometrischen Daten in Diagrammen.....	48
4.3.2.1	Summe der Einzelbanden.....	49
4.3.2.2	Einzelbanden.....	50
4.3.2.2.1	Versuchsreihe mit 1 $\mu$ M Adriamycin.....	50
4.3.2.2.2	Versuchsreihe mit 10 $\mu$ M Adriamycin.....	51
4.3.2.2.3	Versuchsreihe mit 130 $\mu$ M Adriamycin.....	52
4.3.2.2.4	Gesamtvergleich.....	53
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>54</b>
	Zur Rolle von Radikalbildung und Hemmung der Nukleinsäuresynthese bei der kardiotoxischen Wirkung von Adriamycin.....	54
	Zur Wirkung von Adriamycin in den Mitochondrien.....	60
	Zur Wirkung von Adriamycin auf die Expression antioxidativer Enzyme.....	64
	Zur Rolle der MnSOD für die Sensitivität von Zellen gegen Stress.....	70
	Zum Zusammenhang zwischen Radikalbildung und MnSOD-Regulation nach Adriamycin.....	74
	Zusammenfassung .....	77
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>114</b>
	Danksagung.....	114
	Lebenslauf.....	115
	Abstract.....	116

## **1. Einleitung**

Bösartige Neoplasien belegen in der Todesursachenstatistik unverändert den zweiten Rang. 2004 wurden allein in Europa etwa 2,9 Millionen neue Krebserkrankungen diagnostiziert, verstorben sind in demselben Jahr 1,7 Millionen krebskranker Menschen. Zahlen aus dem Jahr 2000 berichten von weltweit 10 Millionen neu an Krebs erkrankten (395.000 in Deutschland) und 6,2 Millionen verstorbenen Menschen. Für 22 Millionen Menschen weltweit war in jenem Jahr eine bösartige Tumorerkrankung Teil ihres Lebens. Aufgrund des höheren Alters, das die Menschen erreichen, ist die Inzidenz steigend.

Die Zahlen machen deutlich, wie wichtig sowohl die Bereitstellung einer präzisen Diagnostik als auch die Entwicklung effektiver Therapiekonzepte ist, die den unterschiedlichen Krebsarten gerecht werden müssen. Hierzu reichen die Möglichkeiten von der Chirurgie, der Bestrahlung (Radiatio) über die klassische Chemotherapie bis hin zu antineoplastisch wirksamen Agenzien, die durch neuartige Mechanismen in den Stoffwechsel der Tumorzellen eingreifen können, vereinzelt jedoch in Deutschland noch nicht zugelassen sind.

Einer der Vertreter der "klassischen" Chemotherapie ist das Adriamycin, ein Anthrazyklin, das bei einer Vielzahl von Tumoren verwendet wird, dessen Einsatz jedoch durch die Entwicklung einer Kardiomyopathie auf eine Gesamtdosis pro Lebenszeit eingeschränkt ist. Die Mechanismen, die hierbei beteiligt sind, werden in der folgenden Arbeit insbesondere im Hinblick auf die Rolle eines bestimmten antioxidativ wirkenden Enzyms, der Mangan Superoxid Dismutase (MnSOD), behandelt.

### **1.1 Tumorentstehung**

Die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle kann durch verschiedene Vorgänge oder Komponenten ausgelöst werden. Hierzu gehören physikalische (ionisierende/UV-Strahlung), chemische (an-/organische Substanzen wie z.B. aromatische Kohlenwasserstoffe oder Benzol) und biologische (z.B. Herpes- oder Humane Papillomaviren) Einflüsse. Sie bewirken allesamt genetische Veränderungen, die unter ungünstigen Bedingungen nicht mit dem Zelltod (Apoptose) erwidert werden, sondern mit einer gesteigerten Proliferation der Zelle, einem invasiven Wachstumsverhalten und schließlich der Fähigkeit, einzelne Zellen aus dem Verband zu

lösen, um an anderen Stellen des Körpers Tochtergeschwülste (Metastasen) zu bilden. Als Voraussetzung hat man Veränderungen bestimmter Gene in der DNA von Zellen identifiziert: aktivierte Protoonkogene (abl, ras, myc, u.a.) und fehlende Suppressorgene (RB1, p53, BRCA u.a.).

Die uns zur Verfügung stehenden Krebsmedikamente greifen auf verschiedene Weise in die Regulationswege der Tumorzellen ein, um sie der Apoptose, dem programmierten Zelltod, zuzuführen.

Die folgende Tabelle listet kurz die einzelnen Substanzgruppen mit Beispielen der dazugehörigen Vertreter auf.

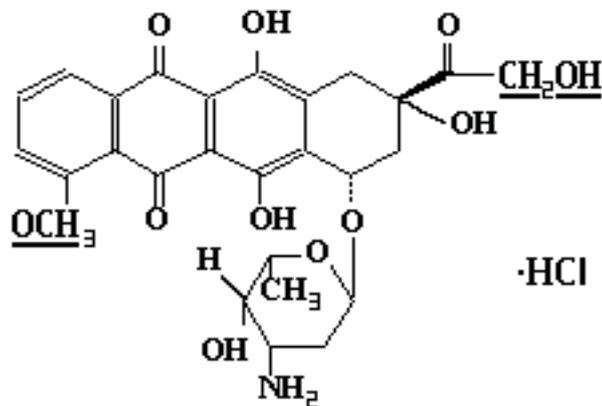
Alkylanzien	Cyclophosphamid, Melphalan
Antimetabolite	Methotrexat, Fluorouracil
<b>Antibiotika</b>	<b>Adriamycin</b> , Bleomycin
Alkaloide	Docetaxel, Vincristin
Sonstige	Cisplatin, Irinotecan
Hormone	Tamoxifen, Anastrozol
Monoklonale Antikörper	Cetuximab, Rituximab
Zytokine	Interferone
Signal- Transduktionshemmer	Imatinib

## 1.2 Adriamycin

Adriamycin (Doxorubicin Hydrochlorid) ist ein zytostatisch wirkendes Antibiotikum aus der Gruppe der Anthrazykline, das erstmalig zu Beginn der 1960er Jahre aus *Streptomyces peuceitius* var. *caesius* isoliert wurde (Arcamone et al., 1969) – fünf Jahre nachdem der erste Vertreter der Anthrazykline, das Daunomycin, entdeckt worden war. Zur Behandlung von bakteriellen Infektionen ungeeignet, hat es sich in der Therapie zahlreicher Tumorerkrankungen etabliert und findet sowohl als Monotherapeutikum als auch als Bestandteil einer Polychemotherapie breite Anwendung. Die Einsatzmöglichkeiten zeigt die folgende Tabelle.

<b>Lymphatisches System</b>	Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphom (z.B. CLL)
<b>Hämatologisches System</b>	Leukämie (z.B. Remissionsinduktion bei ALL; AML)
<b>Sarkom</b>	Ewing-Sarkom, Weichteilsarkom
<b>Karzinom</b>	Mamma-, Blasen-, Prostata-, Bronchialkarzinom (außer NSCLC), u.a.

Adriamycin besteht aus einer tetrazyklischen rotfärbenden Naphthacen-Ringstruktur, dem Adriamycinon, und einem über eine glykosidische Bindung anhaftenden Aminozucker, dem Daunosamin. Von entscheidender Bedeutung ist der 2. Ring, der Chinonring, der als Redoxsystem durch die Aufnahme eines Elektrons zu einem instabilen Semichinonradikal wird (Bachur et al., 1979), was das Molekül zu einem Reaktionspartner in verschiedenen Vorgängen macht.



**Abb. 1: Struktur von Adriamycin nach der Formel:  $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$**  (Young et al., 1981)

(1S,3S)-3-Glycoloyl-1,2,3,4,6,11-hexahydro-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxo-1-naphthacenyl-(3-amino-2,3,6-trideoxy- $\alpha$ -L-lyxo-hexapyranoside) (IUPAC) –

Die unterstrichenen Anteile sind variabel und bilden je nach Zusammensetzung die unterschiedlichen Vertreter der Anthrazykline

Neben seiner zuverlässigen zytostatischen Wirkung zeigt sich Adriamycin jedoch auch für eine Reihe von Nebenwirkungen verantwortlich, von denen die gefürchtetste die Kardiomyopathie ist (Lefrak et al., 1973). Während die akut auftretende Form der Kardiotoxizität kaum Auswirkungen auf die Therapie hat, stellt die chronische Form durch die Entwicklung einer irreversiblen Herzinsuffizienz einen ernstzunehmenden Aspekt dar, der den Gebrauch von Adriamycin auf eine lebenslang einzuhaltende Gesamtdosis von  $< 550 \text{ mg/m}^2$  Körperoberfläche für Erwachsene bzw.  $< 450 \text{ mg/m}^2$  nach Vorbehandlung und  $< 400 \text{ mg/m}^2$  Körperoberfläche für Kinder limitiert. Art und Häufigkeit der Applikation können die kumulative Dosis auf bis zu  $800 \text{ mg/m}^2$  erhöhen. In zahlreichen Studien wurde anhand von Mäusen und Ratten nach den Wirkmechanismen von Adriamycin geforscht sowie nach einer Möglichkeit, die dosisabhängige chronische Kardiotoxizität zu unterbinden, ohne seine zytostatischen Fähigkeiten zu mindern.

Die bisher aufgedeckten Wirkmechanismen werden in den folgenden Abschnitten angesprochen.

Adriamycin liegt als orangerotes, kristallines, wasserlösliches Pulver vor und ist in der Geschwindigkeit seiner Zersetzung vom pH-Wert abhängig. Nach Applikation in den

Körper erfolgt die Ausscheidung zu 90-95 % über die Leber, zu 5-10 % renal. Die Blut-Hirn-Schranke wird nicht überschritten. Die Halbwertszeit verläuft in drei Phasen: Verteilungshalbwertszeit von 12 min mit anschließender biphasischer Elimination mit Halbwertszeiten von 3,3 h und 30 h (Benjamin et al., 1977; Eksborg et al., 1985). Andere Autoren beschreiben mit einer Verteilungshalbwertszeit von 5-10 min und einer Eliminationshalbwertszeit von 30 h dagegen nur ein 2-Phasen-Modell (Greene et al., 1983; Speth et al., 1987).

Seit 1997 wird Adriamycin auch in pegylierter Form eingesetzt. Seit 2000 bzw. 2003 ist es als Caelyx bei Ovarialkarzinom bzw. Mammakarzinom zugelassen. Durch Bindung an mit Polyethylenglykol umfasste Liposomen lässt sich die Zirkulationszeit des Anthrazyklins intravasal verlängern und damit die Kumulation in den Tumorzellen, speziell durch Passieren von Endothellücken, erhöhen (Working et al., 1994). Toxische Effekte werden seltener beobachtet als bei der konventionell zugeführten Form des Adriamycins, daher liegt mit Caelyx eine zwar noch eingeschränkte, aber in baldiger Zukunft vielleicht hoffnungsvolle Alternative vor.

## Indikationen

Adriamycin wird erfolgreich eingesetzt in der Behandlung von malignen Lymphomen (Hodgkin-/Non-Hodgkin), akuten Leukämien, Sarkomen (u.a. Ewing-Sarkom) und Karzinomen. Es ist das Therapeutikum erster Wahl bei metastasiertem Schilddrüsenkarzinom.

Seltener als Monotherapeutikum wird es in erster Linie mit anderen Zytostatika zur Polychemotherapie kombiniert und sowohl in kurativen als auch in palliativen Ansätzen angewandt.

Obwohl Adriamycin für gewöhnlich intravenös appliziert wird, kann die Therapie des oberflächlichen Blasenkarzinoms topisch erfolgen.

Die Dosierung von Adriamycin liegt meist im Größenbereich von 25-80 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche, die Anwendung wird meist alle 3-4 Wochen wiederholt. Die tatsächliche Dosis an Adriamycin richtet sich schließlich meist nach Art des verwendeten Schemas (z.B. R-CHOP) und nach Risikoprofil des Patienten. Therapieschemata, die im Rahmen von Studien verwendet werden, können ebenfalls Abweichungen der üblichen zytostatischen Dosis aufweisen, sie berücksichtigen

allerdings die festgelegten kumulativen Maximaldosen. Bilirubinerhöhung sowie kardiale Vorschädigung zwingen zu einer Dosisreduktion.

## Wirkungsmechanismen

Die Zytotoxizität des Adriamycins erklärt sich durch folgende Mechanismen:

- A Interkalation in die DNA
- B Hemmung der Topoisomerase II
- C Bildung freier Radikale
- D Direkte Interaktion mit Zellmembranen
- E Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase

### **A/B DNA, Topoisomerase**

Die Interkalation der DNA erfolgt, indem sich das Adriamycin zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix anlagert (Sinha and Chignell, 1979; Leonard et al., 1992). Dadurch erfolgt eine Stabilisierung des Stranges, was sowohl die Entspiralisierung als auch die Verdopplung der Einzelketten verhindert. Die für Replikation und Beseitigung von fehlerhaften Anteilen zuständigen Polymerasen werden ebenso blockiert wie die für die Entspiralisierung und den Wiederverschluss notwendigen Topoisomerasen. Die Hemmung der Topoisomerase II erfolgt als eigenständiger Schritt, indem der Komplex, den das Enzym mit der DNA eingeht, stabilisiert und damit inaktiviert wird (Pommier et al., 1985; Deffie et al., 1989). Als Folge dessen kommt es zu irreversiblen Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Tewey et al., 1984). Der für die Zellteilung notwendige Zellzyklus wird vorzeitig in der S-Phase (Synthese-Phase) beendet (Zunino and Capranico, 1990).

Durch die Interaktion zwischen Adriamycin und DNA wird sowohl die Replikation als auch die RNA-Transkription gestört (Di Marco et al., 1971). Da von letzterer die Proteinsynthese abhängt, wird die bisher lebensfähige Zelle nicht nur ihrer Fähigkeit der Zellteilung beraubt, sondern auch der Bildung notwendiger Proteine. Die durch eine gestörte Transkription eingeschränkte Genexpression betrifft dabei herzspezifisch einige zur Muskelaktivität benötigten Proteine (z.B.  $\alpha$ -Aktin, Myosin), aber auch andere Proteine (z.B. Kreatinkinase) (Cappelli et al., 1989; Ito et al., 1990). In welchem Ausmaß und unter welchen Bedingungen das stattfindet, ist Teil vieler Studien und wird im Diskussionsteil näher erörtert.

Die erwünschte antitumoröse Wirkung des Adriamycins wird den hier beschriebenen genotoxischen Mechanismen zugeordnet (Di Marco et al., 1969; Myers et al., 1977). Unter den „Reaktionsformen“, die an die DNA binden können, unterscheidet man das Adriamycin selbst, seine Metaboliten (Semichinonradikal, Adriamycin-FeII-Komplex) und die durch das Zytostatikum generierten Radikale.

### **C Freie Radikale**

Die Bildung instabiler und dadurch besonders reaktionsfähiger Verbindungen, der Radikale, erfolgt beim Adriamycin hauptsächlich über zwei verschiedene Mechanismen:

#### **1. Chinonstruktur**

Die Chinonstruktur des Adriamycins kann durch die von unterschiedlichen Enzymen katalysierte Zufuhr eines  $e^-$  zu einem Semichinon reduziert werden.

Beschrieben ist dieser Vorgang für folgende Enzyme:

#### **◆ Exogene NADH-Dehydrogenase der Mitochondrien**

Herzspezifisches Enzym an der zytosolischen Seite der inneren Mitochondrienmembran, das über Assoziation mit dem Komplex I im Elektronentransport der Atmungskette involviert ist (Nohl, 1987)

#### **◆ NADH-Dehydrogenase der Mitochondrien**

Oxidoreduktase des Komplex I der Atmungskette (Davies and Doroshov, 1986)

#### **◆ NADPH-Cytochrom P<sub>450</sub>-Reduktase des endoplasmatischen / sarkoplasmatischen Retikulums**

Spaltet u.a. die glykosidische Bindung des Adriamycins und produziert somit ein aglykones Molekül (Bachur et al., 1977; Pan et al., 1981)

#### **◆ Xanthin-Oxidase des Nukleus und des Zytoplasmas**

(Pan and Bachur, 1980; Sinha et al., 1984)

Das Semichinon ist ein freies, instabiles Radikal mit einer Halbwertszeit von etwa  $10^{-5}$ - $10^{-7}$ s (Cummings et al., 1991; Svingen and Powis, 1981). Während das Ausmaß seiner Bildung unter hypoxischen bzw. anaeroben Bedingungen ansteigt, sinkt seine Konzentration dagegen bei Anwesenheit von Sauerstoff, da es rasch mit diesem reagiert

(Butler et al., 1985; Alegria et al., 1989). Durch Transfer des Elektrons wird der Sauerstoff zu einem Superoxidanionradikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) reduziert, während das Semichinon wieder in das ursprüngliche Adriamycinmolekül übergeht (Powis, 1989). Das Superoxidradikal wird im weiteren Verlauf entweder enzymatisch neutralisiert, oder aber es reagiert zu weiteren Radikalen. Das Semichinon dagegen kann folgenden Metabolisierungswegen unterliegen:

- ◆ Reaktion mit einem zweiten Semichinonradikal zu einem Adriamycinmolekül und dem stabileren Hydrochinon, das auch direkt durch eine  $2e^-$ -Reduktion von Adriamycin entstehen kann (Myers, 1987; Speth et al., 1988)
- ◆ Reaktion mit Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen (Kalyanaraman et al., 1984)
- ◆ anaerobe Deglykosylierung, d.h. Spaltung der glykosidischen Bindung mit Verlust des Daunosamins und damit Bildung von aglykonen Formen wie 7-Deoxyaglykon, C7-Quinon-Methid und C7-Radikal (Asbell et al., 1972; Sinha et al., 1984)

Die Fähigkeit, mit Makromolekülen zu reagieren, ist bei den Metaboliten des Semichinons unterschiedlich stark ausgeprägt (Scheulen et al., 1982; Kleyer and Koch, 1983; Abdella and Fisher, 1985).

## 2. Adriamycin-Fe II/ III-Komplex

Adriamycin besitzt eine große Affinität zu Eisen, die es ihm ermöglicht, gebundenes Eisen aus verschiedenen Verbindungen, wie z.B. Ferritin, zur Bildung eines Komplexes zu gewinnen (Gianni et al., 1988; Minotti et al., 1998). Dieser ist in der Lage, durch Reaktion mit Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid Radikale wie das  $O_2^{\cdot-}$  oder Hydroxylradikale zu bilden (Zweier, 1984). Zudem ist es befähigt, mit der DNA selbst zu reagieren (Gutteridge, 1984).

Komplexbildung ist auch mit anderen Metallen wie Kupfer möglich (Malatesta et al., 1985).

Die Bildung von Radikalen hat, auf welchem Weg sie auch geschieht, zur Folge, dass die reaktiven Teilchen an verschiedene Strukturen einer Zelle binden und deren Funktionen stören. Gebunden an die DNA verursachen sie Doppel- und Einzelstrangbrüche, gebunden an Zellmembranen stören sie deren Transportfähigkeit

und ihre Funktion zur Aufrechterhaltung einer Homöostase, die vor allem für den Elektrolythaushalt intrazellulär und innerhalb einzelner Organellen von Bedeutung ist. Negative Auswirkungen auf die Funktion von Enzymen werden neben der Störung auf der Ebene der Transkription durch oxidative Inaktivierung erreicht.

#### **D Interaktion mit Membranen**

Adriamycin ist in der Lage, direkt an die Membranen einer Zelle und ihrer Organellen zu binden (Tritton et al., 1978). Die Membranen sind, wie oben beschrieben, auch Ziel der Radikale, die durch die Redoxreaktionen, denen das Adriamycin unterliegt, generiert werden. Die Bindungen verursachen Störungen im Transport durch die Membran und führen zu einem intrazellulären Elektrolytungleichgewicht.

Aufgrund seines erhöhten Gehalts an ungesättigten Fettsäuren stellt das Phospholipid Cardiolipin einen bevorzugten Angriffspunkt dar (Goormaghtigh et al., 1990). Zwei Drittel des Gehalts an Phospholipid werden durch Mitochondrien gestellt. Die Interaktion mit Cardiolipin induziert die Lipidperoxidation, auf die noch explizit eingegangen wird. Vorwegzunehmen ist, dass die Produkte der Lipidperoxidation wiederum DNA-Schäden verursachen können (Park, 1992).

#### **E $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase**

Eine Folge der Membranschädigung mit Beeinträchtigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ist eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, u.a. bedingt durch eine gesteigerte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien (Lowrey et al., 1981; Bachmann and Zbinden, 1979). Relevant sind diese Veränderungen vor allem in Herzmuskelzellen, deren kontraktile Elemente vom intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt abhängig sind.

#### **Nebenwirkungen**

Unter den Nebenwirkungen, die Adriamycin auslösen kann, unterscheidet man

- unspezifische
- akute kardiotoxische
- späte kardiotoxische Effekte.

Als **unspezifisch** werden (reversible) Veränderungen angesehen, die auch bei anderen Zytostatika auftreten. Dazu gehört die Wirkung auf die Produktionsfähigkeit des Knochenmarks, die vor allem mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten Leukopenie einhergeht, welche ihren kritischsten Zeitpunkt etwa ein bis zwei Wochen nach Beginn der Therapie erreicht (Nadir), um sich danach wieder zurückzubilden. Veränderungen an Thrombozyten und Erythrozyten sind im Vergleich dazu eher gering.

Weiterhin kommen Übelkeit zusammen mit anderen gastrointestinalen Begleiterscheinungen und reversibler Haarausfall hinzu. Kontrollen des Blutbildes und der Leberwerte sollten regelmäßig erfolgen.

Etwa 1-2 Tage nach Beginn der Therapie kann sich der Harn kurzfristig rot verfärben.

Die Haut wird lichtempfindlicher, kann in Einzelfällen das sogenannte „Adriamycin Flare“ aufweisen, eine benigne allergische Reaktion an der Stelle der Infusion, welche nicht verwechselt werden darf mit einer lokalen Nekrose bei intravenöser Fehlapplikation.

Die **akuten kardiotoxischen** Veränderungen sind abhängig von der Dosis und dem Spitzenspiegel im Serum, dem Peak, (Legha et al., 1987; Maisch et al., 1985) und treten meist unter Infusion bis etwa zwanzig Stunden nach Beginn der Therapie auf. Dazu zählen Tachykardien, supraventrikuläre und ventrikuläre Arrhythmien und EKG-Veränderungen, insbesondere der ST-Strecke und der T-Welle (Lefrak et al., 1973). Alle Veränderungen bilden sich zumeist nach Stunden bis Tagen zurück und erfordern keinen Therapieabbruch. Sie korrelieren nicht mit der Entwicklung einer späteren Kardiomyopathie (Von Hoff et al., 1979). In sehr seltenen Fällen wurde jedoch auch vom Eintreten des plötzlichen Herztodes berichtet, ausgelöst durch maligne Herzrhythmusstörungen (Wortmann et al., 1979).

Den kritischen Aspekt in der Therapie mit Adriamycin stellt der **späte kardiotoxische** Effekt, die chronische Kardiomyopathie, dar, die bis zu zwanzig Jahre nach der Therapie auftreten kann und auf ausgedehnten pathologischen Veränderungen am Herzgewebe beruht (Steinhertz et al., 1991). Es resultiert eine Herzinsuffizienz mit sich zunehmend verschlechternder Pumpfunktion.

Bei behandelten Patienten mit Überschreiten der kumulativen Maximaldosis von 550 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche lässt sich für die Entwicklung einer Kardiomyopathie eine Inzidenz von bis zu 30 % beobachten (Gottlieb et al., 1973; Praga et al., 1979). Doch

auch wenn die Grenzdosis nicht überschritten wird, kann die chronische Kardiomyopathie mit bis zu 5 % auftreten (Lefrak et al., 1973; Von Hoff et al., 1979), und etwa 50 % aller behandelten (und asymptomatischen) Patienten zeigen immerhin signifikante pathologische Veränderungen im Herzmuskel-Biopsat (Mason et al., 1978; Gottdiener et al., 1981). Die Mortalität der symptomatischen Kardiomyopathie liegt bei 20-40 (-60) % (Haq et al., 1985; Von Hoff et al.; 1979).

Begünstigt wird das Auftreten der Kardiomyopathie durch eine Vorbelastung des Patienten mit ionisierenden Strahlen oder mit einer bereits erfolgten Tumorthherapie mit anderen Zytostatika (Minow et al., 1977, Arico and Pedroni, 1991), was eine Senkung der geplanten Kumulativdosis nach sich zieht. Weiterhin vermutet man in der Art der Applikation einen Einfluss auf das Ausmaß der Akkumulation (Langzeitinfusionen, wöchentliche Wiederholungen) (Legha et al., 1982a).

Die Kontrollparameter, die vom Kliniker erhoben werden können, um eine durch Adriamycin verursachte kardiale Toxizität beurteilen zu können, entsprechen denen, die man bei Bestehen einer Herzinsuffizienz unabhängig von der Genese bestimmt:

- laborchemische Werte wie Kreatinkinase (CK), Troponin T (TNT), brain natriuretic peptide (BNP) (Koh et al., 2004)
- bildgebende Verfahren wie Elektrokardiographie, Echokardiographie, Röntgen

### **1.3 Oxidativer Stress**

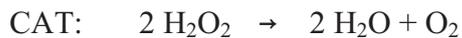
Jede Zelle bildet im Rahmen physiologischer Reaktionen reaktive Sauerstoffverbindungen, die durch zellspezifische Antioxidantien "entgiftet" werden. Ihr gehäuftes Vorkommen wird als oxidativer Stress bezeichnet und kann durch äußerlich zugeführte Agenzien ausgelöst werden. Im Vordergrund stehen ursächlich vor allem Umweltgifte (Zigarettenrauch), ionisierende Strahlung und Medikamente. Stößt die zelluläre Kapazität zur Inaktivierung der instabilen Verbindungen an ihre Grenzen, sind die Strukturen der Zelle der schädigenden Wirkung der reaktiven Moleküle ausgeliefert, was im Zelltod, der Apoptose, resultieren kann.

Als Auslöser eines oxidativen Stresses können Atome oder Moleküle mit ungepaarten Elektronen fungieren. Basieren sie auf Sauerstoff, werden sie auch unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) zusammengefasst.

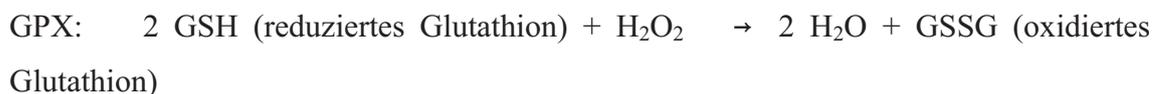
In diesem Zusammenhang treten auf:

- $O_2^{\cdot -}$  (Superoxidanionradikal)
- $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxid)
- $OH^{\cdot}$  (Hydroxylradikal)
- $NO^{\cdot}$  (Stickstoffmonoxid)

Innerhalb der Redoxreaktionen der Atmungskette, die als oxidative Phosphorylierung in der inneren Membran der Mitochondrien abläuft und der ATP-Synthese dient, fallen Superoxidanionradikale an (Boveris and Chance, 1973; Richter et al., 1995). Der Weg ihrer Entgiftung führt über die in den Mitochondrien vorliegende MnSOD, die die Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid umwandelt, das Substrat für zwei weitere antioxidative Enzyme bzw. Enzymfamilien, die Katalase (CAT) und die Glutathionperoxidasen (GPX) (Hassan, 1988; Hess and Manson, 1985). Beide verarbeiten das Wasserstoffperoxid zu Wasser (Aebi, 1984; Cerutti et al., 1988).

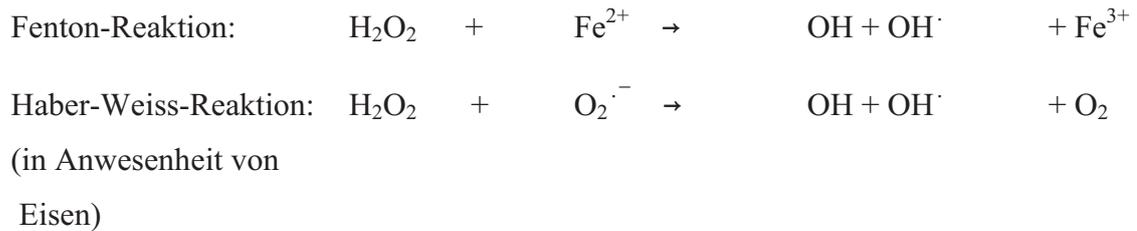


Die Katalase ist ein tetrameres Enzym mit gehäuftem Vorkommen in den Peroxisomen (Kang et al., 1996)



Unter den Glutathionperoxidasen unterscheidet man bei Säugetieren fünf Unterformen (Hann et al., 1998). Ihr hauptsächlichster Unterschied liegt in der Lokalisation, in geringerem Maße in der Struktur. Alle sind Selenoproteine, und alle reduzieren  $H_2O_2$  unter Verbrauch von Glutathion, das durch Glutathionreduktasen mit Hilfe von NADPH in reduzierter Form bereitgestellt wird (Li S et al., 2000).

Sowohl aus dem Superoxidanionradikal als auch aus dem Wasserstoffperoxid können bei fehlender Entsorgung toxischere Reaktionspartner wie die  $OH^{\cdot}$ -Radikale entstehen, für die es keine enzymatischen Entgiftungsmechanismen gibt (Hess and Manson, 1985). Für deren Bildung sind u.a. folgende Reaktionen verantwortlich:



(Cummings et al., 1991)

Ein weiteres hochreaktives Produkt ist Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), das aus der Bindung von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  an Stickstoffmonoxid entsteht (Beckmann and Koppenol, 1996) und u.a. in Hydroxylradikale zerfallen kann (Duchstein et al., 1999).

Angriffspunkte von Radikalen sind Nukleinsäuren, Proteine und Membranen, letzteres mit Induktion der Lipidperoxidation (Brawn and Fridovich, 1981; Goodman and Hochstein, 1977).

## 1.4 Lipidperoxidation

Interaktionen von Radikalen, z.B.  $\text{OH}\cdot$ , mit den ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen, in Kardiomyozyten bereitgestellt vor allem durch das Phospholipid Cardiolipin, führen zu deren Oxidation mit Bildung von Metaboliten, die selbst wiederum DNA-Schäden hervorrufen können (Myers et al., 1977; Esterbauer, 1990). Beteiligt sind Lipidhydroperoxide, Lipidperoxyl-, Lipidalkoxyl-Radikale sowie deren Zerfallsprodukte, reaktive Aldehyde (Esterbauer et al., 1991).

Die Lipidperoxidation erlaubt eine Aussage über das Ausmaß des oxidativen Stresses (Halliwell and Gutterage, 1989). Zur Messung herangezogen wird häufig und wie auch in dieser Arbeit das Malondialdehyd, ein Produkt der Lipidperoxidation (Draper and Hadley, 1990).

## 1.5 Mangan Superoxid Dismutase

Man unterscheidet körpereigene Antioxidantien, zu denen neben den oben erwähnten Enzymen auch Glutathion, Bilirubin und Coenzym Q10 (Ubichinon) zählen (Meister and Anderson, 1983; Yamaguchi et al., 1996; Portakal et al., 2000), von solchen Antioxidantien, die dem Körper zugeführt werden können bzw. müssen. Dazu gehören z.B. Vitamin E und Vitamin C (Singal and Tong, 1988; Shimpo et al., 1991).

Der Organismus besitzt mit den antioxidativen Enzymen eine wirksame Möglichkeit, anfallende Radikale zu eliminieren.

Zu diesen Enzymen zählen, wie oben bereits erwähnt, insbesondere folgende:

- Katalase (CAT)
- Glutathionperoxidasen (GPX)
- Superoxid Dismutasen (SOD)

Die Gruppe der SOD unterteilt sich bei Eukaryonten noch einmal in folgende Untergruppen:

- homodimere CuZnSOD (Vorkommen im Zytosol und Nukleus)
- homotetramere, glykosylierte CuZnSOD (extrazellulär)
- homotetramere Mangan SOD (Vorkommen in den Mitochondrien)

(In Prokaryonten lässt sich zusätzlich eine FeSOD nachweisen)

(Weisinger and Fridovich, 1973a; McCord, 1979; Fridovich, 1989).

Die Superoxid Dismutasen sind Metalloproteine. Sie sind die einzigen physiologischen Antioxidantien, die Superoxidanionradikale "verarbeiten" (Weisinger and Fridovich, 1973b).

Die Rolle der MnSOD ist insofern einzigartig, dass sie nur in den Mitochondrien nachweisbar ist (Slot et al., 1986), welche als eine der wichtigsten Quellen von Superoxidanionradikalen identifiziert wurden (Boveris; 1977; Davies and Doroshov, 1986). Untersuchungen von verschiedenen Geweben konnten dabei die Existenz von fünf Unterformen der MnSOD mit jeweils unterschiedlicher Größe (3.8, 2.7, 2.2, 1.3, 1.1 kb) aufzeigen. Man vermutet alternative Polyadenylierungsvorgänge mit differentem splicing der mRNA als Ursache, da das Vorhandensein mehrerer Gene ausgeschlossen werden konnte (Ho et al., 1991; Hurt et al., 1992; Li et al., 2002).

Die Rolle der MnSOD innerhalb der antioxidativen Abwehrmechanismen einer Zelle und die Bedingungen ihrer Funktionsfähigkeit werden im Diskussionsteil näher beleuchtet.

## 1.6 Fragestellung

Adriamycin führt über verschiedene Mechanismen zu Schäden an der DNA sowie zur Beeinträchtigung der Transkription. Durch die gestörte Bildung der RNA kann es auch

zur Beeinträchtigung der Expression der antioxidativ wirkenden Enzyme kommen. Dies wäre besonders prekär im Fall der Mangan Superoxid Dismutase, weil sie als einziges in den Mitochondrien vorkommendes antioxidatives Enzym direkt den dort gebildeten Radikalen ausgesetzt ist. Von ihrer Effizienz hängt die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien ab.

**In dieser Arbeit wird der Effekt des Adriamycins auf die Expression der Mangan Superoxid Dismutase mittels Northern Blot Analyse in Kardiomyozyten der Ratte untersucht. Begleitend wird das Ausmaß des oxidativen Stresses in Form der Lipidperoxidation bestimmt, da Adriamycin als Generator von Radikalen bekannt ist.**

**Ziel der Arbeit ist die Feststellung, welcher dieser Mechanismen in erster Linie für die Entwicklung kardiotoxischer Effekte verantwortlich ist.**

## **2. Material**

### **2.1 Lösungen und Puffer**

Sofern nicht gesondert angegeben wurde zur pH-Einstellung der Reagenzien Natronlauge (NaOH) oder Salzsäure (HCl) verwendet. Das Wasser, das zur Herstellung der Lösungen und Puffer benötigt wurde, wurde mittels eines Ionenaustauschers deionisiert und in einer Demineralisierungsanlage (Millipore GmbH, Eschborn) aufgearbeitet. Es wird im Folgenden als dH<sub>2</sub>O bezeichnet.

#### **Powell-Medium**

110,0 mM	NaCl
2,6 mM	KCl
1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,2 mM	MgSO <sub>4</sub>
25,0 mM	NaHCO <sub>3</sub> ad dH <sub>2</sub> O

Nach Fertigstellung des Mediums erfolgte eine sterile Filtration mit Filter der Porengröße 0,2 µm und Lagerung bei 4°C. Kurz vor Versuchsbeginn wurde dem Powell-Medium 11,0 mM Glucose beigefügt. Die nun gebrauchsfertige **Perfusionslösung** wurde auf 37°C erwärmt und zur Einstellung des pH auf 7.4 mit Carbogen (95 %O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) angereichert.

#### **CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung**

14,7 g	CaCl <sub>2</sub> ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
--------	--

#### **NaCl 0,9 %-ige Lösung**

9,0 g	NaCl ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
-------	-----------------------------------

#### **Kulturmedium**

Kulturmedium 199 mit Earle's Salzen und L-Glutamin

(PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)

100 g des in Pulverform vorliegenden Mediums wurden in 10 l dH<sub>2</sub>O gelöst, zur Pufferung mit 3,6 g HEPES versetzt und auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Weiterhin erfolgte der Zusatz von 4 %-igem fötales Kälberserum (zur Unterstützung der Zellhaftung) und einer 2 %-igen Antibiotika-Stammlösung aus 100 IU/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycinsulfat (zur Wachstumshemmung von Bakterien).

### **Fötales Kälberserum**

FCS Charge Gold (Sigma, Deisenhofen)

Zur Hitzeinaktivierung wurde das fötale Kälberserum für 30 min im Wasserbad bei einer Temperatur von 57°C inkubiert.

### **Antibiotika-Stammlösung**

100 IU/ml Penicillin G (5000 IU/ml) und 100 µg/ml Streptomycinsulfat (5000 µg/ml) (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein)

### **Deionisiertes Formamid**

(Merck, Darmstadt)

Zur Deionisierung wurden 50 ml Formamid mit 50 g Ionenaustauscherharz für 30 min bei Raumtemperatur verrührt. Die Lösung wurde für weitere 12 h inkubiert und anschließend steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### **DEPC-dH<sub>2</sub>O**

0,01 % (v/v) Diethylpyrocarbonat ad dH<sub>2</sub>O wurde für 20 h bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend autoklaviert.

### **MOPS 10x**

0,2 M	Morpholinopropansulfonsäure
50,0 mM	Natriumacetat
10,0 mM	EDTA
bei pH 7.0	

**PBS 10x**

2,0 g	KCl
80,0 g	NaCl
2,0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,0 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
21,6 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O    ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O

**SSC 20x**

3,0 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat
bei pH 7.0	

**Heringssperma-DNA**

(Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

Auflösung von 10 mg/ml Heringssperma-DNA in dH<sub>2</sub>O mit anschließendem Kochvorgang für 5 min zur Denaturierung. Danach folgten ein wiederholtes Aufziehen der Lösung mit einer Spritze (Kanüle Ø 0,5 µm) und die Lagerung bei -20°C.

**Denhardt's-Lösung 50x**

1 % (w/v)	Ficoll 400
1 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
1 % (w/v)	Rinderserumalbumin Fraktion V    ad dH <sub>2</sub> O

Die Lösung wurde mit einem Filter von 0,2 µm Porengröße steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

**Auftragspuffer**

20 mM	EDTA
50,0 % (v/v)	Glycerin
0,4 % (w/v)	Bromphenolblau
0,4 % (w/v)	p-Xylenolblau ad dH <sub>2</sub> O

**Northern-Hybridisierungspuffer**

1,5 ml	Denhardt's-Lösung 50 x
4,5 ml	SSC 20 x
7,5 ml	deionisiertes Formamid
750 µl	10 % SDS
750 µl	dH <sub>2</sub> O steril
600 µl	10 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

**Northern-Waschpuffer**

2 x	SSC
0,1 % (v/v)	SDS bzw. 0,05 % (v/v) SDS

**Entwickler**

GBX Developer & Replenisher (Processing Chemicals Kodak, Stuttgart)

Die gebrauchsfertige Lösung wurde mit dH<sub>2</sub>O in einer Verdünnung von 1:4 hergestellt.

**Fixierer**

600 g	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
60 g	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ad 2000 ml dH <sub>2</sub> O

**TE-Puffer**

10 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
bei pH 8.0	

**Williams Medium E**

(Sigma, Deisenhofen)

Das 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> enthaltende Williams Medium E wurde vervollständigt durch die Zugabe von 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin und der Antibiotika-Stammlösung aus 100 IU/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycinsulfat.

## 2.2 Enzyme

### Collagenase

Collagenase von *Clostridium histolyticum*

CLS II Charge 1129 mit 331 U/mg bzw. CLS II Charge 1738 mit 276 U/mg

(Firma Biochrom, Berlin)

Die **Collagenase-Lösung** wurde kurz vor Versuchsbeginn hergestellt aus 25 mg Collagenase, 20 ml Powell-Medium und 12,5 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub>.

### T4-Polynukleotid-Kinase

10 U/µl, Lieferung einschließlich 10x Phosphorylierungspuffer

(Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

## 2.3 Reaktionsansätze

**Random Primed DNA Labeling Kit** (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

bestehend aus:

Reaktionsmix (Mischung aus Hexanukleotiden)
Klenow Enzym (2 U/µl)
dATP (0.5 mmol/l)
dGTP (0.5 mmol/l)
dCTP (0.5 mmol/l)
dTTP (0.5 mmol/l)

## 2.4 Oligonukleotid

### 18S rRNA

Sequenz: 5'-GCC GTG CGT ACT TAG ACA TGC ATG-3' (Chan et al., 1984)

(Appligene, Heidelberg)

## 2.5 Radioaktivität

### Desoxycytidin-5'-( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-triphosphat

32p-dCTP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig)

10 MBq bei einer spez. Aktivität von 3000 Ci/mmol (= 111 TBq/mmol)

### **Adenosin-5'-( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)-triphosphat**

32p-dATP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig)

10 MBq bei einer spez. Aktivität von 3000 Ci/mmol (= 111 TBq/mmol)

## **2.6 Chemikalien**

Nicht gesondert aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

<b>Adriblastin 10 mg</b>	Doxorubicin Hydrochlorid (Pharmacia GmbH, Erlangen)
<b>Agarose</b>	Molecular Biology Grade (Eurogentec Deutschland GmbH)
<b>Albumin</b>	Rinderserumalbumin der Fraktion V (BSA), heatshocked (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg)
<b>Ameisensäure</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Bromphenolblau</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Carbogen</b>	1013 CO <sub>2</sub> (Air Liquide GmbH, Düsseldorf)
<b>Chloroform</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Diethylpyrocarbonat</b>	(Sigma, Deisenhofen)
<b>EDTA</b>	Titriplex III (Merck, Darmstadt)
<b>Ethanol</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Ether</b>	(Hoechst AG, Deutschland)
<b>Ethidiumbromid</b>	(Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein)
<b>Ficoll 400</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Formaldehyd</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Glucose</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>Glykogen</b>	Ultra Pure Glykogen (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein) Stocklösung von 20 µg/µl in RNase-freiem dH <sub>2</sub> O; nach Verdünnung mit sterilem dH <sub>2</sub> O im Verhältnis 1:2 folgt die Endkonzentration von 10 µg/µl

<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; pH 7.5 (Sigma, Steinheim)
<b>Ionenaustauscherharz</b>	AG 501-X8 Resin (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
<b>Isopropanol</b>	(Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein)
<b>L-Glutamin</b>	(Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein)
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (Sigma, Deisenhofen) Stocklösung: 3,5 mg MTT in 1 ml PBS 1x
<b>MnSOD cDNA</b>	Größe des Genfragments: 1.4 kb Plasmid pSP65-RMS/Vektor: pSP65 (zur Verfügung gestellt von Dr. Ye-Shih Ho, Institute of Chemical Toxicology, Wayne State University, Detroit, Michigan, USA – Ho and Crapo, 1987)
<b>Polyvinylpyrrolidon</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>p-Xylenolblau</b>	(Merck, Darmstadt)
<b>SDS</b>	Na-Dodecylsulfat (Serva, Heidelberg)
<b>Trizol</b>	TRIzol™ (Total RNA Isolation) Reagent (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein)

## 2.7 Geräte

<b>Brutschrank</b>	IG 150 (Jouan, Unterhaching)
<b>Densitometer</b>	Gel Doc TM 2000-Gel Documentation Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) Darkroom Cabinet mit - white light: Epi-Illumination Transillumination - UV-Transillumination CCD Camera 8-bit mit PCI Digitizing Card; Quantitation Software Win/Macintosh: Quantity One 4.1.0

<b>Elektrophoresekammer</b>	(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
<b>Handmonitor</b>	Modell LB 1210B (Berthold, Bad Wildbad)
<b>HPLC</b>	(Kontron Instruments, Milano) HPLC 360 Autosampler HPLC 332 Detector SFM 25 Spectrofluorometer Software: PC Integration Pack Version 3.92
<b>Mikroskop</b>	Axiovert 100 (Zeiss, Jena)
<b>Mikrowelle</b>	CEM Modell MDS-81 (Kürner, Rosenheim)
<b>pH-Meter</b>	PHM 93 Reference pH-Meter (Radiometer, Kopenhagen)
<b>Photokamera</b>	SLR Camera AE-1 (Canon, Deutschland)
<b>Photometer</b>	Lambda 5 UV/VIS Spectrophotometer Lambda 12 UV/VIS Spectrometer (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
<b>Schüttler</b>	KL 2 (Bühler, Tübingen)
<b>Sterilbank</b>	LC 2 (Jouan, Unterhaching)
<b>Wasserbad</b>	Certomat WR (Braun, Melsungen)
<b>Zentrifugen</b>	Kühlzentrifuge Cryofuge 8500i, Rotor 6606 (Firma Heraeus, Hanau) Kühlzentrifuge MR 1812 (Jouan, Unterhaching) Tischzentrifuge Eppendorf DW 41 (Qualitron Inc., Korea) Zentrifuge Micro 24-48 (Hettich, Tuttlingen) Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415C (Eppendorf GmbH, Engelsdorf)

## 2.8 Hilfsmittel

<b>chirurgisches Werkzeug</b>	Bauchdeckenschere 160 mm, 6 ¼“ Präparierschere groß 170 mm, 6 ¾“ Präparierschere klein 145 mm, 5 ¾“
-------------------------------	---

---

	(Äskulap, Tuttlingen)
	Kapselpinzette Gill-Arruga-Kolibri
	(Eickemeyer, Tuttlingen)
<b>HPLC-Säule</b>	Nova Pack® C <sub>18</sub> -Säule 3.9 x 150 mm
	(Millipore GmbH, Eschborn)
<b>Hybridisieremembran</b>	Hybond-N (Amersham Life Science, Braunschweig)
<b>Hybridisierungstube</b>	Hybritube 15 (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein)
<b>Kulturplatten</b>	Zellkulturplatten Falcon 3004, Ø 60 mm
	(Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
<b>Membranfilter</b>	Porengröße 0,2 µm (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel)
	Porengröße 0,45 µm (Sartorius, Göttingen)
<b>3MM-Papier</b>	(Whatman International Ltd., Maidstone, GB)
<b>Nylonnetz</b>	Siebewebe aus Polyamid, Maschenweite 200 µm
	(NeoLab, Heidelberg)
<b>Petrischalen</b>	Kunststoff Ø 9 cm, Glas Ø 20 cm (Greiner GmbH, Solingen)
<b>Photofilm</b>	Fujichrome Professional Process CR-56
	(Fujichrome, Deutschland)
<b>Röntgenfilm</b>	Kodak X-OMAT AR (Grosche, Bochum)
<b>Verstärkerfolien</b>	(Appligene, Heidelberg)
<b>Zellzählkammer</b>	Fuchs-Rosenthal (Brand, Wertheim)

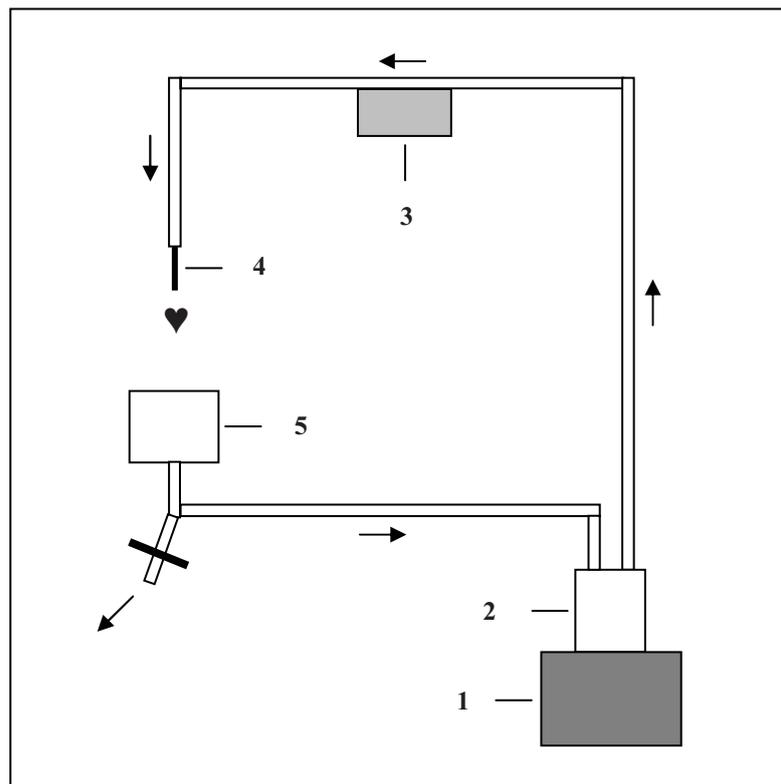
### 3. Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Die für diese Arbeit verwendeten Kardiomyozyten wurden aus den Herzen männlicher Wistar-Kyoto Ratten isoliert. Das Körpergewicht der Versuchstiere betrug 280-350 g. Die Tiere wurden von der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt und mit Wasser und handelsüblichem Futter ad libitum versorgt.

#### 3.2 Versuchsapparatur

Die folgende Abbildung beschreibt die zur Isolierung der Kardiomyozyten verwendete Apparatur. Die wichtigsten Bestandteile werden in numerischer Reihenfolge kurz vorgestellt. Im Kapitel 3.3 wird genauer auf die Funktion der Anlage eingegangen.



**Abb. 3a:** Schematische Zeichnung des Perfusionssystems nach Langendorff

1 Wasserbad zur Erwärmung der Perfusionslösung auf 37°C

2 Reservoir für die Perfusionslösung bei gleichzeitiger Carbogenbegasung

3 Pumpe zur Regulierung der Tropfgeschwindigkeit

4 Kanüle zur Befestigung des Herzens

5 Auffangbehälter zur Aufrechterhaltung der Zirkulation

### 3.3 Präparation von Kardiomyozyten

Die im folgenden Kapitel beschriebene Präparation der Kardiomyozyten wurde nach der Methode von Herrn Prof. H. M. Piper durchgeführt (Piper et al., 1990).

Zur Präparation der ventrikulären Kardiomyozyten wurden männliche Wistar-Kyoto Ratten von 280-350 g Körpergewicht verwendet.

Vor Versuchsbeginn wurden 100 ml Perfusionslösung bestehend aus Powell-Medium und Glucose in einem im Wasserbad befindlichen Reservoir auf 37°C erwärmt und mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) äquilibriert. Sowohl die Erwärmung als auch die Begasung wurden während des gesamten Versuches fortgesetzt. Mit 60 ml der Lösung wurde anschließend die Langendorff-Apparatur luftblasenfrei gefüllt, ehe die Zirkulation mittels einer Pumpe auf eine Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde eingestellt wurde (5 ml/min).

Danach wurden die Versuchstiere in eine tiefe Ethernarkose versetzt. Ihre Herzen wurden mit einem intakten Aortenbogen herausgeschnitten und sogleich in eiskalte 0,9 %-ige NaCl-Lösung gelegt. Nach Entfernung überschüssigen mediastinalen Gewebes wurden die Herzen durch Überstülpen der Aorta und ohne Verletzung der Aortenklappe an der dafür vorgesehenen Kanüle der Langendorff-Anlage befestigt. Die Tropfgeschwindigkeit wurde auf 2 Tropfen pro Sekunde (10 ml/min) erhöht und die Zirkulation unterbrochen. Die Herzen wurden für 4 min perfundiert und so von thrombotischem Material gereinigt. Die in dieser Zeit durchlaufende Menge von 40 ml wurde verworfen. Nach Zugabe von 20 ml Collagenase-Lösung wurde die Zirkulation mit einem Gesamtvolumen von 80 ml wieder hergestellt. Die weitere Perfusionszeit betrug 25 min.

Nach erfolgter Perfusion wurden die Herzen von der Kanüle gestreift, die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel mit zwei Skalpelln zu einem Zellbrei zerkleinert. Der Zellbrei wurde anschließend zum Nachverdau für weitere 10 min in 30 ml der mit Collagenase angereicherten Perfusionslösung aus der Anlage inkubiert. Die Carbogenbegasung wurde in dieser Zeit aufrechterhalten und der Zellbrei wiederholt mit einer 5 ml-Pipette zur besseren Gewebeauflösung auf- und abgesogen.

Im Anschluss an den Nachverdau erfolgte die Filtration des Zellbreis durch ein Nylonnetz von 200  $\mu\text{m}$  Maschenweite. Die daraus entstehende Suspension wurde für 3 min bei 20°C mit 25 x g zentrifugiert (Cryofuge 8500i). Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment mit den Myozyten wurde in 10 ml Lösung (aus 50 ml Powell-Medium und 100  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ -Stammlösung) aufgenommen, die darauffolgende Zentrifugation wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Danach wurde das Sediment erneut in 10 ml Lösung aufgenommen (aus 50 ml Powell-Medium und 200  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ -Stammlösung) und zur Verbesserung der Ausbeute intakter Zellen auf einen 4 %-igen Albumingradienten aus 50 ml Powell-Medium, 500  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ -Stammlösung und 2 g BSA geschichtet. Die Suspension wurde für 1 min bei 20°C mit 15 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Sediment aus Kardiomyozyten in auf 37°C erwärmtem und mit 4 %-igem FCS und 2 %-iger Antibiotika-Stammlösung versehenem Kulturmedium 199 aufgenommen.

### 3.4 Kultivierung

Vor der Aussaat der Kardiomyozyten wurde eine mikroskopische Kontrolle mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer zur Erfassung der Zellzahl durchgeführt. Die Ausbeute an intakten, stäbchenförmigen Zellen betrug zwischen  $4 \times 10^5$  und  $8 \times 10^5$ . Die Ausplattierung der Zellsuspension erfolgte unter sterilen Bedingungen auf Kulturplatten von 60 mm Durchmesser. Zur Verbesserung der Zellhaftung waren die Platten am Vortag mit 3 ml Kulturmedium und 4 %-igem FCS im Brutschrank bei 37°C und 95 %  $\text{O}_2$  / 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert worden. Am Tag der Präparation wurde das alte Kulturmedium entfernt. Die Kardiomyozyten wurden mit einer Mindestdichte von  $6 \times 10^4$  Zellen pro Schale auf die feuchte Oberfläche ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Das Zellbild zu diesem Zeitpunkt wird in Abbildung 3b verdeutlicht.



**Abb. 3b:** Photographische Darstellung der Kardiomyozyten nach Aussaat auf die Kulturplatten

Nach 4 h wurde das Medium gewechselt. Einzelne Zellfragmente und bis dahin nicht abgelagerte, lysierte Herzmuskelzellen wurden mit dem Überstand entfernt. Anschließend wurden die Kulturschalen nach dem Zufallsprinzip in **Kontrollgruppe** und **Versuchsgruppe** aufgeteilt. Die Schalen der Kontrollgruppe erhielten je 2 ml Kulturmedium, die Schalen der Versuchsgruppe je 2 ml Kulturmedium, das mit Adriamycin in der zu untersuchenden Konzentration angereichert worden war. Die Schalen wurden für weitere 24 h im Brutschrank unter den zuvor beschriebenen Bedingungen inkubiert.

Für einen Teil der Versuche wurde auf Zellpräparationen zurückgegriffen, die die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Schlüter in Gießen freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte.

### 3.5 Messung der Lipidperoxidation durch Nachweis von MDA

Nach 24stündiger Inkubation wurden die Medien der Kontroll- und Versuchsschalen für 30 min bei 4°C mit 2580 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur Durchführung der MDA-Bestimmung bei -20°C gelagert.

Der Nachweis von Malondialdehyd (MDA) im Medium kultivierter Zellen ermöglichte eine Aussage über das Maß der Lipidperoxidation, die während der Inkubationszeit stattfand. Verwendet wurde hierzu die modifizierte Methode nach Draper (Draper et al., 1993). Die Methode arbeitet mit der Bildung eines Komplexes aus MDA und Thiobarbitursäure (TBS), welcher durch eine hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und die nachfolgende Fluoreszenzdetektion messbar gemacht wird. Dazu wurden jeweils 0,5 ml der Zellüberstände einem Gemisch beigefügt, das aus 0,5 ml einer gesättigten Thiobarbitursäure, 20 µl einer 0,2 %-igen Butylhydroxytoluol-Lösung in Methanol und 1,05 ml einer 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 2.7) zusammengesetzt war. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad für 30 min bei 93°C. Nachdem das Gemisch 10 min lang auf Eis gekühlt worden war, wurde eine Zentrifugation für 5 min mit 5000 Upm angeschlossen (Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415C). Von den dabei gewonnenen Überständen wurden 20 µl über eine Nova Pack<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-Säule mittels HPLC aufgetrennt, wobei die mobile Phase, bestehend aus 20 % (v/v) Acetonitril und 0,6 % (v/v) Tetrahydrofuran in 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 6.7), eine Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min aufwies. Mit einer Retentionszeit von 3,1-3,2 min wurde der MDA-TBS-Komplex durch einen Fluoreszenzdetektor ermittelt und quantifiziert. Die Exzitation erfolgte bei einer Wellenlänge von 532 nm, die Emission bei 553 nm. Ausgewertet wurden die Messungen mit Hilfe einer Eichkurve, die mit in Methanol konzentriertem Tetraethoxypropan in unterschiedlichen Verdünnungen erstellt worden war, ehe sie in Williams Medium E aufgenommen worden war.

Zur Aufnahme der Daten und ihrer Auswertung wurde die Software PC Integration Pack Version 3.92 eingesetzt.

Freundlicherweise hat Frau Dr. Tran-Thi aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kahl sowohl die Aufarbeitung der Proben als auch die Bestimmung des MDA durchgeführt.

### 3.6 Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Test

Zur Bestimmung der Viabilität wurde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) verwendet, ein gelbes Salz, das durch in Mitochondrien gelegene Dehydrogenasen lebender Zellen in das blaue Formazansalz umgewandelt wird. Durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 560 nm, die dem Absorptionsmaximum des Formazans entspricht, lässt sich damit eine Aussage über die Aktivität der Dehydrogenasen machen, die wiederum ein indirektes Maß für die Viabilität der Zellen darstellt.

Verwendet wurde hierzu die modifizierte Methode nach Mosmann (Mosmann, 1983). Nach einer 24stündigen Inkubation der mit Kulturmedium bzw. Adriamycin behandelten Kardiomyozyten wurde der Zellüberstand entfernt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit je 2 ml einer Lösung aus 1x PBS und MTT (3,5 mg/ml) in dem Verhältnis 1:5, so dass eine MTT-Endkonzentration von 0,7 mg/ml pro Schale vorlag. Die Schalen wurden für 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und das gebildete blaue Formazan in 1,5 ml eines Gemisches aus Isopropanol und Ameisensäure (95:5) gelöst. Nach einer Verdünnung mit Isopropanol und Ameisensäure (95:5) im Verhältnis 1:3 wurde die Farbintensität der Formazan-Lösung photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen (Lambda 5 UV/VIS Spectrophotometer). Die Farbintensität der Kontrollgruppe wurde einer Viabilität von 100 % gleichgesetzt.

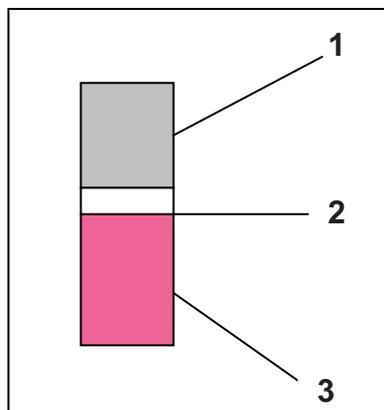
### 3.7 Isolierung der RNA

Die Isolation der RNA aus Zellen setzt sich aus mehreren Schritten zusammen, die im Folgenden näher beschrieben werden:

- ◆ Homogenisierung des zu untersuchenden Gewebes
- ◆ Auftrennung in Phasen
- ◆ Präzipitation der RNA
- ◆ Reinigung der RNA
- ◆ Aufnahme der RNA in eine Lösung

Zur Durchführung wurde Trizol verwendet, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die intakte Zellen lysiert und die darin befindliche RNA während der Isolierung vor Schädigungen durch RNasen schützt.

Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellüberstände der mit Kulturmedium bzw. Adriamycin behandelten Kardiomyozyten entfernt. Die Zellen der Kontroll- und Versuchsgruppe wurden jeweils in 800 µl Trizol aufgenommen, die Suspensionen wurden anschließend durch das mehrfache Aufziehen mit einer Spritze (Kanüle Ø 0,5 µm) homogenisiert. Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute wurden 10 µg Glykogen (10 µg/µl) als Carrier hinzugefügt, danach wurden die Suspensionen erneut mehrmals mit der Spritze aufgezogen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation der Nukleinsäuren-Protein-Komplexe zu erreichen. Nach Zugabe von 160 µl Chloroform, kräftigem Schütteln der Proben für 15 s und einer Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 min bei 4°C mit 12.000 Upm zentrifugiert (Kühlzentrifuge MR 1812). Danach hatten sich die Proben in drei deutlich voneinander abzugrenzende Phasen aufgeteilt, wie es in der Abbildung 3c beschrieben wird.



**Abb. 3c:** Schematische Phasenauftrennung nach Zentrifugation

**1** farblose, wässrige Phase: RNA

**2** weißliche Phase: Protein

**3** rote Phase: organisches Material (Membranbestandteile, Polysaccharide, DNA), Trizol

Die obere, wässrige Phase mit der darin befindlichen RNA wurde vorsichtig abgenommen und mit 400 µl Isopropanol gemischt. Nach einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch für 10 min bei 4°C mit 11.000 Upm

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die am Boden des Röhrchens präzipitierte RNA wurde in 800 µl einer 75 %-igen Ethanol-Lösung (in DEPC-dH<sub>2</sub>O) aufgelöst und ein weiteres Mal für 5 min bei 4°C mit 11.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Die RNA wurde für 10 min leicht luftgetrocknet. Um ihre Löslichkeit nicht zu vermindern, wurde ein vollständiges Austrocknen vermieden. Anschließend wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem DEPC-dH<sub>2</sub>O aufgenommen und zur Verbesserung der Löslichkeit für 10 min im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

### 3.8 Quantifizierung und Qualitätsprüfung der RNA

Zur Quantifizierung der RNA und zur Prüfung ihrer Qualität wurde die zu untersuchende RNA-Probe mit DEPC-dH<sub>2</sub>O in einem Verhältnis von 1:200 verdünnt. Danach wurde photometrisch die optische Dichte (OD) der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm erfasst (Lambda 12 UV/VIS Spectrometer).

Zur Quantifizierung wurde die **OD<sub>260</sub>** herangezogen, die bei einem Wert von 1.0 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht (Sambrook et al., 1989)

Eine Aussage über die Qualität der Probe gibt der Reinheitsfaktor, der sich aus dem Quotienten der **OD<sub>260</sub>** und **OD<sub>280</sub>** errechnet. Bei Werten zwischen 1.7 und 2.0 ist die Reinheit der isolierten RNA am höchsten, ihre Kontamination mit DNA oder Protein damit am geringsten (Sambrook et al., 1989).

### 3.9 Northern Blot

Mit der Methode des Northern Blot werden spezifische Nukleinsäuresequenzen bestimmt, die als komplementäre Kopien eines Gens eine Aussage über dessen Expression geben. Folgende Einzelschritte sind hierzu erforderlich, sie werden nacheinander ausführlicher behandelt:

- ◆ Elektrophoretische Auftrennung der isolierten RNA im Agarosegel
- ◆ Transfer der RNA auf eine Nylonmembran
- ◆ Radioaktive Markierung der Sonden (Labeling)
- ◆ Hybridisierung der Membran mit radioaktiv markierten Sonden
- ◆ Nachweis der markierten Banden mittels Autoradiographie

Verwendet wurde die modifizierte Methode nach Sambrook (Sambrook et al., 1989).

### 3.9.1 Elektrophorese

Zur Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Verwendet wurde hierzu ein 1 %-iges Agarosegel, das aufgrund seiner Porengröße von 150 nm in der Lage ist, Moleküle einer Größe von 0.4 kb bis 6 kb zu trennen.

Die Herstellung erfolgte durch Auflösen von 2,5 g Agarose in 25 ml 10x MOPS-Puffer und 180 ml dH<sub>2</sub>O für 6 min bei 75°C in der Mikrowelle (CEM Modell MDS-81). Nach Abkühlen der Lösung auf 60°C wurden Formaldehyd und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 2,2 M bzw. 0,2 µg/ml hinzugefügt. Ethidiumbromid wird zum Zweck der Färbung eingesetzt, da es die Fähigkeit besitzt, durch Interkalation einen Komplex mit Nukleinsäuren zu bilden, der durch UV-Licht als orangefarbene Bande sichtbar gemacht werden kann.

Das Gel wurde in einer horizontalen Kammer gegossen. Nachdem es geliert war, wurde es zur Verbesserung der elektrischen Leitfähigkeit vollständig mit 1x MOPS-Puffer bedeckt. Anschließend wurden die RNA-Proben aufgetragen.

Vor Durchführung der Elektrophorese wurden die RNA-Proben denaturiert. Hierzu wurden je 5 µg RNA mit 50 % deionisiertem Formamid, 2,2 M Formaldehyd und 1x MOPS-Puffer gemischt und für 3 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben sogleich in Eis gekühlt. Nach Zusatz von je 5 µl Auftragspuffer wurden die RNA-Proben auf das Agarosegel aufgetragen. Die Funktion des Auftragspuffers besteht in der Markierung der Laufstrecke zur besseren Verfolgung der Elektrophorese.

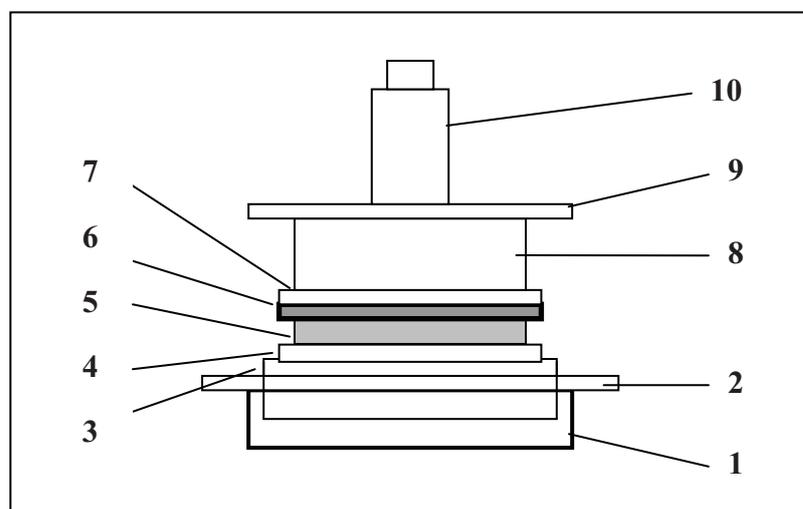
Die Elektrophorese erfolgte für 20 h bei 25 V.

In dieser Methode macht man es sich zunutze, dass die Phosphatgruppen im Diesterrückgrat der Nukleinsäuren unter den vorliegenden Bedingungen eine negative Ladung annehmen. Als Polyanion wandern die Nukleinsäuren im elektrischen Feld von der negativen zur positiven Elektrode, der Anode. Dabei wird die Beweglichkeit der Moleküle von ihrer Größe bestimmt, was zu der gewünschten Auftrennung der Nukleinsäuren führt.

Nach beendeter Elektrophorese wurde die mit Ethidiumbromid angefärbte RNA im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm betrachtet. Beurteilt wurde hierbei das Verhältnis der 28S rRNA zur 18S rRNA, das mit 4.7 kb bzw. 1.87 kb bei 3:1 liegen sollte.

### 3.9.2 Transfer

Die Übertragung der aufgetrennten RNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran wurde durch Diffusion erreicht. Hierzu wurde eine Glasschale mit 1000 ml 20x SSC-Puffer gefüllt und eine Glasplatte quer über sie gelegt. Auf die Platte wurde eine Lage 3MM-Papier so abgelegt, dass ihre beiden Enden in den Puffer reichten. Zwei weitere Lagen 3MM-Papier, deren Größe dem des Gels entsprach, kamen hinzu. Ihnen wurde das Gel mit der Oberseite aufgelegt, umgeben von einer zugeschnittenen Plastikfolie. Das Gel wurde luftblasenfrei mit der Nylonmembran bedeckt, welche zuvor mit dH<sub>2</sub>O und 2x SSC-Puffer benetzt worden war. Darüber wurden erneut zwei Lagen 3MM-Papier gelegt sowie mehrere Zentimeter hohe Lagen an Zellstoff. Zuoberst wurde eine Glasplatte aufgelegt, die ein Gewicht von 500 g trug, das sich gleichmäßig auf die darunterliegende Fläche verteilte. Abbildung 3d verdeutlicht den Aufbau.



**Abb. 3d:** Schematische Darstellung des Verfahrens für den Transfer der RNA

1 Glasschale mit 20x SSC-Puffer, 2 Glasplatte, 3 3MM-Papier in SSC reichend, 4 2 Lagen 3MM-Papier, 5 Agarosegel mit umgebender Plastikfolie, 6 Nylonmembran, 7 2 Lagen 3MM-Papier, 8 Zellstoff, 9 Glasplatte, 10 Gewicht

Die hier dargestellte Methode des Northern Blot arbeitet mit dem Prinzip der Kapillarkräfte, die es dem SSC-Puffer ermöglichen, in den Schichten aus 3MM-Papier und Zellstoff aufzusteigen.

Durch diese Bewegung wird die RNA aus dem Gel gezogen, sie bindet sich an die darüberliegende Nylonmembran. Erleichtert wird der Transfer durch die hohe Salzkonzentration des SSC-Puffers sowie durch die positive Ladung der Membran. Die Plastikfolie, die das Agarosegel umgibt, verhindert dabei ein seitliches Austreten des Puffers. Das Gewicht auf der obersten Glasplatte gewährleistet durch gleichmäßigen Druck auf das gesamte Gel, dass die RNA vollständig transferiert wird.

Nach 48 h wurde der Transfer beendet. Gewicht und Papierschichten wurden entfernt, die Nylonmembran wurde für 10 min in einer Schüssel mit 2x SSC-Puffer gewaschen (Schüttler KL2) und anschließend auf 3MM-Papier für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Vollständigkeit des RNA-Transfers wurde durch Betrachten des Agarosegels im UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) geprüft. Waren keine RNA-Spuren auf dem Gel nachweisbar, wurde die RNA über kovalente Bindung auf der Nylonmembran fixiert, indem die Membran für 3 min UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm ausgesetzt wurde.

### **3.9.3 Herstellung von Sonden**

Um aus der gesamten, auf der Membran getrennt vorliegenden zellulären RNA eine bestimmte Sequenz finden und analysieren zu können, bedient man sich der Hybridisierung. Verwendet werden hierzu Sonden, Fragmente aus DNA oder RNA, die komplementär an die gesuchte Sequenz binden, nachdem sie zur Identifikation in einer separaten Labeling Reaktion radioaktiv markiert worden sind.

In dieser Arbeit wurde für den Nachweis von mRNA der MnSOD eine cDNA-Sonde eingesetzt, die als 1.4 kb großes Genfragment in ein Plasmid eingearbeitet war (Ho and Crapo, 1987).

Die 18S rRNA-Sonde zur Ladungskontrolle bestand dagegen aus einem Oligonukleotid (Chan et al., 1984).

Die Isolierung des MnSOD-Genfragments aus dem Plasmid soll im nächsten Kapitel näher erläutert werden.

### 3.9.3.1 Isolierung von cDNA-Sonden aus Plasmiden

Als Prokaryonten besitzen Bakterien keine Kernmembran, ihre DNA liegt somit als einzelnes Ringchromosom frei im Zytoplasma. Zusätzliches DNA-Material stellen Plasmide dar, ringförmige Moleküle aus doppelsträngiger DNA. Mit einer Größe von bis zu  $200 \times 10^6$  Basenpaaren (1-3 % des zellulären Gesamtgenoms) und einem Vorkommen von bis zu 1000 Kopien pro Zelle verleihen sie dem Bakterium durch Kodierung verschiedener Eigenschaften Überlebensvorteile. Transkription und Translation laufen dabei unabhängig vom Ringchromosom ab. In der Kodierung enthalten sind z.B.

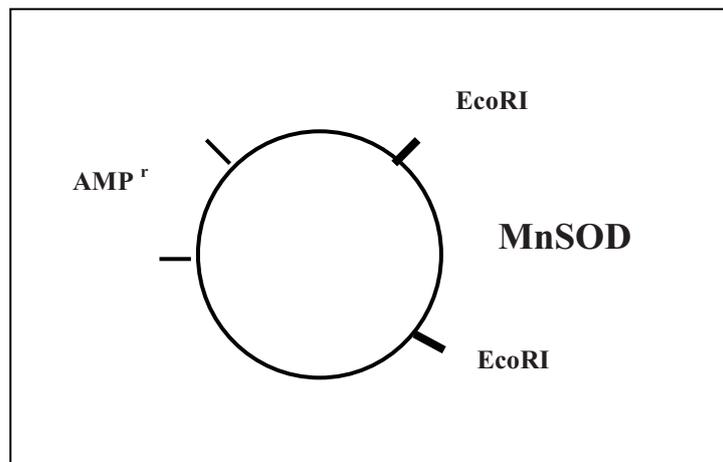
- ◆ Antibiotikaresistenzen
- ◆ Bildung von Toxin
- ◆ Virulenzfaktoren allgemein

Plasmide können durch Konjugation von Bakterien zu Bakterien weitergegeben werden.

Zu wissenschaftlichen Zwecken ist es möglich, spezifische Gensequenzen durch Klonierung in Plasmide einzuarbeiten. Die Plasmide werden zur weiteren Vervielfältigung wiederum in Bakterien eingeschleust.

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA des MnSOD-Gens der Ratte war an EcoRI-Restriktionsschnittstellen des Plasmids pSP65-RMS einkloniert worden (Ho and Crapo, 1987). Die Größe des Gens betrug 1.4 kb, die Gesamtgröße des Plasmids 4.405 kb. Zusätzlich wies das Plasmid eine Resistenz gegen Ampicillin auf, was die Selektion der Bakterien, die das modifizierte Plasmid enthielten, erleichterte.

Das Plasmid war freundlicherweise von Dr. Ye-Shih Ho vom Institut für chemische Toxikologie der Wayne State Universität in Detroit, USA zur Verfügung gestellt worden.



**Abb. 3e:** Schematische Darstellung des Plasmids pSP65-RMS und des darin enthaltenen MnSOD-Fragments an den EcoRI-Schnittstellen; AMP<sup>r</sup>: Ampicillinresistenz

Die Isolierung der cDNA-Sonde aus dem Plasmid erfolgt durch Einsatz von Restriktionsenzymen, die den Doppelstrang an den für sie vorgesehenen Schnittstellen unterbrechen und das Fragment freisetzen. Im Fall der MnSOD cDNA-Sonde bediente man sich der Restriktionsendonuklease des Bakteriums *Escherichia coli*, der EcoRI. Zur vollständigen Trennung von Restplasmid und geschnittenem Fragment wird eine Elektrophorese in einem 1 %-igen Agarosegel angeschlossen. Die dafür verwendete Low-melting-point-Agarose zeichnet sich durch einen Schmelzpunkt aus, der bereits bei geringen Temperaturen erreicht wird und so die nachfolgende Elution des Fragments aus dem Gel vereinfacht.

### 3.9.4 Radioaktive Markierung

Die zur Hybridisierung verwendete cDNA-Sonde und 18S rRNA-Sonde wurden nach verschiedenen Methoden radioaktiv markiert, wie im Folgenden beschrieben wird.

#### 3.9.4.1 MnSOD cDNA-Sonde

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde wurde mit dem Random Primed Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Dazu wurden 50 ng des aus dem Plasmid isolierten doppelsträngigen DNA-Fragments für 10 min bei 100°C denaturiert, sogleich auf Eis gekühlt und einem Gemisch aus Hexanukleotiden und Desoxyribonukleotidtriphosphaten beigefügt. Die Hexanukleotide dienen hierbei als sogenannte Primer, Startermoleküle, die durch Anlagerung an die Randposition des

unmarkierten DNA-Einzelstranges die Synthese eines komplementären Stranges erst ermöglichen. Die Desoxyribonukleotidtriphosphate sind die Bausteine, aus denen der neue Strang zusammengesetzt wird. Durch Zugabe des Klenow-Enzyms wurde ihr Einbau eingeleitet, beginnend am 3'-Ende der Primer. Das Klenow-Enzym ist mit 76.000 Dalton das größere von zwei Fragmenten, welches durch Spaltung der DNA-Polymerase I aus *E.coli* gewonnen wird. Es besitzt die gesamte Polymerase-Aktivität sowie die 3' → 5' Exonukleaseaktivität. Da ihm die 5' → 3' Exonukleaseaktivität fehlt, wird der Abbau der soeben erbauten Doppel-DNA unterbunden.

Die Markierung wurde vervollständigt durch Zugabe und Einbau von 50 µCi Desoxycytidin-5'-(α-<sup>32</sup>P)-triphosphat. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend zur Beschleunigung der DNA-Synthese für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Hinzufügen von 0,2 M EDTA (pH 8.0) und TE-Puffer im Verhältnis von 1:40.

Das Prinzip des Random Priming erfolgte gemäß der Beschreibung durch Feinberg (Feinberg and Vogelstein, 1984).

#### **3.9.4.2 18S rRNA-Sonde**

Die RNA eukaryotischer Ribosomen liegt in vier Untereinheiten vor: 28S, 5.8S und 5S rRNA im 60S Partikel, 18S rRNA im 40S Partikel. Die in dieser Arbeit verwendete 18S rRNA stammte gemäß Chan und seinen Mitarbeitern (Chan et al., 1984) aus der Ratte und besaß die Sequenz 5'-GCC GTG CGT ACT TAG ACA TGC ATG-3'. Die radioaktive Markierung erfolgte, indem 1 µl der 18S rRNA-Sonde (23,6 µM), 60 µCi Adenosin-5'-(γ-<sup>32</sup>P)-triphosphat und 10 U T4-Polynukleotid-Kinase in 1 µl 10x Phosphorylierungspuffer gelöst und für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert wurden. In dieser Zeit transferierte die T4-Polynukleotid-Kinase die im radioaktiven Nukleotid enthaltene Phosphatgruppe auf das 5'-Ende der 18S rRNA. Die Phosphorylierungsreaktion wurde beendet, indem das Gemisch auf Eis gekühlt wurde.

#### **3.9.5 Hybridisierung**

Der Vorgang der Hybridisierung ist die reversible und komplementäre Anlagerung markierter Sonden an spezifische Nukleinsäuresequenzen, die fixiert auf einer Membran vorliegen. Die auf diese Weise gebildeten Doppelstränge aus einem markierten und einem unmarkierten Einzelstrang nennt man Hybride. Ihre Stabilität

richtet sich nach der Schmelztemperatur, d.h. der Temperatur, bei der nur noch die Hälfte der Moleküle als Doppelstrang vorliegt. Die Temperatur wiederum wird bestimmt von Salzkonzentration, CG-Gehalt und Agenzien wie Formamid. Während monovalente Kationen wie  $\text{Na}^+$  und ein hoher Gehalt an Cytosin und Guanin die Stabilität erhöhen, wirkt Formamid destabilisierend. Pro prozentuaalem Anteil Formamid wird die Schmelztemperatur um  $0,61^\circ\text{C}$  gesenkt. Die optimale Hybridisierungstemperatur  $T_{\text{hyb}}$  liegt um  $25^\circ\text{C}$  unterhalb der Schmelztemperatur und ist für RNA-Sonden höher als für DNA-Sonden.

Um die Anzahl unspezifischer Bindungen zwischen den Sonden und den unmarkierten Nukleinsäuren zu reduzieren, wurde die Nylonmembran zunächst prähybridisiert. Hierzu wurde die Membran in einem Hybridisierungsröhrchen mit Northern-Hybridisierungspuffer über Nacht im Wasserbad bei  $44^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch die darin enthaltene denaturierte, heterologe DNA des Heringsspermas (10 mg/ml).

Anschließend wurde die Hybridisierung der auf der Membran fixierten RNA vorgenommen. Der Vorgang wird in den folgenden Abschnitten für jede Sonde einzeln behandelt.

#### **3.9.5.1 Hybridisierung mit cDNA-Sonde**

Für die DNA/RNA-Hybridisierung wurden die radioaktiv markierte MnSOD cDNA-Sonde und 600  $\mu\text{l}$  Heringssperma-DNA (10 mg/ml) durch einen Kochvorgang für 10 min denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Das Gemisch wurde dem Northern-Hybridisierungspuffer beigesetzt und die Inkubation der Membran im Wasserbad bei  $44^\circ\text{C}$  für 24 h fortgesetzt. In dieser Zeit lagerte sich die cDNA-Sonde komplementär unter Bildung von Wasserstoffbrücken an die für sie spezifischen Sequenzen an.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zur Entfernung der unspezifisch und damit instabil gebundenen Sonde mit Northern-Waschpuffer (2x SSC und 0,1 % SDS) gewaschen. Der Waschvorgang erfolgte initial zweimalig bei Raumtemperatur und wurde anschließend unter Kontrolle mit dem Handmonitor bei  $44^\circ\text{C}$  fortgeführt, bis nur noch spezifisch gebundene Sonde auf der Membran verblieb. Hohe Temperaturen während des Waschens und eine geringe Salzkonzentration des Puffers beschleunigen die Lösung der radioaktiven Sonde.

Zur Durchführung der Autoradiographie wurde die Membran in einer Plastikfolie verschweißt, ohne getrocknet zu werden.

### **3.9.5.2 Hybridisierung mit RNA-Sonde**

Um die bereits mit der cDNA-Sonde hybridisierte RNA mit der 18S rRNA-Sonde rehybridisieren zu können, wurde die Membran unter Schütteln mit kochender 0,1 %-iger SDS-Lösung gewaschen und von der DNA-Sonde gereinigt. Anschließend wurde die Membran, wie bereits im Kapitel 3.9.5 beschrieben, in einem Hybridisierungsröhrchen mit Northern-Hybridisierungspuffer über Nacht im Wasserbad bei 55°C prähybridisiert.

Zur Hybridisierung wurden 600 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) durch einen Kochvorgang für 10 min denaturiert, auf Eis gekühlt und mit der markierten 18S rRNA-Sonde (Kapitel 3.9.4.2) dem Northern-Hybridisierungspuffer beigelegt. Die Inkubation der Membran wurde für weitere 24 h im Wasserbad bei 55°C fortgesetzt.

Der Waschvorgang zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde erfolgte mit Northern-Waschpuffer (2x SSC und 0,05 % SDS) zweimalig bei Raumtemperatur und danach unter Kontrolle mit dem Handmonitor bei 60°C, bis nur noch spezifisch gebundene Sonde auf der Membran verblieb. Zur Durchführung der Autoradiographie wurde die Membran erneut in einer Plastikfolie verschweißt, ohne getrocknet zu werden.

### **3.9.6 Autoradiographie**

Die Autoradiographie erfolgte durch Einlegen der verschweißten Membran in eine Kassette mit einem Röntgenfilm. Um das Signal, das von der auf der Membran gebundenen radioaktiven Sonde ausging, auf dem Röntgenfilm zu verstärken, wurden Verstärkerfolien benutzt. Bestehend aus Kalziumwolframat schwärzen sie den Röntgenfilm nach Kontakt mit  $\beta$ -Strahlen durch Emission von blauem Licht. Die Kassette wurde anschließend für ein bis mehrere Tage, abhängig von der verbliebenen Radioaktivität der Membran, bei -80°C gelagert. Würde die Autoradiographie bei Raumtemperatur und ohne Verwendung von Verstärkerfolien durchgeführt werden, wäre die Sensitivität der Methode um ein Zehnfaches geringer.

Zur Entwicklung wurde der Röntgenfilm für 2 min in einer Entwickler-Lösung gebadet, kurz im Wasserbad gesäubert und zur Fixierung für 15 min in eine Fixierer-Lösung gelegt. Der Film wurde danach erneut mit Wasser gesäubert und getrocknet. Die

geschwärzten Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dabei gilt, je sorgfältiger die radioaktiv markierte Nylonmembran zuvor von unspezifisch gebundenen Sonden gereinigt worden war, desto weniger wurde die Schwärzung der Röntgenfilme durch Artefakte beeinträchtigt und desto präziser konnte die Densitometrie durchgeführt werden.

### 3.10 Densitometrie

Die Densitometrie dient der Auswertung geschwärzter Banden auf einem Röntgenfilm, indem ihre Lichtdurchlässigkeit bestimmt wird. Verwendet wurde hierzu Gel Doc TM2000, Gel Documentation Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH), bestehend aus einer Dunkelkammer (Darkroom Cabinet mit white light / transillumination), einer Kamera (CCD Camera 8-bit mit PCI Digitizing Card) und der Software (Quantitation Software Win/Macintosh: Quantity One 4.1.0) auf einem handelsüblichen PC.

Die fünf Banden der MnSOD wurden einzeln sowie als ein Ganzes densitometrisch erfasst und gegen die Bande der 18S rRNA verrechnet, um anschließend statistisch ausgewertet zu werden.

### 3.11 Statistik

Zur Analysierung der Daten wurden das Verarbeitungssystem Statistica Version 5.0 (StataSoft, Inc.)/ GraphPad Prism 4.0 sowie ein handelsüblicher PC verwendet. Aus den erhobenen Werten wurden nach standardisierten Formeln die arithmetischen Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichungen ( $s$ ) und die Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error of mean) berechnet. Den graphischen Darstellungen des Ergebnisteils liegen die arithmetischen Mittel und die Standardfehler ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) zugrunde.

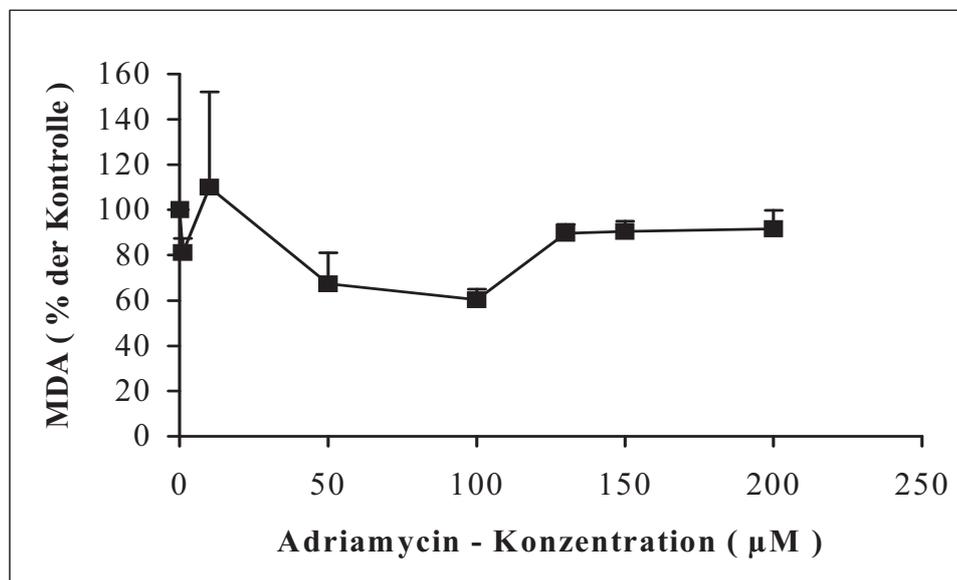
Die Signifikanz der Daten wurde nach dem Verfahren der One-way-ANOVA (Analysis of variance - Varianzanalyse) zum Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Gruppen überprüft. Eine Signifikanz war nachweisbar, wenn die Mittelwerte nicht gleich waren, d.h. die Nullhypothese verworfen werden konnte. Weiterhin wurde Bonferroni's Test zur Feststellung von Unterschieden zwischen den Gruppen hinzugezogen.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf 5 % festgelegt, eine statistische Signifikanz wurde demnach bei  $p < 0.05$  erreicht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Lipidperoxidation - Nachweis von MDA

Zur Erfassung einer möglichen Zellschädigung infolge von Lipidperoxidation diente der Nachweis des Malondialdehyds, das während der 24stündigen Inkubation der Kardiomyozyten ins Medium freigesetzt und anschließend gemessen wurde. Verwendet wurde hierzu die modifizierte Methode mittels HPLC nach H.H. Draper (Draper et al., 1993).



**Abb. 4a: Freisetzung von MDA durch Kardiomyozyten nach Behandlung mit Adriamycin in unterschiedlichen Konzentrationen ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $n=3$ ).** Ein signifikanter Anstieg der MDA-Freisetzung war bei keiner Konzentration von Adriamycin nachweisbar. Demnach hat die Lipidperoxidation als Ursache einer Zellschädigung unter Behandlung mit Adriamycin in der Konzentration, die therapeutisch erreicht wird, eine untergeordnete Rolle.

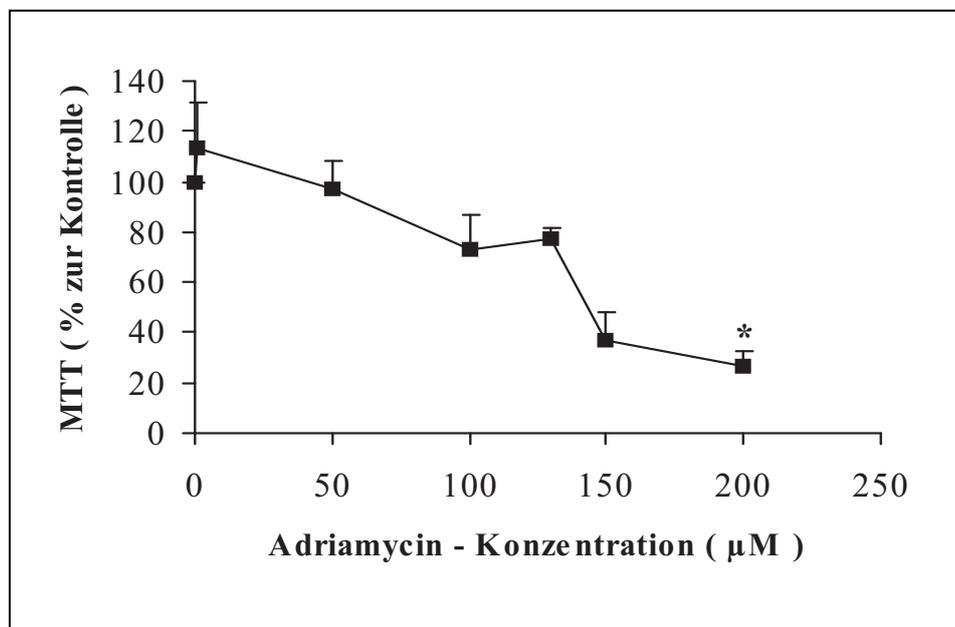
In Abb. 4a wird die Menge des nach 24stündiger Inkubation freigesetzten MDA veranschaulicht. Die Kardiomyozyten sind mit Adriamycin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt worden. Adriamycin in der therapeutischen Dosierung von 1 µM führte zu einer im Vergleich mit unbehandelten Kardiomyozyten statistisch nicht signifikant reduzierten Freisetzung von MDA ( $81 \pm 6$  %). Dieser Effekt ist mit Ausnahme von 10 µM ( $110 \pm 42$  %) auch bei hohen Dosen von Adriamycin bis 200 µM ( $92 \pm 8$  %) zu beobachten. Dabei wird die geringste Freisetzung mit  $60 \pm 5$  % der

Kontrolle bei 100  $\mu\text{M}$  erreicht. Die insgesamt geringen Mengen an nachweisbarem MDA sprechen gegen eine Lipidperoxidation als Mechanismus der Zellschädigung. Allerdings lässt sich eine Zunahme der MDA-Freisetzung um mindestens 30 % zwischen den 100  $\mu\text{M}$  Adriamycin und den noch höheren Konzentrationen beobachten (130  $\mu\text{M}$  mit  $90\pm 4$  %, 150  $\mu\text{M}$  mit  $90\pm 5$  % und 200  $\mu\text{M}$  mit  $92\pm 8$  %). Die Zunahme ist jedoch weder kontinuierlich noch erreicht sie den Wert der nicht behandelten Kontrolle. Der erhöhte Wert von  $110\pm 42$  % bei 10  $\mu\text{M}$  Adriamycin entstand durch eine hohe Streubreite der einzelnen Messwerte, eine statistische Signifikanz der Abweichung ist nicht gegeben.

## 4.2 Viabilität – Bestimmung von Formazan

Die Bestimmung der Viabilität erfolgte unter Verwendung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT), das als gelbes Salz durch die mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen in blaues Formazansalz umgewandelt wird. Genutzt wurde hierzu die Methode nach Mosmann (Mosmann, 1983).

Nach einer 24stündigen Inkubation wurden die Kardiomyozyten für weitere 30 min mit MTT behandelt. Das anschließend aus den Zellen gewonnene Formazan wurde photometrisch vermessen und für jede zuvor eingesetzte Adriamycin - Konzentration in % der Kontrolle ausgedrückt.



**Abb. 4b: Indirekte Messung der Viabilität durch den MTT-Test nach Behandlung der Kardiomyozyten mit Adriamycin in unterschiedlichen Konzentrationen ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $n=3-5$ ;  $*p < 0.05$  vs. Kontrolle).** Eine über 50 %-ige Reduktion der Viabilität wurde erst bei einer Adriamycin - Konzentration von 150 µM ( $37 \pm 11$  %) erreicht, statistisch signifikant wurde sie bei 200 µM ( $27 \pm 6$  %). In der therapeutisch eingesetzten Dosis des Zytostatikums behielten die mitochondrialen Enzyme ihre Funktionsfähigkeit bei.

Die Abb. 4b zeigt die indirekt durch den MTT-Test gemessene Viabilität der Kardiomyozyten für jede der zur Behandlung der Zellen verwendeten Konzentrationen an Adriamycin auf. Hierbei wird eine Reduktion der zellulären Lebensfähigkeit ab einer Adriamycin - Konzentration zwischen 50 µM ( $97 \pm 11$  %) und 100 µM ( $73 \pm 14$  %) deutlich, die bei der Konzentration von 150 µM mit  $37 \pm 11$  % die 50 % -Grenze

überschreitet, aber erst bei 200  $\mu\text{M}$  ( $27\pm 6\%$ ) signifikant wird. Behandelt mit hohen Dosen des Zytostatikums, die in der Chemotherapie nie erreicht werden, sterben hierbei mehr als die Hälfte der Kardiomyozyten ab, während sich im therapeutischen Bereich von 1  $\mu\text{M}$  ( $113\pm 18\%$ ) und darüber hinaus bis 50  $\mu\text{M}$  keine Verminderung der Viabilität nachweisen lässt. Demnach bleiben die Mitochondrien über das üblicherweise therapeutisch eingesetzte Maß von 1  $\mu\text{M}$  Adriamycin hinaus funktionsfähig.

### 4.3 Densitometrie

Um die initial gestellte Frage nach den Auswirkungen des Adriamycins auf die Expression der Mangan Superoxid Dismutase beantworten zu können, wurde die mRNA des antioxidativen Enzyms aus den mit dem Zytostatikum behandelten und den unbehandelten Kardiomyozyten isoliert, auf Quantität und Qualität geprüft, in Northern Blot-Technik auf eine Membran übertragen und mit radioaktiven Sonden markiert. Die auf diese Weise sichtbar gemachten fünf Banden der MnSOD mRNA wurden als Ganzes sowie einzeln densitometrisch erfasst und gegen die als Beladungskontrolle verwendete 18S rRNA verrechnet. Die aus mit unterschiedlichen Konzentrationen an Adriamycin behandelten Kardiomyozyten gewonnenen Werte wurden wiederum prozentual gegen die Kontrolle aus unbehandelten Zellen verrechnet und auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft.

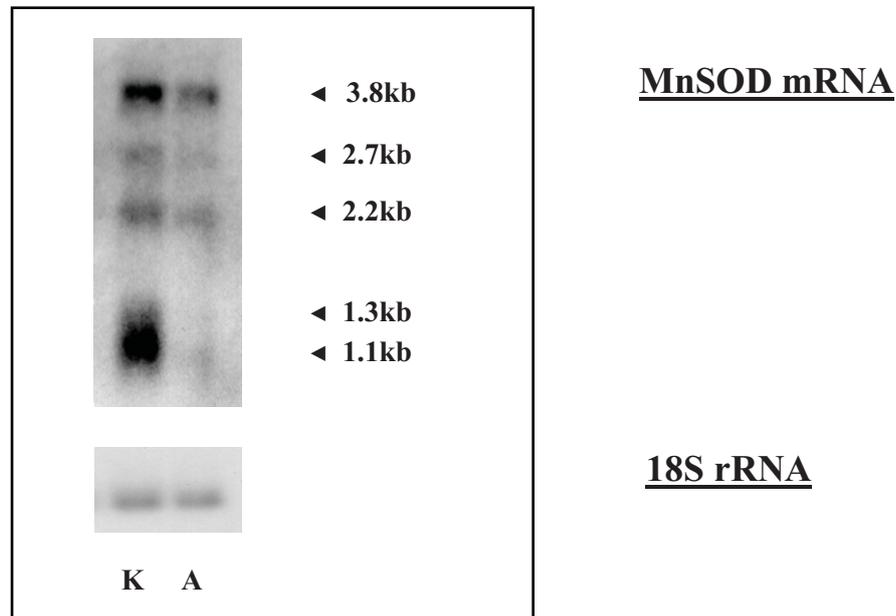
Die Darstellung von fünf verschiedenen Banden für die mRNA der MnSOD erklärt sich aus dem Vorhandensein von Unterformen, die beim Ablesen des Gens im Rahmen von Polyadenylierungsprozessen unterschiedliche Länge und damit unterschiedliche Größe erreichen. Sie verteilen sich auf 3.8 kb, 2.7 kb, 2.2 kb, 1.3 kb und 1.1 kb.

Nachfolgend erfolgt neben einer **exemplarischen** Wiedergabe der zur Gewinnung der Daten verwendeten Banden auch die graphische Darstellung zur Verdeutlichung der Expressionsunterschiede der mRNA mit und ohne Adriamycin - Behandlung.

#### 4.3.1 Darstellung der MnSOD mRNA und 18S rRNA als Banden

In diesem Abschnitt werden die mRNA-Banden der MnSOD dargestellt. Hierbei wurden Adriamycin - Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 130  $\mu\text{M}$  verwendet.

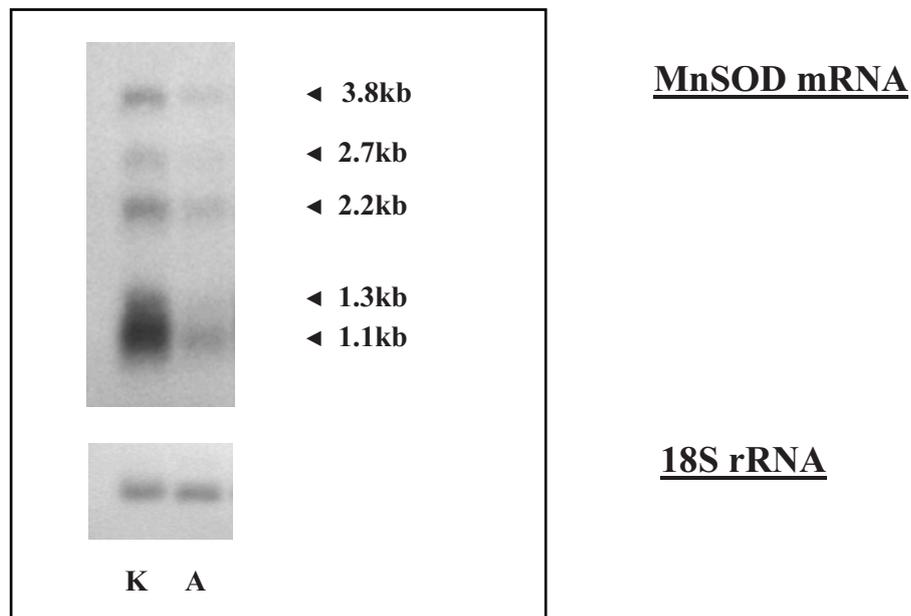
#### 4.3.1.1 Versuchsreihe mit 1 $\mu$ M Adriamycin



**Abb. 4c: Darstellung der MnSOD mRNA anhand der Bandenpaare aus unbehandelten (K) und behandelten (A) Kardiomyozyten für die Konzentration von 1  $\mu$ M Adriamycin.** Einteilung der Unterformen; K= Kontrolle aus den Kardiomyozyten ohne Adriamycinzusatz, A= mit Adriamycin behandelte Kardiomyozyten. Zusätzlich Darstellung der 18S rRNA.

Wie nach der Literatur (Hurt et al. 1992; Röhrdanz and Kahl, 1998) erwartet, wurden fünf mRNA-Spezies mit Größen von 1.1 kb, 1.3 kb, 2.2 kb, 2.7 kb und 3.8 kb voneinander getrennt, unter denen die kleinste (1.1 kb) am stärksten exprimiert war. Bei allen Unterformen ist eine Abnahme der MnSOD-Expression in den mit 1 $\mu$ M Adriamycin behandelten Herzmuskelzellen deutlich erkennbar, während die Expression der 18S rRNA keinen Unterschied aufweist. Der deutlichste Abfall ergab sich bei den beiden kleinsten Transkripten (1.1 kb und 1.3 kb).

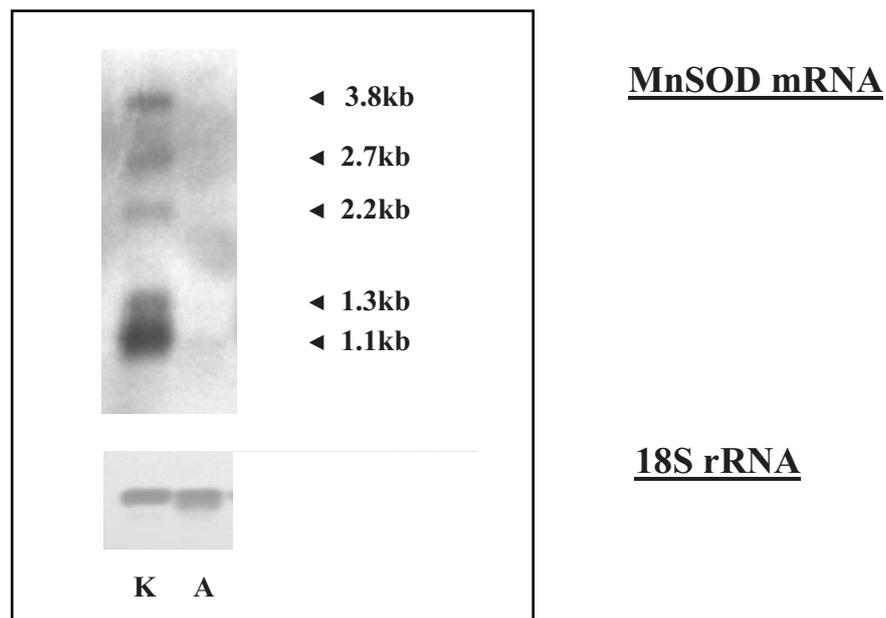
#### 4.3.1.2 Versuchsreihe mit 10 $\mu$ M Adriamycin



**Abb. 4d: Darstellung der MnSOD mRNA anhand eines Bandenpaares aus unbehandelten (K) und behandelten (A) Kardiomyozyten für die Konzentration von 10  $\mu$ M Adriamycin.** Einteilung der Unterformen; K= Kontrolle aus den Kardiomyozyten ohne Adriamycinzusatz, A= mit Adriamycin behandelte Kardiomyozyten. Zusätzlich Darstellung der 18S rRNA.

Auch in dieser Abbildung zeigt sich eine Reduktion der MnSOD mRNA der mit 10  $\mu$ M Adriamycin behandelten Kardiomyozyten gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe bei gleich hoher Expression der 18S rRNA.

### 4.3.1.3 Versuchsreihe mit 130 $\mu$ M Adriamycin



**Abb. 4e: Darstellung der MnSOD mRNA anhand eines Bandenpaares aus unbehandelten (K) und behandelten (A) Kardiomyozyten für die Konzentration von 130  $\mu$ M Adriamycin.** Einteilung der Unterformen; K= Kontrolle aus den Kardiomyozyten ohne Adriamycinzusatz, A= mit Adriamycin behandelte Kardiomyozyten. Zusätzlich Darstellung der 18S rRNA.

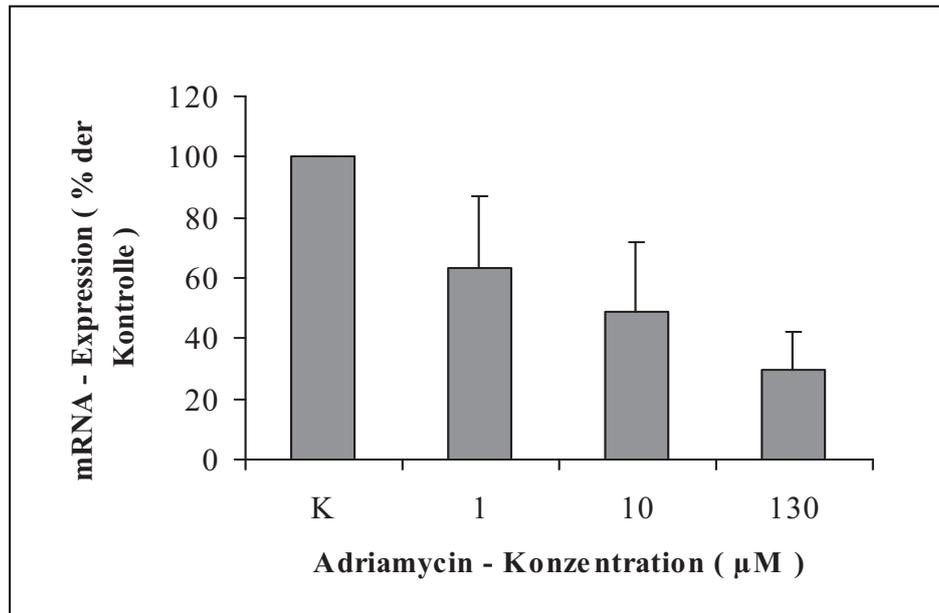
Bei einer Konzentration des Zytostatikums von 130  $\mu$ M sind die Banden der MnSOD mRNA der behandelten Kardiomyozyten kaum noch nachweisbar. Die dagegen eher etwa gleich hoch wie in der Kontrolle exprimierte 18S rRNA schließt ein Nichtvorhandensein von RNA auf dieser Spur sicher aus, daher ist davon auszugehen, dass diese hohe Dosis an Adriamycin eine Expression der MnSOD nahezu vollständig unterdrückt.

### 4.3.2 Auswertung der densitometrischen Daten in Diagrammen

Die im vorangehenden Kapitel exemplarisch dargestellten Blots, die die Expression der MnSOD mRNA und der 18S rRNA verdeutlichen, wurden densitometrisch erfasst, die Zwischenergebnisse gegen die 18S rRNA verrechnet und die daraus entstehenden Quotienten in Form von Diagrammen veranschaulicht. Die Kontrolle stellt jeweils 100 % dar. In einem ersten Schritt ist die Gesamtheit aller fünf Unterformen erfasst worden, im zweiten Schritt werden die Unterformen einzeln für jede verwendete Konzentration an Adriamycin auf signifikante Unterschiede hin untersucht, und zwar zwischen

Kontrolle und der jeweiligen Konzentration des Zytostatikums sowie innerhalb der verschiedenen Konzentrationen.

#### 4.3.2.1 Summe der Einzelbanden

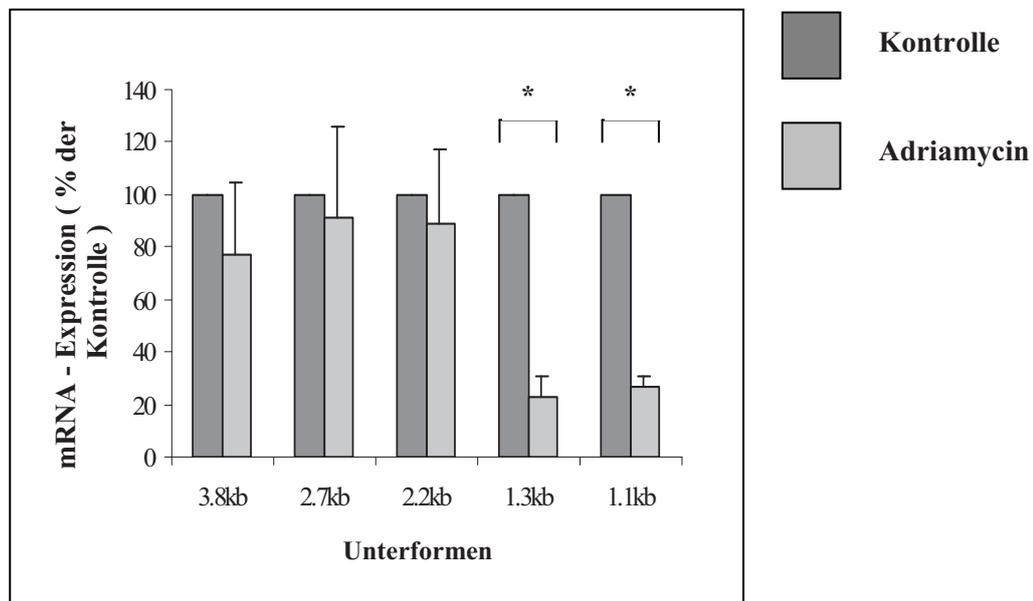


**Abb. 4f:** Darstellung der Expression der MnSOD in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration an Adriamycin. K entspricht der Kontrolle mit 100 % ( $x \pm \text{SEM}$ ;  $n=3$ ). Densitometrisch erfasst wurde hierzu die Summe aller fünf Banden.

Anhand des Diagramms lässt sich eine mit steigender Adriamycin - Konzentration zunehmende Reduktion der MnSOD-Expression erkennen, wobei die 50 % -Marke mit  $49 \pm 23$  % bei 10 μM erreicht wird, während bei 1 μM die Expression auf lediglich  $63 \pm 24$  % vermindert wird. Eine statistische Signifikanz wird zwar bei keiner Dosis beobachtet, dennoch ist die abnehmende Tendenz bis 130 μM ( $30 \pm 12$  %) unverkennbar.

### 4.3.2.2 Einzelbanden

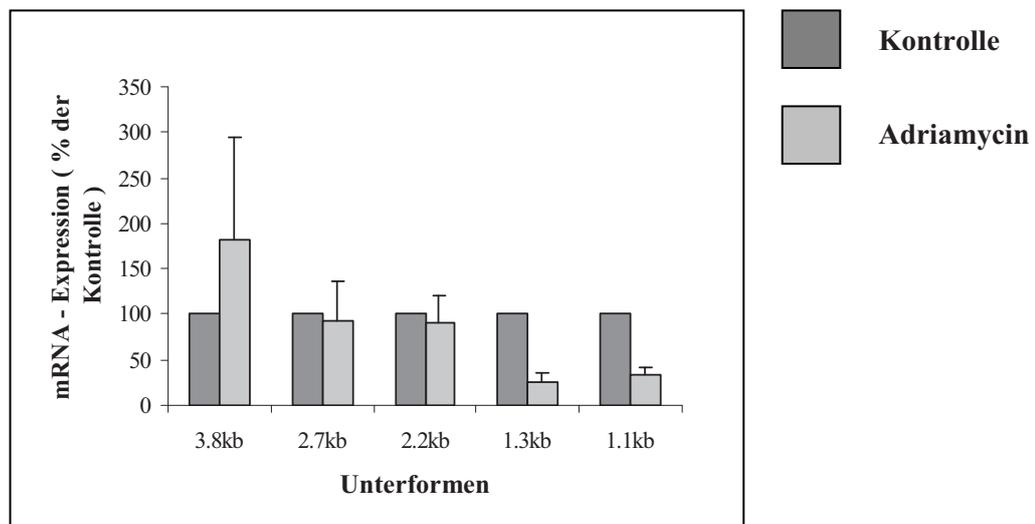
#### 4.3.2.2.1 Versuchsreihe mit 1 $\mu$ M Adriamycin



**Abb. 4g:** Darstellung der mRNA-Expression der MnSOD bei Verwendung von 1  $\mu$ M Adriamycin in Abhängigkeit von den Unterformen. ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $n=3$ ;  $*p < 0.05$  vs. Kontrolle).

Bei den mit 1  $\mu$ M Adriamycin behandelten Zellen zeigt sich im Vergleich zu der Darstellung der Bandensumme der entsprechenden Konzentration, die in Relation zur Kontrolle keine Signifikanz erreicht hat, nach Auftrennung in die Einzelbanden eine signifikante Reduktion der Expression bei den Unterformen von 1.3 kb und 1.1 kb Größe auf  $23 \pm 8$  % bzw.  $27 \pm 4$  % der Kontrolle. Bei der 3.8 kb-Bande sinkt die Expression auf  $77 \pm 28$  %. Die mittleren Banden zeigen dagegen die geringste Reduktion ( $91 \pm 35$  % bei 2.7 kb und  $89 \pm 28$  % bei 2.2 kb).

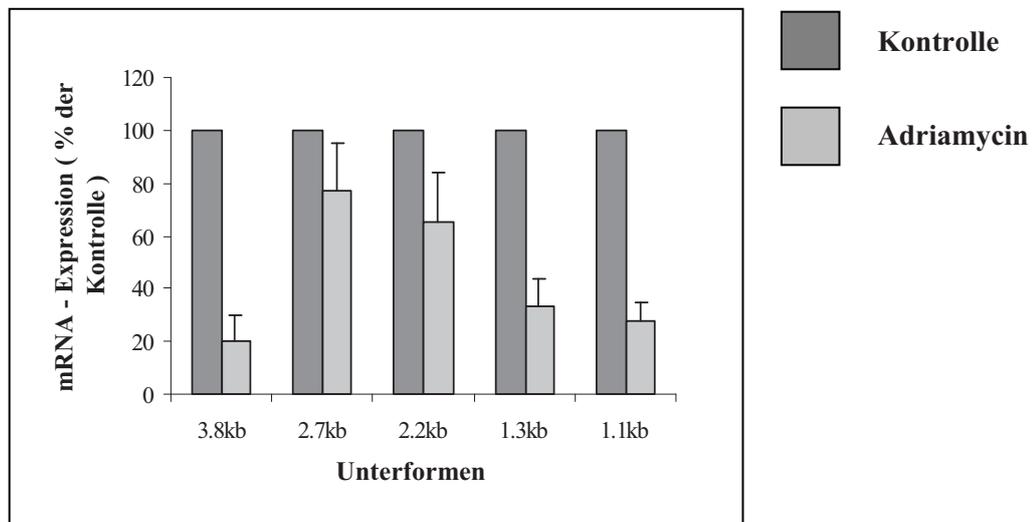
#### 4.3.2.2.2 Versuchsreihe mit 10 $\mu$ M Adriamycin



**Abb. 4h:** Darstellung der mRNA-Expression der MnSOD bei Verwendung von 10  $\mu$ M Adriamycin in Abhängigkeit von den Unterformen. ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $n=3$ ).

Auch bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M Adriamycin zeichnet sich die stärkste Supprimierung der MnSOD-Expression mit  $26 \pm 10$  % bzw.  $33 \pm 8$  % der Kontrolle im Bereich von 1.3 kb und 1.1 kb ab, obgleich dieses Verhalten rechnerisch nicht als signifikant nachgewiesen werden kann. Die gesteigerte Expression bei 3.8 kb mit  $181 \pm 113$  % kommt durch die Streubreite der einzelnen Messwerte zustande. Die mittleren Banden dagegen zeigen auch bei 10  $\mu$ M die geringsten Veränderungen in der Expression auf ( $93 \pm 43$  % bei 2.7 kb und  $90 \pm 30$  % bei 2.2 kb).

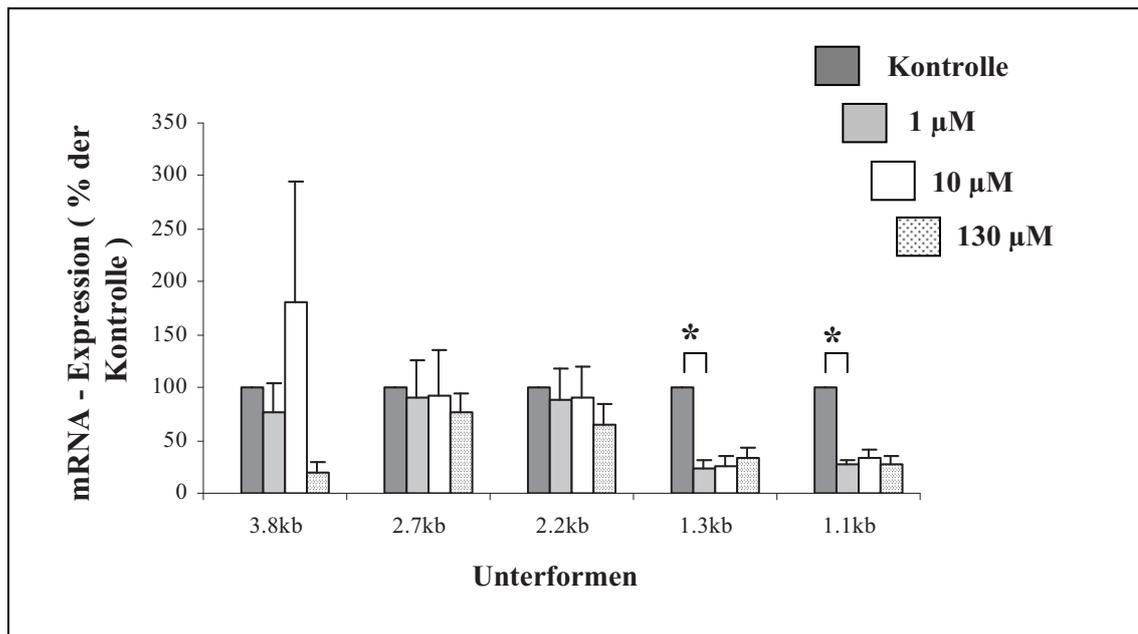
#### 4.3.2.2.3 Versuchsreihe mit 130 $\mu\text{M}$ Adriamycin



**Abb. 4i:** Darstellung der mRNA-Expression der MnSOD bei Verwendung von 130  $\mu\text{M}$  Adriamycin in Abhängigkeit von den Unterformen. ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $n=3$ ).

Bei der hohen Dosis von 130  $\mu\text{M}$  lässt sich erstmalig eine deutliche Reduktion der Expression im Bereich des 3.8 kb-Transkripts mit  $20 \pm 10$  % der Kontrolle beobachten. Der Trend in der Expression der einzelnen Unterformen zeigt ansonsten eine große Ähnlichkeit mit den bisherigen Beobachtungen bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Adriamycin. Bei 2.7 kb und 2.2. kb liegen mit  $77 \pm 18$  % und  $65 \pm 19$  % die geringsten Veränderungen vor, wohingegen bei 1.3 kb und 1.1 kb mit  $33 \pm 11$  % und  $28 \pm 7$  % der Kontrolle die Expression eine deutliche Reduktion erfährt.

#### 4.3.2.2.4 Gesamtvergleich



**Abb. 4j: Gesamtdarstellung der mRNA-Expression der MnSOD durch Aufteilung in die fünf Unterformen und unter Direktvergleich der verschiedenen Adriamycin – Konzentrationen.** ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ;  $n=3$ ;  $*p < 0.05$  vs. Kontrolle).

In der letzten schematischen Darstellung werden die einzelnen Unterformen bei den verwendeten Konzentrationen an Adriamycin gegeneinander und gegen die Kontrolle aufgetragen. Die verminderte Expression der Banden bei 1.3 kb und 1.1 kb lässt sich bei allen drei Konzentrationen aufzeigen und reicht von  $23 \pm 8$  % bis  $33 \pm 11$  % bzw.  $27 \pm 4$  % bis  $33 \pm 8$  %, ist jedoch in beiden Fällen nur für 1 µM statistisch signifikant.

Die mittleren Banden 2.7 kb und 2.2 kb weisen geringere Differenzen in der Expression auf, sie liegen bei  $77 \pm 18$  % bis  $93 \pm 43$  % bzw. bei  $65 \pm 19$  % bis  $90 \pm 30$  % der Kontrolle. Die 3.8 kb Bande zeichnet sich in dieser Arbeit durch eine große Streubreite aus, insbesondere was die Adriamycin - Konzentration von 10 µM betrifft ( $n=3$  mit 23 %, 120% und 401 %). Die konstantesten Werten werden bei 130 µM gefunden ( $n=3$  mit 35 %, 1 % und 24 %) und spiegeln am ehesten die Auswirkung einer verhältnismäßig hohen Konzentration an Adriamycin auf die Genexpression der MnSOD wider.

## **5. Diskussion**

Zur Rolle von Radikalbildung und Hemmung der Nukleinsäuresynthese bei der kardiotoxischen Wirkung von Adriamycin

Seitdem Adriamycin erfolgreich in der Therapie zahlreicher Tumore eingesetzt wird (Di Marco et al., 1969; Blum and Carter, 1974; Weiss et al., 1986), zeichnet sich als gravierendste Nebenwirkung das Auftreten einer Kardiotoxizität ab, die neben akuten Veränderungen (Carter, 1975; Legha et al., 1987) vor allem kumulativ zu einer irreversiblen chronischen Kardiomyopathie mit klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz führt (VonHoff et al., 1979; Doroshow, 1991).

Der zytotoxische und damit auch antitumoröse Effekt dieses Anthrazyklins beruht dabei auf drei Hauptmechanismen, die auch in der Entwicklung der Kardiotoxizität eine Rolle spielen:

- I.** Die Fähigkeit zur Interkalation in den DNA-Strang (Zunino et al., 1972) sowie zur Bindung an die Topoisomerase II (Pommier et al., 1985; Cummings et al., 1991) mit Störung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese (Rosenoff et al., 1975; Zähringer, 1983).
- II.** Der oxidative Schaden an Makromolekülen nach enzymatischer Bildung von Sauerstoffradikalen (Keizer et al., 1990; Halliwell, 1991).
- III.** Die Induktion der Apoptose (Zhang et al., 1996; Wu et al., 2002), die sowohl zum Absterben des Tumors als auch zu unerwünschten Organdysfunktionen führt.

Welcher der erstgenannten Mechanismen I und II in erster Linie zum letztgenannten Mechanismus III der Apoptose-Induktion führt, ist in der Wissenschaft nach wie vor ein Streitpunkt.

Anthrazykline können in die DNA interkalieren. Leonard befasste sich ausgiebig mit dem Zustandekommen von Komplexen aus DNA und Anthrazyklinen (Leonard et al., 1992). Verwendet wurden Daunomycin, 4'-Epiadriamycin und verschiedene Hexanukleotide. Kristallographisch zeigte sich die Bildung einer DNA-Helix mit Interkalation des chromophoren Anteils des Epiadriamycins an Pyrimidin-Purin-Abschnitte. Es kam dabei zu Wasserstoffbindungen und van der Waals-Kräften. Der Aminozucker erwies sich als sehr flexibel gegenüber dem aglykonen Anteil, was zu Konformationsveränderungen führte, die wiederum über Lösemittelmoleküle im

Rahmen von Wasserstoffbrücken mit der DNA stabilisiert wurden. Es ließ sich beobachten, dass die beiden Anthrazykline an verschiedene DNA-Sequenzen binden konnten, was bereits von anderen Autoren beschrieben worden ist (Williams et al., 1990b; Frederick et al., 1990).

Dass eine Affinität zwischen Adriamycin und DNA existiert, die erst die Voraussetzung für eine Interkalation schafft, belegen verschiedene Arbeiten, die den intrazellulären Weg des Anthrazyklins spektrophotometrisch oder mit Hilfe der Fluoreszenz verfolgt haben. Sarvazyan hat Kulturen von Kardiomyozyten der Ratte unterschiedlichen Dosen von Adriamycin ausgesetzt (Sarvazyan, 1996). Bei Einsetzen der niedrigsten Dosis von 1  $\mu\text{M}$ , die neben anderen auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde - maximale Serumspiegel nach intravenöser Applikation von Adriamycin im Rahmen therapeutischer Regimes schwanken zwischen 0,5 und 10  $\mu\text{M}$  (Young et al., 1981; Ozols et al., 1982; Greene et al., 1983) –, zeigte die Fluoreszenzmessung die höchste Anreicherung der Substanz im Bereich des Nukleus. Erst in deutlich höheren Dosen überstieg die Akkumulation des Adriamycins an den Mitochondrien die im Nukleusbereich. Eine weitere Untersuchung von Kardiomyozyten mit 20  $\mu\text{M}$  Adriamycin für 1 h wies wiederum die höchste Konzentration in den Nuklei nach, selbst als das Medium mitsamt dem Medikament entfernt wurde (Kumar et al., 1999). Das an DNA gebundene Adriamycin soll sogar 80 % - 99,8 % des intrazellulären Gehalts betragen (Gigli et al., 1988; Cummings and Ardle, 1986). Durch Hinzufügen exogener DNA wies Mimnaugh eine signifikante Inhibition der zuvor durch Adriamycin ausgelösten Lipidperoxidation nach, gemessen an den Nuklei von Hepatozyten von Ratten (Mimnaugh et al., 1985). Gegenüber der Reaktion mit der Nukleusmembran und dem anschließenden Auslösen der Lipidperoxidation scheint eine Präferenz für die Bindung an die DNA vorzuliegen, hernach steht das Anthrazyklin für weitere Reaktionen mit Bildung von Radikalen nicht mehr zur Verfügung. Die Reaktion mit der DNA unterliegt aber offenbar bestimmten Voraussetzungen. Sinha zeigte, dass eine DNA-Bindung um das Fünffache gesteigert werden konnte, nachdem das Adriamycin durch Mikrosomen in Anwesenheit von NADPH in seine Semichinon-Form überführt wurde (Sinha and Gregory, 1981). Allerdings vermuten auch andere Autoren, dass womöglich erst ein vom Semichinon abstammendes Produkt an der DNA-Bindung beteiligt ist (Bachur et al., 1982). Dieselbe Beobachtung bestätigte Sinha wenige Jahre später in einer weiteren Arbeit mit Rattenhepatozyten (Sinha et al., 1984), wobei diesmal die Auswirkung des  $\text{O}_2$ -Gehalts im Vordergrund stand. Vor allem unter

anaeroben Bedingungen fand eine enzymatische Aktivierung durch die hepatischen Mikrosomen bzw. Nuklei statt, die Adriamycin in das Semichinon überführte, welches wiederum per Elektronenspinresonanz messbare Komplexe mit der DNA einging. In aerober Atmosphäre dagegen konnte das Semichinon nicht gemessen werden, stattdessen stieg die Menge der reaktiven Sauerstoffspezies, entsprechend sank das Ausmaß der Adriamycin-DNA-Bindung signifikant, weil Adriamycin in Form des Semichinons nun bevorzugt mit dem vorhandenen Sauerstoff reagierte. Dass Adriamycin unspezifisch DNA-, RNA- und Proteinspiegel reduzieren kann, beschreibt z.B. Sazuka (Sazuka et al., 1989). CDF1 Mäusen wurde in einer Studie über Anthrazykline u.a. Adriamycin intraperitoneal injiziert (übliche Kumulativdosis von 15 mg/kg KG), die Messungen wurden nach Tötung der Tiere am 4. Tag durchgeführt. Sowohl in ihrem Herz- als auch im Lebergewebe zeigte sich unspezifisch eine signifikante Reduktion der Nukleinsäuren und daraus resultierend der Proteinspiegel, wobei die Veränderungen im Herzen deutlicher ausgeprägt waren. Derselbe Effekt wurde in einer parallelen Untersuchung von Tumorgewebe (Ehrlich Aszites Karzinomzellen) gesehen. Verfolgte man zusätzlich die Aktivität speziell der antioxidativen Enzyme SOD, GPX und CAT im Verlauf von mehreren Tagen nach Adriamycin - Gabe, konnte in verschiedenen Organen einschließlich des Herzens eine Verminderung der Aktivität aller dieser Enzyme beobachtet werden, insbesondere am 4. Tag (Sazuka et al., 1989). Ansteigende Lipidperoxidation-Spiegel mit Erreichen des Maximums am 3. Tag wurden deshalb sekundär als Folge der Auswirkungen von Adriamycin auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme zurückgeführt. Nachzuvollziehen ist diese Schlussfolgerung, wenn man berücksichtigt, dass das Hinzufügen von Antioxidantien weder die Reduktion der Enzymaktivitäten noch der verminderten DNA-Synthese in den Ehrlich Karzinomzellen verhindern konnte. Die beobachteten Effekte müssen demnach ihre Ursache in Veränderungen auf der DNA- oder zumindest der RNA-Ebene haben.

Bereits in einer Arbeit von 1981 (Zähringer et al., 1981) fand man im Herzgewebe von Ratten nach i.p. Adriamycin-Gabe und Tötung am 7. bzw. 14. Tag nach Applikation ebenfalls eine deutliche Verminderung von Nukleinsäuren, und zwar in diesem Fall v.a. der mRNA mit einer Reduktion um etwa 50 %, dagegen waren DNA- und Proteinsynthese weniger betroffen. Bei näherer Untersuchung der mRNA stellte man fest, dass es sich insbesondere um die mRNA myofibrillärer Proteine handelte. Als Mechanismus ließe sich eine Störung in der Transkription z.B. durch Interkalation,

diskutieren, leider waren in dieser Arbeit keine Untersuchungen zum Ausmaß der Lipidperoxidation durchgeführt worden, die es erlaubt hätten, den Aspekt des oxidativen Stresses mit in die Interpretation zu nehmen.

Eine Spezifität in der Reduktion der Nukleinsäuren durch Adriamycin wies auch Ito nach (Ito et al., 1990), als er in seinem in vitro Versuch Kardiomyozyten von Ratten für 24 h mit 0,2 bzw. 0,5  $\mu\text{M}$  Adriamycin inkubierte. Hauptsächlich die Genexpression muskelspezifischer Proteine (z.B.  $\alpha$ -Aktin, Myosin Leichtkette) war betroffen und das auch nur im Herzgewebe, in vergleichbaren Untersuchungen erwies sich Skelettmuskelgewebe als weitestgehend resistent gegenüber den niedrigen Dosen von Adriamycin. Eine Beeinflussung durch die Bedingungen während der Kultivierung konnte ausgeschlossen werden, nachdem dieselben Ergebnisse in einem ex vivo Versuch bestätigt werden konnten. Interessanterweise ergaben sich neben der mRNA-Reduktion dieser für die Funktion der Kardiomyozyten wichtigen Proteine keine ultrastrukturellen Zellveränderungen bis zum 3. Tag. Erst am 8. Tag nach Behandlung zeigten sich deutliche Zeichen der Zellschädigung.

Derselbe Effekt von Adriamycin ließ sich bei der mRNA feststellen, die für bestimmte Enzyme der Energieproduktion (z.B. ANT-1, RISP) kodiert, untersucht in Kulturen von Kardiomyozyten von Ratten (Jeyaseelan et al., 1997). Die Veränderungen im mRNA-Gehalt traten innerhalb weniger Stunden auf, der resultierende ATP-Abfall als Ausdruck einer gestörten Energieproduktion kurze Zeit später. Die erhöhte Abhängigkeit von einer konstanten Versorgung mit ATP insbesondere in einem kontraktile Gewebe wie dem des Herzens würde zumindest zu einem Teil auch die Kardiotoxizität von Adriamycin erklären. Entgegen den bisherigen Vermutungen, dass Adriamycin direkt an der DNA wirkt und dadurch die Bildung von mRNA verhindert, erklären die Autoren die Ergebnisse ihrer Arbeit angesichts der Selektivität der betroffenen Enzyme in erster Linie durch Veränderungen transkriptioneller Faktoren, wie z.B. der Induktion von Id (einem negativen Transkriptionsregulator) primär durch Membranschäden im Rahmen der Lipidperoxidation bei Freisetzung von freien Radikalen. Die veränderten transkriptionellen Aktivatoren oder, wie in diesem Fall, Inhibitoren führen dann zu Veränderungen in der Expression bestimmter Gene.

Dass der Einsatz von Adriamycin mit der Bildung von Radikalen einhergeht, wurde in verschiedenen Versuchsmodellen nachgewiesen: Unter Zusatz von Adriamycin konnten reaktive Sauerstoffspezies in Erythrozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden

(Henderson et al., 1978; Stuart et al., 1978), durch Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorofluoreszein in isolierten Glomeruli (Morgan et al., 1998) und in kultivierten Kardiomyozyten der Ratte (DeAtley et al., 1998), durch ESR (Elektronenspinresonanz) Spektroskopie auch in den Mikrosomen verschiedener Organe der Ratte und der Maus (Bachur et al., 1978). Costa untersuchte das Ausmaß der freien Radikale in Abhängigkeit von Sauerstoff, indem er Rattenherzen u.a. mit Adriamycin in verschiedenen Flussgeschwindigkeiten perfundierte, was normoxische oder hypoxische Zustände simulierte (Costa et al., 1988). Die Menge der freien Radikale stieg zwar mit der Anwesenheit von Adriamycin, jedoch wurden im normoxischen Milieu weder das Semichinon noch Sauerstoffradikale nachgewiesen. Dasselbe traf zu für das schwer hypoxische Milieu.

Andere Arbeiten wiesen die einzelnen Radikalspezies nach, die durch Adriamycin gebildet werden können. Superoxidradikale ließen sich bei der Ratte sowohl in Kardiomyozytenkulturen messen (Sarvazyan et al., 1995) als auch in den einzelnen Kompartimenten dieser Zellen (Doroshov, 1983), bestehend aus Sarkosomen, Mitochondrien und dem Zytosol. Je nach Kompartiment wurden in Abhängigkeit von NADH bzw. NADPH Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid gebildet. Zu demselben Ergebnis kam eine Untersuchung der Auswirkungen von Adriamycin an den submitochondrialen Partikeln in Rinderherzen (Doroshov and Davies, 1986). In menschlichen Brustkrebszellen MCF-7 wurde eine vermehrte Bildung von Hydroxylradikalen in Abhängigkeit von einem gesenkten GSH-Angebot beobachtet (Dusre et al., 1989). Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Bildung von Radikalen nach Meinung mancher Autoren die Aktivierung des Adriamycins in sein Semichinon vorausgeht, welches durch die ESR Spektroskopie u.a. in Ovarzellen chinesischer Hamster, in den Nuklei von Rattenhepatozyten und in den bereits erwähnten submitochondrialen Partikeln aus Rinderherzen nachgewiesen werden konnte (Iliskovic et al., 1999; Mimnaugh et al., 1985; Davies and Doroshov, 1986). Die Aktivierung zu dieser Radikalenform erfolgt durch für die Zellkompartimente spezifischen Enzyme: die Xanthin-Oxidase in der Nuklearmembran (Pan and Bachur, 1980; Bachur et al., 1982; Sinha et al., 1984), die NADH-Dehydrogenase in Mitochondrien (Davies and Doroshov, 1986) und die NADPH-Cytochrome P-450 Reduktase im endoplasmatischen Retikulum (Bachur et al., 1977; Bachur et al., 1978; Pan et al., 1981).

Anstatt die verschiedenen Radikale, die durch die Redoxvorgänge des Adriamycins entstehen, direkt zu messen, kann man sich indirekter Messmethoden bedienen. Der

Hintergrund dafür ist die Feststellung, dass Radikale sekundär durch Reaktion mit (Membran-) Lipiden innerhalb der Zelle zur Lipidperoxidation führen, deren Produkte wiederum bestimmt werden können und als Zeichen für oxidativen Stress stehen. Wichtig zur Einschätzung der Rolle der Lipidperoxidation in der Kardiotoxizität ist aber nicht nur ihr Ausmaß, sondern auch der Zeitpunkt des Auftretens. In der vorliegenden Arbeit wurde das Medium der Zellen nach 24stündiger Behandlung mit Adriamycin auf das Vorhandensein der Lipidperoxidation hin untersucht, ohne dass es bei einer der verwendeten Konzentrationen zu einem signifikanten Anstieg gekommen wäre. Odom untersuchte bei CD-1 Mäusen den Effekt von Adriamycin auf die Lipidperoxidation in einem Zeitraum von 24 - 48 h nach einmaliger intravenöser Gabe des Zytostatikums und stellte im Herzgewebe im Gegensatz zur Leber signifikant erhöhte Messwerte teils nach 24 h, teils erst nach 48 h fest (Odom et al., 1992). Mit den Effekten auf die Lipidperoxidation befasste sich auch Li, als er Sprague-Dawley Ratten für zwei Wochen mit Adriamycin behandelte, ehe er das Ausmaß der Lipidperoxidation 1 – 24 h nach der letzten i.p. Injektion in den Herzen der getöteten Tiere bestimmte (Li and Singal, 2000). Auffallend waren signifikant erhöhte Werte ab der 1. Stunde, die auch nach 24 h nahezu unverändert geblieben sind. Allerdings ist nach einer zweiwöchigen Zufuhr von Adriamycin, bestehend aus 6 Einzelgaben, die zeitliche Einordnung des Auftretens der Lipidperoxidation schwieriger zu bestimmen. In einer späteren Arbeit untersuchte derselbe Autor das Ausmaß der Lipidperoxidation in den Ventrikeln nach nur einer einzigen i.p. Injektion, und zwar 1, 2, 4 und 24 h später (Li et al., 2002). Diesmal zeigten sich bereits nach einer Stunde signifikant erhöhte Lipidperoxidation-Spiegel, die jedoch bis zur 24. Stunde auf die Werte der Kontrolle abfielen. Dass auch die Apoptose bereits frühzeitig durch Adriamycin auslösbar war, zeigte die Arbeit von Arola, in der Wistar Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach i.p. Gabe von Adriamycin getötet und ihre Herzen auf das Ausmaß der Apoptose hin untersucht worden waren (Arola et al., 2000). Aufeinanderfolgende Injektionen von Adriamycin verursachten einen Anstieg der Apoptose der Kardiomyozyten, indem die Apoptoserate nach jeder erneuten Injektion anstieg, anschließend wieder abfiel und durch die nächste Injektion wieder gesteigert wurde. Die Steigerungsrate nahm zunehmend ab, das Ausmaß der Apoptose insgesamt jedoch zu, so wie man es von einer Kumulation erwarten würde.

Berichten über ein frühzeitiges Ansteigen der Lipidperoxidation stehen Arbeiten gegenüber, die, so wie es die vorliegende Untersuchung unterstützt, erst zu einem späteren Zeitpunkt eine relevante Lipidperoxidation beobachten konnten. Darunter

befinden sich zum einen die bereits erwähnten Arbeiten von Sazuka (Sazuka et al., 1989a,b), in denen eine Zeitverschiebung im Auftreten der Lipidperoxidation von zumindest 3 Tagen festgestellt werden konnte, während dem eine Reduktion in der Biosynthese von DNA, RNA und Proteinen vorausging, gemessen an CDF1 Mäusen nach i.p. Gabe von Adriamycin.

In einer Arbeit von Dalloz (Dalloz et al., 1999) erhielten Wistar Ratten in verschiedenen Testlinien eine zehntägige Chemotherapie mit Adriamycin, der eine einzelne Bestrahlung angeschlossen wurde, ehe die Tiere 24 h oder 30 Tage später getötet wurden. Die daraufhin gemessenen Lipidperoxide waren im Herzgewebe signifikant erhöht, sofern in der Versuchsreihe Adriamycin appliziert worden war, sowohl 24 h als auch 30 Tage nach Beendigung des Versuchs. Zwar wurde auch auf die Auswirkungen auf die antioxidativen Enzyme hin untersucht, man beschränkte sich jedoch auf die enzymatischen Aktivitäten, die bis auf die der MnSOD alle eine signifikante Steigerung zeigten. Interessant wären die dazugehörigen mRNA-Spiegel der Enzyme gewesen, die eine Aussage hätten erlauben können, ob die Lipidperoxidation sekundär bedingt ist.

### Zur Wirkung von Adriamycin in den Mitochondrien

Den augenfälligsten Unterschied zwischen dem Gewebe des Herzens und dem anderer Organe macht die starke Abhängigkeit von der Funktionsfähigkeit der Mitochondrien aus. Die Aufgabe der Kardiomyozyten liegt in ihrer Kontraktilität, was einer ständigen Energiezufuhr bedarf. Diese wird bereitgestellt von den Mitochondrien, indem in ihrer Membran im Rahmen der Atmungskette durch die oxidative Phosphorylierung ATP entsteht (Hatefi, 1985). Im Vergleich mit anderem Gewebe sind die Herzmuskelzellen dementsprechend besonders abhängig von intakten Mitochondrien (Young et al., 1981) und enthalten eine entsprechend hohe Menge an diesem Organell (Kaul et al., 1993). 1996 zeigte die Arbeit von Vidal (Vidal et al., 1996) an isolierten Kardiomyozyten, dass Adriamycin zu einer Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes führt. Zu demselben Ergebnis war auch Maisch gekommen, der ebenfalls primäre Kulturen aus Kardiomyozyten der Ratte verwendet hatte (Maisch et al., 1985). Dabei gingen die funktionellen Veränderungen den strukturellen zeitlich voraus. Untersuchungen zur Atmungskette ergaben, dass das Anthrazyklin außer den Enzymen des Komplexes III (Bianchi et al., 1987) noch einige andere beeinträchtigt (Marcillat et al., 1989; Solaini et al., 1985; Goormaghtigh et al., 1982). Hierzu gehört die Adriamycin-induzierte

Reduktion der Genexpression von ANT-1 und RISP, wesentlichen Bestandteilen der Atmungskette (Jeyaseelan et al., 1997).

Mitochondrien wurden sowohl unter physiologischen Bedingungen als Quelle von Superoxidradikalen identifiziert (Boveris, 1977; Richter et al., 1995), als auch unter Zugabe von Adriamycin (Thayer, 1977), wobei das Ausmaß ihrer Produktion bei gleichen Konzentrationen von Adriamycin das des Sarkoplasmatischen Retikulums übertrifft (Doroshov, 1983). Durch die Redoxvorgänge des Elektronentransports wird das Adriamycin in das Semichinonradikal überführt. Diese Aktivierung kann je nach Zellorganell von verschiedenen Enzymen katalysiert werden. Im Fall der Mitochondrien steht neben der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase des Komplexes I (Davies and Doroshov, 1986) eine zusätzliche NADH-Dehydrogenase zur Verfügung (Nohl, 1987). Sie wurde identifiziert, nachdem in Versuchen mit Rotenon, das den Komplex I der Atmungskette unterbrach, dennoch ein vermehrter Verbrauch von NADH beobachtet werden konnte, was die bis dato geäußerte Vermutung für das Vorliegen eines weiteren NADH verbrauchenden Enzyms bestätigte. Der Nachweis gelang in isolierten kardialen Mitochondrien, nicht in hepatischen, und zeigt somit einen wichtigen organspezifischen Unterschied, insbesondere wenn es um die Verstoffwechslung von Substanzen wie Adriamycin geht. Das Anthrazyklin wird zum Semichinon reduziert und führt dabei zur Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{OH}^\cdot$  (Doroshov, 1983; Gille and Nohl, 1997). Zusammenfassend gesehen sind Mitochondrien ständig Radikalen ausgesetzt, die ihre ultrastrukturelle und funktionale Integrität gefährden. Einen weiteren Angriffspunkt bieten sie durch die Zusammensetzung ihrer Membran, deren wichtigster Bestandteil Cardiolipin ist (Tritton et al., 1978; Petit et al., 1994). Adriamycin zeigt in seinem Bindungsverhalten eine gesteigerte Affinität zu diesem Phospholipid (Goormaghtigh et al., 1990), was wiederum zu Funktionseinbußen führt (Bachmann et al., 1987; Solem et al., 1994). Aber auch die gebildeten Sauerstoffradikale selbst sind fähig, die Lipidperoxidation auszulösen (Goodmann and Hochstein, 1977; Halliwell and Gutterage, 1989). Unter den Untersuchungen zum Ausmaß und zur Gewichtung der ultrastrukturellen Veränderungen durch Radikale ist eine Arbeit von 1994 zu erwähnen, in der präparierte Herzen von Wistar Ratten 5 bzw. 10 min lang mit einer Sauerstoffradikale enthaltenden Lösung perfundiert wurden (Hegstad et al., 1994). Anschließend wurde eine 35minütige Erholungsphase angeschlossen, ehe die Zellorganellen der Kardiomyozyten auf Schäden hin untersucht wurden. Nach 10 min waren die Veränderungen wie erwartet stärker ausgeprägt als nach 5 min, und unter

allen Organellen zeigten die Mitochondrien im Vergleich zum Sarkolemma, den Myofilamenten und dem Nukleus die höhergradigen Schäden in Form eines Anschwellens mit intramitochondrialem Ödem und gestörter Struktur der Cristae.

Neben der ATP-Bereitstellung sind die Kardiomyozyten in ihrer Funktion auch von der Calcium-Homöostase abhängig, die notwendig ist zum Erhalt der Kontraktilität. In einem *in vitro* Versuch aus Kardiomyozyten der Ratte zeigte sich eine signifikante Reduktion der Kontraktilität bei einer 20minütigen Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Adriamycin, während eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nicht diese Wirkung erzielte (Chan et al., 1996). Da der Effekt sich durch Zusatz von SOD und CAT verhindern ließ, wird vermutet, dass hierbei Radikale involviert waren. Interessanterweise verursachten SOD und CAT, einzeln eingesetzt, selbst eine Minderung der Kontraktilität. Zumindest im Fall der SOD vermutete man eine Überproduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das weitere Redoxreaktionen innerhalb der Zelle initiieren konnte. Der Verlust der Kontraktilität unter Adriamycin lässt sich zumindest teilweise durch Veränderungen im intrazellulären Calciumgehalt erklären, die einerseits durch Schäden am Sarkoplasmatischen Retikulum mit Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  bedingt sind (Olson et al., 1990; Bagchi et al., 1995), andererseits durch Veränderungen im sarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport (Singal and Pierce, 1984). Aber auch Schädigungen an den Mitochondrien können über eine vermehrte Freisetzung zu einer Steigerung der freien zytosolischen Calciumkonzentration führen (Reinhart et al., 1982; Broekemeier et al., 1989). Die Freisetzung kann durch Adriamycin bzw. Radikale über eine erhöhte Membranpermeabilität begünstigt werden (Ferrero et al., 1976), die nicht auf Elektrolyte beschränkt ist (Bachman et al., 1987). Revis stellte fest, dass kardiale Mitochondrien für diesen Mechanismus sogar sensitiver waren als z.B. hepatische oder renale Mitochondrien (Revis and Marusic, 1979). Mehrere Versuche *in vivo* bestätigten den Einfluss des Adriamycins auf den Calciumhaushalt und sekundär auf das Überleben der Zelle (Solem et al., 1996; Zhou et al., 2001).

Der Versuch einer Senkung des intrazellulären Calciumspiegels, z.B. durch Calciumkanalblocker, wie sie gehäuft bei arterieller Hypertonie zum Einsatz kommen, erwies sich dagegen wiederum als toxisch durch eine gesteigerte Akkumulation des Adriamycins in der Zelle (Santostasi et al., 1991). Das deutet auf eine empfindliche Wechselwirkung zwischen dem Anthrazyklin und Calcium hin.

Zur Kontraktion benötigt die Herzmuskelzelle neben Elektrolyten und ATP die Myofilamente, die wie das Sarkoplasmatische Retikulum ebenfalls Adriamycin-induzierten ultrastrukturellen Schäden unterliegen (Singal et al., 1987; Semenov et al.,

2001), was nicht nur in Tierexperimenten nachzuweisen gelang, sondern auch in endomyokardialen Biopsien menschlicher Herzen (Billingham et al., 1978). Über die Reduktion der Genexpression muskelspezifischer Gene *in vitro* und *in vivo*, die in der letztgenannten Arbeit behandelt wird, vermindert sich wiederum die Aufrechterhaltung der Kontraktilität.

Mit der Bestimmung der Viabilität, die in einigen Arbeiten durchgeführt worden war, bestimmt man die Funktionsfähigkeit vor allem der Mitochondrien und damit den Stellenwert anderer Veränderungen im Hinblick auf die Toxizität. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich deutlich, dass Adriamycin in erster Linie Auswirkungen auf die Genexpression hatte, noch ehe es zu messbarem Viabilitätsverlust gekommen war. Es musste eine Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  Adriamycin eingesetzt werden, ehe sich eine Minderung der Viabilität um  $> 50\%$  feststellen ließ. Eine Modulation der Genexpression, in diesem Fall der MnSOD, war jedoch bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ersichtlich. Ähnliches ergab die bereits an anderer Stelle diskutierte Arbeit von Röhrdanz an Hepatozyten (Röhrdanz et al., 2000). Nach nur 0,1  $\mu\text{M}$  Adriamycin zeichneten sich signifikante Veränderungen der mRNA-Spiegel antioxidativer Enzyme ab, insbesondere die Reduktion der MnSOD mRNA. Ein über 50 %-iger Verlust der Viabilität trat erst bei 5  $\mu\text{M}$  auf. Eine Arbeit an Glomerulumzellen der Ratte, in der die Toxizität von Adriamycin und Menadion, die beide aufgrund ihrer Chinonstruktur Redoxvorgängen unterliegen, miteinander verglichen wurden, ergab nach 2 h Inkubation mit Adriamycin eine Reduktion der Proteinsynthese um 65 %, während die Viabilität erst nach 4 h Inkubation und auch erst bei 500  $\mu\text{M}$  signifikant reduziert gemessen wurde (Morgan et al., 1998). Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Untersuchung ergibt sich mit der Feststellung, dass die Minderung der Lebensfähigkeit der Zellen im Falle von Menadion, betrachtet man die bereits in niedriger Konzentration einsetzende ROS-Produktion und die Reduktion der Proteinbiosynthese, ROS-induziert zu sein scheint. Bei Adriamycin treten dieselben Effekte jedoch nach unterschiedlichen Konzentrationen auf, so dass die Viabilitätseinbußen nicht primär durch Radikale verursacht sein können. Dies stützt die Theorie, dass Adriamycin zu strukturellen und vor allem funktionellen Veränderungen auch mit Auswirkungen auf die Funktionstüchtigkeit antioxidativer Enzyme führen kann, ohne dass Radikale die primären Mediatoren sind. Unter den antioxidativen Enzymen spielt im Hinblick auf die

Ursachen der Kardiotoxizität die MnSOD eine herausragende Rolle und ist daher auch ein wichtiger Teil dieser Arbeit.

### Zur Wirkung von Adriamycin auf die Expression antioxidativer Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Adriamycin auf kultivierte Kardiomyozyten im Hinblick auf das antioxidativ wirkende Enzym MnSOD und auf das Auftreten von oxidativem Schaden untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine Reduktion der mRNA der MnSOD bereits durch therapeutische Dosen von Adriamycin. Dass dieser Effekt primär durch Radikale im Sinne eines oxidativen Schadens ausgelöst wurde, kann durch die fehlenden Hinweise auf stattgehabte Lipidperoxidation weitgehend ausgeschlossen werden.

2000 verglich Röhrdanz (Röhrdanz et al., 2000) in ihrer Arbeit Adriamycin mit dem als Herbizid einsetzbaren Paraquat auf Unterschiede betreffs des Ausmaßes der Lipidperoxidation und der Wirkung auf die Genexpression von antioxidativen Enzymen. Verwendet wurden primäre Kulturen aus Rattenhepatozyten. Beide Substanzen sind bekannt dafür, dass sie zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen, aber nur das Adriamycin ist zusätzlich zur Interkalation fähig. Sowohl Paraquat als auch dem Adriamycin konnte eine gesteigerte Lipidperoxidation nachgewiesen, wobei diese im letzten Fall erst bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  auftrat, während eine Reduktion in der Genexpression vor allem der MnSOD bereits bei 0,1 und 5  $\mu\text{M}$  beobachtet werden konnte. Die bei Paraquat nachzuweisende Hochregulation der antioxidativen Enzyme durch reaktive Sauerstoffspezies galt für Adriamycin nur im Fall der Katalase, während die Genexpression der MnSOD, von der bekannt ist, dass sie transkriptionell reguliert wird, signifikant herunterreguliert wurde. Weiterführende Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Uridin zeigten eine massive Reduktion der RNA-Synthese durch Adriamycin, die nicht für Paraquat galt.

Die Arbeit bestätigt die Annahme der Wirkungsweise des Adriamycins auf der Ebene der Transkription, und zwar durch Hemmung der RNA-Synthese, z.B. durch Interkalation. Enzyme, die nicht transkriptionell gesteuert werden, entgehen so einer Reduktion. Berücksichtigt man die Ansätze der verschiedenen bisher vorgestellten Arbeiten, lässt sich zusammenfassend behaupten, dass die Funktionsfähigkeit der Kardiomyozyten durch ein Zusammenspiel aus genetischen, funktionellen und strukturellen Faktoren bedingt ist. Der direkte Kontakt der Organellen mit Radikalen

zeigt rasch einsetzende strukturelle Veränderungen, die Funktionseinbußen nach sich ziehen. Der Effekt von Adriamycin selbst ist jedoch komplexer und führt neben der Bildung von Radikalen zu Veränderungen auf der Ebene der Nukleinsäuren, die bereits stattfinden können, noch ehe es zu funktionellen bzw. strukturellen Veränderungen kommt. So beschrieb es die erwähnte Arbeit von Ito (Ito et al., 1990), in der es nach intraperitonealer Adriamycin-Gabe bei Sprague-Dawley Ratten erst am 8. Tag zu sichtbaren Schädigungen der Zellorganelle gekommen war.

Die Bedeutung der MnSOD für die Kardiomyozyten spiegelt sich am besten wider in den Arbeiten mit transgenen bzw. knock-out Mäusen. 1996 untersuchten Yen und seine Mitarbeiter die Auswirkungen von intraperitoneal appliziertem Adriamycin in Mäusen, in denen eine genetische Überexpression menschlicher MnSOD mRNA hervorgerufen worden war (Yen et al., 1996). Während die nicht-transgenen Tiere ausgeprägte ultrastrukturelle Veränderungen nach allen verwendeten Adriamycin - Konzentrationen zeigten, waren die transgenen Tiere bis auf vereinzelt vorkommende fokale Verluste der mitochondrialen Cristae durch die überexprimierte MnSOD geschützt. In einer weiteren Arbeit mit transgenen Mäusen wurde der protektive Effekt der SOD nach intraperitonealer Adriamycin-Gabe auch auf Komplex I der Atmungskette bestätigt (Yen et al., 1999). Protektion bot die MnSOD-Überexpression auch im Hinblick auf die Apoptoserate nach Adriamycin (Daosukho et al., 2005).

Erzeugte man Tiere mit fehlendem MnSOD-Gen, starben diese rasch nach der Geburt an den Folgen einer Kardiomyopathie (Li et al., 1995; Lebovitz et al., 1996). 2000 wurde eine Arbeit vorgestellt, in denen der künstlich erzeugte Mangel an mitochondrialer MnSOD mit einer Überexpression der zytosolisch vorliegenden CuZnSOD in einer Gruppe an Tieren kombiniert wurde (Copin et al., 2000). Dennoch konnte der klinische Verfall und der vorzeitige Tod der Tiere nicht verhindert werden, offenbar blieb die antioxidative Wirkung der CuZnSOD auf das Zytosol beschränkt. Verwendete man dagegen eine Enzymvariante, die auch im Bereich der Mitochondrien antioxidativ eingriff, konnten die deletären Schäden bei fehlender MnSOD verhindert werden (Melov et al., 1998). Der Erhalt der mitochondrialen Integrität, insbesondere angesichts des kontinuierlichen Ansturms der Radikale allein bereits im Rahmen physiologischer Prozesse, spielt eine entscheidende Rolle.

Es gibt unterschiedliche und teilweise sogar gegensätzliche Beobachtungen, was die Auswirkungen von Adriamycin auf die Aktivität und die Genexpression antioxidativer Enzyme angeht. 1998 stellte Yin (Yin et al., 1998) in einer Arbeit mit FVB Mäusen, die

einmalig eine intraperitoneale Gabe von Adriamycin erhielten, 4 Tage später fest, dass es zu einer signifikanten Steigerung der mRNA der CuZnSOD, der CAT, der GPX, des Metallothioneins (MT) und der  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase ( $\gamma$ -GCS) gekommen war. Lediglich bei der CAT, dem MT und der  $\gamma$ -GCS konnte auch eine gesteigerte Aktivität gemessen werden. Im Fall der MnSOD konnten jedoch weder relevante Änderungen in der Aktivität noch in der Genexpression erhoben werden. Dagegen führte Li (Li T et al., 2000) in seiner Arbeit mit Sprague-Dawley Ratten, die nach mehreren intraperitonealen Injektionen von Adriamycin und einem anschließenden 3wöchigen Beobachtungszeitraum getötet wurden, an, dass Adriamycin den Proteinspiegel der MnSOD um 20 % senkte und ihre mRNA sogar um 45 % reduzierte, wohingegen die Aktivität unverändert blieb. Die Genexpression von CAT und GPX zeigte keine Veränderung. Gleichzeitig kam es unter den Tieren, die allein mit Adriamycin behandelt worden waren, zu einer um 40 % höheren Mortalität, die unter begleitender Behandlung mit Probucol dagegen bei 0 % lag. Der Parameter für die Lipidperoxidation war erhöht. - Auffällig in dieser Untersuchung sind der gegensätzliche Effekt des Anthrazyklins vor allem auf die MnSOD im Vergleich zu der zuvor angeführten Arbeit, die Diskrepanz zwischen erhaltener Aktivität trotz reduzierten Protein- und mRNA-Gehaltes sowie die Aufhebung der Adriamycin-induzierten Nebenwirkungen durch Probucol. Letzteres wird bei der Diskussion der exogen einzusetzenden Antioxidantien noch einmal aufgegriffen. Was die Unterschiede in Genexpression, Proteinspiegel und Enzymaktivität zueinander betrifft, ergeben sich für die GPX ebenfalls Abweichungen, allerdings mit einer signifikanten Reduktion in der Aktivität ohne Änderungen des Proteinspiegels oder der mRNA-Menge. Eine Verminderung in der Aktivität von Enzymen kann laut den Autoren oxidativ erfolgen, d.h. durch Bindung von Radikalen an deren Bindungszentren, vor allem wenn die Anwesenheit von Radikalen nachgewiesen werden konnte. Umgekehrt kann man sekundär einen Anstieg in der Radikalmenge bzw. in der Lipidperoxidation als Folge einer verminderten Funktionsfähigkeit antioxidativer Enzyme erwarten. Wären die auftretenden Radikale unter Adriamycin bereits allein für dessen Nebenwirkungen verantwortlich, wäre eine oxidative Aktivitätsminderung wohl auch der MnSOD zu erwarten. Dagegen scheint sich bei diesem Enzym eine Reduktion auf transkriptioneller bzw. translationaler Basis abzuspielen, ohne dass seine Funktion in Mitleidenschaft gezogen würde. Nach Aussage der Autoren kann es bei der Aktivitätsmessung aufgrund der angewandten Methode

aber auch zu einer Addition der Aktivität der zytosolischen SOD, d.h. der CuZnSOD, gekommen sein.

Wie sich Adriamycin *in vivo* auf die antioxidativen Enzyme auswirkt, haben Li et al. in zwei Arbeiten überprüft, mit denen Früh- und Späteffekte gegenübergestellt wurden. In der ersten Arbeit wurden Ratten 1, 2, 4 und 24 h nach Einmalgabe von Adriamycin getötet, in der zweiten 1, 2, 4 und 24 h nach der letzten von 6 intraperitoneal verabreichten Injektionen (Li et al., 2002; Li and Singal, 2000). In der ersten Untersuchung fiel vor allem eine signifikante Reduktion der GPX mRNA auf, begleitet von einer Reduktion des Proteinspiegels bei nur tendenziell verminderter Aktivität. Nach mehreren Adriamycingaben sanken sowohl Proteinspiegel als auch Aktivität signifikant ab. Die CuZnSOD wurde auf der mRNA-Ebene induziert, zeigte aber eine signifikante Reduktion im Proteingehalt und Aktivität. In der zweiten Untersuchung fiel erstmals eine signifikant gesteigerte CAT-Aktivität auf, während der Proteinspiegel keine größeren Veränderungen aufwies. Das Verhalten der MnSOD zeigte früh in den ersten 4 h abfallende Tendenzen in allen drei Kategorien mit anschließendem Anstieg nach 24 h, signifikante Reduktionen ergaben sich erst in der zweiten Arbeit, und zwar bei beidem, Aktivität und Protein.

In einer Untersuchung zur Evaluierung renaler Schäden durch Adriamycin fand sich in den Cortezellen von Mäusen nach einmaliger *i.p.* Gabe lediglich eine reduzierte Expression der GPX, die mRNA der übrigen antioxidativen Enzyme wurde nicht verändert (Deman et al., 2001). Signifikante Einbußen in der Aktivität wurden dagegen bei der GPX, der CAT sowie der MnSOD nachgewiesen.

Insgesamt lassen die zahlreich durchgeführten Arbeiten keine allgemeingültige Schlussfolgerung zu, die die Auswirkungen von Adriamycin auf Expression und Aktivität der antioxidativen Enzyme berechenbar macht. Die unterschiedlichen Beobachtungen lassen sich zum Teil auf die unterschiedlichen verwendeten Tiermodelle zurückführen, auf die Dauer der Adriamycin - Behandlung bzw. auf die sich anschließende Zeitspanne bis zur Gewinnung der Gewebeproben sowie auf die untersuchten Organe, die im Gehalt der einzelnen antioxidativen Enzyme sowohl untereinander differieren als auch im Vergleich zum Tumorgewebe.

Doroshov zeigte mit seiner Arbeit von 1980 (Doroshov et al., 1980), dass das Herzgewebe, in diesem Fall von Mäusen, deutlich geringere Aktivitäten der CAT und SOD besitzt als das Lebergewebe. Untersuchungen an weiblichen Mäusen zeigten eine höhere Aktivität der GPX in der Leber als im Herzen (Odom et al., 1992). Weiterhin

sind organspezifisch niedrigere Spiegel an GSH im Herzen gemessen worden (Olson et al., 1981; Rajagopalan et al., 1988). Die Aktivität der kardialen Katalase beträgt ca 2 % der Aktivität der hepatischen, und zwar sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte (Ishikawa et al., 1986; Chen et al., 1994). Die höchste Aktivität wurde dabei in der Leber und den Erythrozyten gemessen, die niedrigste im Herzen und Hirngewebe. Der niedrige Gehalt an CAT im Herzen konnte auch für Kaninchen bestätigt werden (Thayer, 1977). 1995 ergaben Untersuchungen der Genexpression der einzelnen AOs in verschiedensten Organen der Maus, dass die Pankreas Inselzellen die geringsten mRNA-Werte von allen besaßen (Lenzen et al., 1996; Kralik et al., 1998), wohingegen die Leber mit dem höchsten Gehalt an CAT und GPX aufwarten konnte. Die Genexpression der CuZnSOD und der MnSOD erreichte ein Maximum in den Nebennieren. Der kardiale Spiegel der MnSOD mRNA übertraf den der Leber mit 142 %, die Menge der CAT und der GPX war, wie es bereits andere Autoren beschrieben, jedoch deutlich geringer. Dass die Genexpression der MnSOD im Herzen besonders hoch liegt, bestätigte auch die Arbeit über die durch Polyadenylierung entstehenden Unterformen des Enzyms (Hurt et al., 1992).

Die Zusammensetzung der MnSOD mRNA von Säugetieren aus mehreren Unterformen wird auf multiple Polyadenylierungssignale in der 3'-UTR zurückgeführt (Hurt et al. 1992). Bei der Ratte ergibt dies fünf Transkripte von 1.1 kb, 1.3 kb, 2.2 kb, 2.7 kb und 3.8 kb, beim Menschen sind mRNA-Spezies von 1.0 kb und 4.0 kb beschrieben worden (Kahlos et al., 1998; Daosukho et al., 2002). Als Polyadenylierung bezeichnet man das Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes an das 3'-Ende der Prä-mRNA. Am 3'-Ende befindet sich eine (bei der MnSOD mRNA mehrere) 5'...AAUAAA...3' – Sequenz, die als Polyadenylierungssignal fungiert. Etwa 15-20 Basen downstream von diesem Signal wird die Prä-mRNA endonukleolytisch gespalten. Durch die Poly(A)-Polymerase wird dann ein Poly(A)-Schwanz angehängt. Der Poly(A)-Schwanz spielt eine Rolle bei der Stabilisierung der mRNA, beim Transport aus dem Kern und bei der Effizienz der Translation. Fehlt er oder ist er verkürzt, so wird die mRNA schnell abgebaut. Polyadenylierung ist – neben dem 5'-Capping, das der Stabilisierung dient, und dem Splicing, das die Introns aus der Prä-mRNA entfernt und so die reife mRNA bildet – eine der drei post- bzw. cotranskriptionalen Prozessierungstypen der mRNA. Sowohl durch alternatives Splicing als auch durch alternative Polyadenylierung können mRNA-Spezies unterschiedlicher Größe aus einer Prä-mRNA hervorgehen. Im ersten Fall bedingt dies in der Regel auch die Entstehung unterschiedlich großer Proteine mit unter

Umständen unterschiedlicher Funktionalität, im Fall der alternativen Polyadenylierung, wie er auf die MnSOD mRNA zutrifft, entsteht aber jeweils das gleiche Protein, weil der Poly(A)-Schwanz außerhalb der kodierenden Region liegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine differentielle Beeinflussung der fünf MnSOD mRNA-Unterformen durch Adriamycin beobachtet. Während die beiden kleinen Transkripte der Größen 1.1 kb und 1.3 kb deutlich und bereits durch die niedrigste Adriamycin-Dosis von 1  $\mu$ M reprimiert wurden, war das größte Transkript von 3.8 kb nur durch die höchste Dosis unterdrückt. Die beiden Transkripte der Größen 2.2 kb und 2.7 kb reagierten kaum auf die Behandlung mit Adriamycin. In der Summe war aber die Präsenz der Transkripte vermindert. Ob und wie sich das nach Adriamycin veränderte Muster der mRNA-Unterformen auf die Translation auswirkt, konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden. Wenn man von der Annahme ausgeht, dass lange Poly(A)-Schwänze das Transkript besser vor dem Abbau schützen als kurze, könnte die mindestens bei niedrigeren Adriamycin - Dosierungen gefundene Verschiebung in den höhermolekularen Bereich den Einfluss des Zytostatikums auf die Bildung des MnSOD-Proteins relativieren. Da keine Daten aus der Literatur zu einem vergleichbaren Phänomen vorliegen, ist diese Interpretation jedoch hochgradig spekulativ.

Dass eine Parallele zu der in dieser Arbeit beschriebenen selektiven Repression spezieller mRNA-Unterformen in der wissenschaftlichen Literatur nicht gefunden wurde, hat vermutlich zwei Gründe: Zum einen ist die alternative Polyadenylierung einer mRNA offenbar eine Ausnahme, zum anderen wird in den Publikationen der letzten 10 Jahre die Transkriptebene zunehmend durch RT-PCR-Methoden abgebildet, während Northern Blots kaum noch publiziert werden. Mit den gängigen RT-PCR-Verfahren wird der Poly(A)-Schwanz nicht mit amplifiziert, so dass eine differentielle Polyadenylierung nicht erkannt werden könnte. Entsprechend findet sich in der Literatur auch weder Datenmaterial noch Spekulationen über den Mechanismus, der einer differentiellen Polyadenylierung zu Grunde liegen könnte. Denkbar ist ein Einfluss auf der transkriptionellen Ebene, etwa beim Erkennen und Umsetzen des Terminationssignals in der 3'-UTR oder der Vorgänge, die die Tätigkeit der Poly(A)-Polymerase in Gang setzen; aber auch eine durch Adriamycin gesteuerte Verkürzung längerer Poly(A)-Sequenzen – etwa durch den Verlust eines vor Abbau schützenden Proteins – wäre vorstellbar.

Was die Verteilung der antioxidativen Enzyme in Tumorgewebe angeht, kam 2000 eine Arbeit zu dem Ergebnis signifikant gesteigerter Aktivitäten von CAT, GPX und MnSOD im menschlichen Brustkrebsgewebe (Portakal et al., 2000). Ähnliche Beobachtungen machten auch Ripple (Ripple and Henry, 1997), Buser (Buser and Jencourt, 1997) und Liu (Liu and Oberley, 1997). Die erhöhten Aktivitäten ließen sich dabei auf eine vermehrte Genexpression zurückführen (Hartmann, 1987; Izutani et al., 1996). Die MnSOD mRNA wurde z.B. in menschlichen Mesotheliomzellen hochreguliert vorgefunden (Kinnula et al., 1996), ebenso im Gewebe eines Kolonkarzinoms (Nakano et al., 1996). Es gibt jedoch Autoren, die bei ihren Untersuchungen von Tumoren auf einen erniedrigten Gehalt an antioxidativen Enzymen gestoßen sind (Guner et al., 1996; Oberley and Buettner, 1979; Calabrese and Canada, 1989).

### Zur Rolle der MnSOD für die Sensitivität von Zellen gegen Stress

Es ist bekannt, dass Gewebearten sich in der Sensibilität gegenüber oxidativem Stress voneinander unterscheiden. Dieselbe Feststellung macht man bei der Behandlung von Krebs, wobei man in der Wahl seiner Therapie auf die mehr oder weniger ausgeprägte Sensibilität der einzelnen Tumorarten Rücksicht nehmen muss. Einer der Gründe für die (fehlende) Ansprechbarkeit zum Beispiel auf Chemotherapie ist in der Konstellation der antioxidativen Enzyme zu suchen. Besonders der MnSOD fällt eine besondere Rolle zu. Vor allem in in vitro Versuchen konnte dabei eine Korrelation zwischen Überexpression der MnSOD und der Resistenz gegen schädigende äußere Einflüsse nachgewiesen werden. Mesotheliomzellen mit unterschiedlichem Gehalt an MnSOD wurden mit nicht-malignen mesothelialen Zellen verglichen (Kinnula et al., 1998). Die sich gegenüber Epirubicin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als resistent erweisende Mesotheliomlinie besaß einen besonders hohen Spiegel an MnSOD mRNA einschließlich deutlich höherer Aktivität der MnSOD und der GPX. Zusätzlich ließ sich eine hohe Menge an Glutathion messen, das Substrat für die GPX. Auch in HeLa Zellen wirkte eine Überexpression an MnSOD protektiv dem Zelltod entgegen (Palazzotti et al., 1999). Eine höhere SOD-Aktivität schützte humane Leukämiezellen vor Strahlenschäden (Yamaguchi et al., 1994), Zellen eines Wilms-Tumors vor der Chemotherapie (Gajewska et al., 1996). Auch in gesunden Epithelzellen der Maus verhinderte die MnSOD das Auftreten von Strahlenschäden

(Epperly et al., 2000). Guo untersuchte anhand humaner MCF-7 Karzinomzellen den Mechanismus der Strahlenresistenz und fand heraus, dass er mit einer erhöhten Expression der MnSOD zusammenhing, deren Regulation unter anderem über transkriptionelle Faktoren erfolgte und mit der Aktivierung weiterer antiapoptotischer Faktoren einherging (Guo et al., 2003). Vermittelt wird die Regulation u.a. durch die Sequenz, die der Promotor der MnSOD für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B besitzt (Wan et al., 1994). Wurde die Aktivierung von NF- $\kappa$ B gehemmt, sank der mRNA-Spiegel der MnSOD, die Radiosensitivität stieg. In einer Arbeit mit Zellen des Prostatakarzinoms konnte letzteres allerdings nicht bestätigt werden (Pajonk et al., 1999). Eine andere Regulation der MnSOD besteht über den Weg des p53, eines Tumorsuppressorgens, das die Apoptose induziert. Eine Arbeit von Pani wies einen negativen Regulationsweg auf, bestimmt an Versuchen mit Fibroblasten der Maus (Pani et al., 2000). In den Zellen, in denen ein Mangel an p53 verursacht worden war, zeigte sich eine Steigerung sowohl im mRNA-Gehalt als auch in der Aktivität der MnSOD mit konsekutiver Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Regulierte man statt dessen p53 hoch, sank die MnSOD-Aktivität. Die negative Regulierung wurde anhand von MCF-7 Zellen auch 2001 beschrieben (Drane et al., 2001). Auch im Fall von p53 besteht in manchen Tumoren ein Mangel, der zu einer geringeren Apoptoserate und damit zum längeren Überleben der Tumorzelle führt (Levine, 1997). Die Arbeit von Hussain führte 2004 zu einem gegenteiligen Ergebnis (Hussain et al., 2004). Zwar war man sich in der Steigerung der Apoptose durch p53 einig, das Gen führte aber, gemessen an menschlichen Lymphoblasten, zu einer Hochregulierung der MnSOD und der GPX, letzteres war bereits von Tan festgestellt worden (Tan et al., 1999). Die CAT war nicht involviert.

Weiterhin war eine Korrelation mit TNF $\alpha$ , einem Zytokin, festgestellt worden, dem eine antitumoröse Wirkung zugesprochen wird (Watanabe et al., 1985; Watanabe et al., 1994). Verschiedene Linien von Adenokarzinomzellen aus humanem Brustdrüsengewebe wurden auf ihre Resistenz gegenüber Adriamycin hin untersucht (Zyad et al., 1994). Die Autoren stellten fest, dass die resistanteste Linie eine Überexpression von endogenem TNF $\alpha$  (enTNF) und der MnSOD aufwies, was gleichzeitig zu einer Resistenz gegenüber exogenem TNF führte. Der protektive Effekt des endogenen TNF wurde bereits 1992 beschrieben (Okamoto et al., 1992), der protektive Effekt der MnSOD exogenem TNF gegenüber sogar noch früher (Wong et

al., 1989). Dabei scheint der Mechanismus in der Induktion der MnSOD durch den enTNF zu liegen (Himeno et al., 1992; Maeda et al., 1994). In einer in vitro Untersuchung wurden HeLa Zellen Adriamycin ausgesetzt (Watanabe et al., 1995). Das Anthrazyklin reduzierte die Expression von enTNF und die Aktivität der MnSOD, daraus resultierte eine zunehmende Sensitivität gegenüber exogenem TNF. Ähnliches berichtete Safrit (Safrit and Bonavida, 1992). 1998 bestätigte eine Arbeit an humanen Pankreaskarzinomzellen diesen Effekt von Adriamycin auf die TNF-Expression und die MnSOD-Aktivität (Kobayashi et al., 1998). Die Reduktion der Parameter führte zu einer gesteigerten Hitzesensitivität, die wiederum die Apoptose induzierte.

Dass das gesteigerte Vorkommen der MnSOD lediglich Vorteile für die Zelle bedeutet, wurde in diversen Arbeiten widerlegt. In epidermalen Zellen der Maus führte die MnSOD zu einer verminderten Wachstumsrate (Amstad et al., 1997), in humanen Zell-Linien zu einer verminderten Kolonisierungsfähigkeit (Zhong et al., 1997). In menschlichen Gliomzellen verursachte die Überexpression der MnSOD eine Minderung des Zellwachstums (Li S et al., 2000). Die Autoren vermuteten als Ursache eine gesteigerte Produktion von  $H_2O_2$ , die zu oxidativen Schäden führte, denn eine begleitende Überexpression der GPX konnte die Wachstumshemmung wieder aufheben. In einer Arbeit mit Gliomzellen der Ratte bewirkte die MnSOD eine Erhöhung der Sensitivität für oxidativen Stress (Zhong et al., 1996). Dabei muss der Mediator nicht allein das  $H_2O_2$  sein, in Frage kommen auch Lipidhydroperoxide (Omar and Cord, 1990). Andere Autoren haben die Vorteile einer Kombination antioxidativer Enzyme beschrieben, um den Abbau von Superoxidradikalen und des dabei anfallenden Wasserstoffperoxids zeitnah zu gewährleisten (Freeman et al., 1985; McCord, 1993). Erhöhte  $H_2O_2$  -Spiegel im Falle einer Überexpression der SOD wurden auch von Schmidt beschrieben (Schmidt et al., 1995), während Teixeira zu einem gegensätzlichen Ergebnis kam (Teixeira et al., 1998). Abgesehen von der MnSOD zieht auch die Überexpression anderer antioxidativer Enzyme unerwünschte Schäden mit sich. Eine Überexpression der CuZnSOD begünstigte in epidermalen Zellen der Maus das Auftreten oxidativer DNA-Schäden, was erst durch die CAT bzw. GPX reduziert werden konnte (Amstad et al., 1991). Transgene Mäuse, die die Katalase überexprimierten, zeigten initial zwar einen kardioprotektiven Effekt nach Einsatz von Adriamycin, bei 200fach gesteigerter Aktivität des Enzyms stagnierte dieser Effekt, und bei 500fach gesteigerter Aktivität schlug er ins Gegenteil um, die Kardiotoxizität nahm zu (Kang et al., 1996).

Die zahlreichen Untersuchungen führen zum einen die Wichtigkeit des Zusammenspiels der antioxidativen Enzyme vor Augen, zum anderen demonstrieren die Ergebnisse die Komplexität der Induktions- und Inhibitionsmechanismen mit einer Vielzahl an beteiligten Faktoren, die darüber entscheiden, ob eine Zelle zugrunde geht oder nicht. Wiederum können jedoch trotz ähnlicher Bedingungen im Versuchsaufbau unterschiedliche Resultate erhoben werden.

Ob die MnSOD protektive oder auch schädliche Auswirkungen hat, bei dieser Frage gehen die Meinungen auseinander. Was die Induzierbarkeit des Enzyms angeht, scheint diese durch verschiedene Faktoren gegeben. Darunter fallen Hitzeeinwirkung (Yamashita et al., 1997), mechanische Irritation der Zellen (Pillar and Seitz, 1999) und Strahlung (Guo et al., 2003; Oberley et al., 1987). Weitere Ansätze bestehen in der Induktion durch den Endothelin-1-Rezeptor (Suzuki and Miyauchi, 2001) oder durch das AP-1 (Borello and Demple, 1997), für das eine Bindungssequenz im Gen der MnSOD der Ratte nachgewiesen werden konnte (Ho and Crapo, 1987). Sauerstoff wurde als Induktor für MnSOD beschrieben (Stevens and Aitor, 1977). Dieselbe Wirkung erzeugten Superoxidradikale (Shull et al., 1991) sowie Wasserstoffperoxid (Yoshioka et al., 1994; Kinscherf et al., 1998; Röhrdanz and Kahl, 1998). Bei der Applikation von Hitze (d.h. die Zellen wurden einer höheren Temperatur als 37°C ausgesetzt) wird ebenfalls das Auftreten von ROS als Ursache für die dadurch erreichte Zytotoxizität diskutiert (Yamauchi et al., 1992). Bei der Aktivierung von p53 mit Steigerung der Apoptose wurde ein erhöhter oxidativer Stress beobachtet (Johnson et al., 1996; Polyak et al., 1997). Allerdings ist zu diskutieren, ob der oxidative Stress p53 induziert und damit eine Kaskade antreibt, die im Zelltod mündet, oder ob ein Teil der ROS-Produktion nicht auch durch im Rahmen der bereits eingeleiteten Prozesse für die Apoptose entsteht. Zudem sind Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies nicht von der Hand zu weisen. Die Aktivierung von p53 führte zwar im Gewebe glatter Muskulatur des Menschen zu einer Erhöhung von Sauerstoffradikalen, dies war jedoch in glatter Muskulatur der Ratte nicht zu beobachten (Johnson et al., 1996). Womöglich ist diese Diskrepanz auf die weniger als 50 %-ige Ähnlichkeit ihrer p53-bindenden Sequenzen im MnSOD Promotor zurückzuführen.

## Zum Zusammenhang zwischen Radikalbildung und MnSOD-Regulation nach Adriamycin

Betrachtet man unter Berücksichtigung der zahlreichen Faktoren, die zu einer Induktion der MnSOD führen können, noch einmal die Literaturangaben zu den Auswirkungen von Adriamycin auf Expression, Proteinspiegel und Aktivität dieses Enzyms, fällt die Diskrepanz auf zwischen dem Auftreten von ROS bzw. Lipidperoxidation und dem Fehlen einer Induktion, wie man sie durch reaktive Sauerstoffspezies erwarten würde. Dieses Verhalten steht teilweise im Gegensatz zu dem der anderen antioxidativen Enzyme. Mit der vorliegenden Arbeit ließ sich unter *in vitro* Bedingungen feststellen, dass die Expression der MnSOD herunterreguliert wird, und zwar bereits nach 24 h Exposition mit Adriamycin ohne messbaren oxidativen Stress und ohne Zeichen gesteigerten Zelltodes bei erst spät abfallender Viabilität. Die Anzahl ähnlich aufgebauter *in vitro* Untersuchungen vor allem zur Bestimmung der Genexpression der MnSOD ist gering, so dass lediglich Teilvergleiche möglich sind. Wie erwähnt, wurde *ex vivo* eine fehlende relevante Veränderung in der MnSOD-Expression von Maus Herzen beobachtet, während andere AOE's hochreguliert worden waren (Yin et al., 1998). Das Ausmaß oxidativen Stresses war dabei nicht bestimmt worden. Dagegen waren in einer ebenfalls bereits besprochenen Arbeit *ex vivo* in Rattenherzen 3 Wochen nach Adriamycin-Behandlung deutlich erhöhte Lipidperoxidations-Spiegel bestimmt worden, die MnSOD war jedoch herunterreguliert vorgefunden worden. Auch in der Arbeit mit primären Hepatozytenkulturen der Ratte wurde unter Adriamycin eine Steigerung in der Lipidperoxidation gemessen, doch auch hier war eine Reduktion der MnSOD mRNA zu beobachten, während die mRNA der Katalase erhöht war. Die meisten Arbeiten zeigen, ob *in vitro* oder *ex vivo*, entweder reduzierte oder unveränderte Spiegel der MnSOD mRNA bzw. Reduktionen im Proteingehalt oder Aktivität, obwohl Adriamycin mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird, was zu einer Induktion der MnSOD führen müsste. Das mag einerseits an dem komplexen Regulationsmechanismus des Enzyms liegen oder aber an den Effekten des Adriamycins auf die Transkription. Versuche mit Actinomycin D, einem Inhibitor der RNA-Synthese, haben gezeigt, dass sich die Regulation antioxidativer Enzyme voneinander unterscheiden kann (Röhrdanz and Kahl, 1998). Hierbei kam es zu einer Reduktion des mRNA-Spiegels der MnSOD, die auf die Eigenschaft des Anthrazyklins

als Transkriptioneninhibitor zurückgeführt wurde, im Fall der Katalase aber zu einer Zunahme der mRNA, was darauf hindeutet, dass das letztgenannte Enzym einer posttranskriptionellen Regulation unterliegt.

Bei der Frage, ob Adriamycin allein über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wirkt, erlauben Arbeiten über den Einsatz von Antioxidantien weitere Schlüsse.

1989 wurde Glutathion in einem Versuch mit Mäusen auf seine kardioprotektive Wirkung hin untersucht (Sazuka et al., 1989). Zwar reduzierte dieses das Ausmaß der Lipidperoxidation durch Adriamycin, Abfälle in den Aktivitäten der antioxidativen Enzyme, insbesondere der GPX im Herzgewebe, konnten jedoch nicht verhindert werden, was den Schluss erlaubt, dass die Aktivitätsminderung nicht allein oxidativ bedingt sein kann. Sinha zeigte in einer früheren Untersuchung, dass trotz Anwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol die Bindung des Adriamycins an die DNA uneingeschränkt erfolgte (Sinha and Gregory, 1981). Anders dagegen bei Glutathion, das den Umfang der Bindung reduzierte. Die Bildung des Semichinonradikals konnten beide nicht beeinflussen. Eine zufriedenstellende Kardioprotektion wird  $\alpha$ -Tocopherol für akut auftretende toxische Wirkungen des Adriamycins zugeschrieben (Mimnaugh et al., 1979), chronische Verläufe mit Entwicklung einer Kardiomyopathie nach mehreren Dosen Adriamycin konnte es nicht verhindern, und zwar weder in Tierversuchen noch bei Patienten (Breed et al., 1980; Legha et al., 1982b). Mit einer 10fach höheren antioxidativen Wirksamkeit als  $\alpha$ -Tocopherol wurde Carvedilol, ein  $\beta$ -Blocker, in der Therapie der Adriamycin-induzierten Herzinsuffizienz untersucht (Matsui et al., 1999). Es wurde mit Atenolol, einem weiteren  $\beta$ -Blocker, verglichen. Im Gegensatz zu Atenolol war Carvedilol in der Lage, die kardiotoxische Wirkung des Anthrazyklins ebenso zu reduzieren wie das Ausmaß der Lipidperoxidation. Als Wirkmechanismus wird von den Autoren der zusätzliche lipidsenkende Effekt diskutiert, dessen positive Auswirkung bereits in einer Arbeit mit Lovastatin, einem Lipidsenker ohne nachweisliche antioxidative Fähigkeit, beschrieben wurde (Iliskovic and Singal, 1997). Derselbe Aspekt wiederholt sich in der Betrachtung der Wirkungsweise von Probuco, einem Lipidsenker, dessen Schwachpunkt u.a. in der unerwünschten Senkung des HDL liegt, was ihn für den Einsatz zur Regulation des Fettstoffwechsels unbrauchbar macht. Seine antioxidativen Fähigkeiten zeigten sich dagegen in einigen Untersuchungen als vielversprechend bei dem Versuch, der Kardiotoxizität des Adriamycins beizukommen. In der Arbeit von Siveski-Iliskovic reduzierte der Einsatz von Probuco vor und

während der Behandlung mit Adriamycin das Auftreten der bekannten ultrastrukturellen Veränderungen sowie die Mortalität (Siveski-Iliskovic et al., 1995). Die Senkung der GPX-Aktivität wurde verhindert, die SOD-Aktivität sogar gesteigert. Ähnliche Effekte wurden wenige Jahre später bestätigt, diesmal wurde auch eine Steigerung der GPX-Aktivität gefunden (Iliskovic et al., 1999). Auch der Senkung der Proteinspiegel von GPX und MnSOD wirkte Probucol entgegen (Li and Singal, 2000). In sämtlichen Arbeiten konnte durch Probucol die Adriamycin-induzierte Lipidperoxidation verhindert werden. Die besseren Ergebnisse ließen sich dabei erzielen, wenn Probucol bereits vor der ersten Adriamycin - Gabe verabreicht wurde, eine lediglich parallele Gabe führte nur zu Teilerfolgen in der Kardioprotektion (Siveski-Iliskovic et al., 1994). Wie sich Probucol auf die Genexpression antioxidativer Enzyme auswirkt, untersuchte die Arbeit von Li (Li T et al., 2000). Die Senkung des Proteinspiegels der MnSOD durch Adriamycin konnte durch Probucol vollständig aufgehoben werden, der mRNA-Gehalt konnte dagegen zwar angehoben werden, blieb jedoch unterhalb dem der Kontrollgruppe. Probucol schien tendenziell selbst eine geringgradige Senkung in den mRNA-Spiegeln von GPX, MnSOD und CAT herbeizuführen. Untersuchungen an Zellkulturen konnten zudem nachweisen, dass die Fähigkeit des Adriamycins zur Inhibition des Wachstums gesunder und tumoröser Zellen durch Probucol nicht beeinträchtigt wurde, gemessen in Ovarzellen chinesischer Hamster (Iliskovic et al., 1999) und in Lymphomzellen der Maus (Siveski-Iliskovic et al., 1994). Auch im Falle des  $\alpha$ -Tocopherols, das die Lipidperoxidation vermindert, blieb die antitumoröse Wirkung des Anthrazyklins unverändert erhalten (Myers et al., 1977). Dexrazoxane, ein Eisenchelator, für den in verschiedenen Tiermodellen und zuletzt auch in der Behandlung der ALL bei Kindern kardioprotektive Effekte nachgewiesen werden konnten (Herman and Ferrans, 1986; Yeung et al., 1992; Lipschultz et al., 2004), verstärkte dagegen die hämatotoxischen Nebenwirkungen des Adriamycins (Von Hoff et al., 1981). Über welche detaillierten Mechanismen auch immer, Probucol und Dexrazoxane scheinen eine vielversprechende Begleitmedikation zur Therapie mit Adriamycin darzustellen, um die kardiotoxischen Nebenwirkungen möglichst gering zu halten.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen mit Antioxidantien schließen, dass ein Teil der Wirkungen des Adriamycins nicht auf oxidativem Stress beruhen kann. So wurden die Zellen in Anwesenheit von Probucol an ihrem Wachstum gehindert, ohne dass eine

erhöhte Lipidperoxidation messbar war und ohne dass es zu Einbußen in der Aktivität der antioxidativen Enzyme gekommen wäre. Als sehr wahrscheinlich ist eine Störung auf der Ebene der DNA anzusehen, z.B. durch interkalierende Vorgänge, die unabhängig von der Radikalbildung ablaufen

## Zusammenfassung

Wie jedes Chemotherapeutikum zeigt Adriamycin neben dem erwünschten antitumorösen Effekt durch Inhibition des Zellwachstums auch eine Reihe unerwünschter Wirkungen auf gesundes Gewebe. Die biochemischen Mechanismen der Nebenwirkungen sind jedoch nicht vollständig geklärt, denn Adriamycin bietet ein komplexes Wirkungsbild. Für den Zelltod als Endpunkt der erwünschten zytostatischen, aber auch der unerwünschten kardiotoxischen Wirkung werden bei den Anthrazyklinen ursächlich zwei Hauptmechanismen diskutiert: der direkte Weg über Interkalation und Bindung der DNA bzw. der indirekte Weg über die Bildung von Radikalen. In zahlreichen Tiermodellen wurde nach Gabe von Adriamycin gesteigerter oxidativer Stress gemessen, direkt über den Nachweis der Radikalbildung, indirekt über einen Anstieg der Lipidperoxidation. Allerdings bestand häufig die Frage, ob der oxidative Stress primär oder sekundär verursacht war.

In der vorliegenden Arbeit konnte in primären Zellkulturen aus Kardiomyozyten kein Anstieg der Malondialdehydproduktion und damit kein Zeichen von oxidativem Stress selbst nach hohen Adriamycin-Dosen (130  $\mu\text{M}$ ) festgestellt werden; auch die Zellviabilität blieb bis zu diesen hohen Konzentrationen erhalten. Dagegen war es bereits bei niedrigen Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ ), die im Bereich der therapeutischen Blutkonzentrationen liegen, mit der Minderung der Genexpression der MnSOD zu einer deutlichen Störung auf der Ebene der Nukleinsäuren gekommen. Die Summe der Konzentrationen der im Northern Blot nachgewiesenen fünf bekannten differentiell polyadenylierten Unterformen von 3.8 kb, 2.7 kb, 2.2 kb, 1.3 kb und 1.1 kb der MnSOD mRNA der Ratte war nach Behandlung mit Adriamycin verringert. Dies ging vor allen Dingen auf eine Repression der beiden kleinen Transkripte von 1.3 und 1.1 kb zurück, die bei einer Adriamycin - Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant wurde.

Mit einer primären Kultivierung von Kardiomyozyten ist es demnach in der vorliegenden Arbeit gelungen, die Auswirkungen von Adriamycin nach 24stündiger Exposition auf die Viabilität, die Radikalbildung und die Genexpression eines wichtigen

antioxidativen Enzyms, der manganhaltigen Superoxid Dismutase (MnSOD), zu untersuchen. Die Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen anderer Autoren, was die Fähigkeit des Anthrazyklins zur Wechselwirkung auf transkriptioneller Stufe angeht. Beachtenswert ist, dass ein wichtiges antioxidatives Enzym davon betroffen ist. Oxidativer Stress dagegen spielt primär offenbar eine untergeordnete Rolle.

## **6. Literaturverzeichnis**

Abdella BRJ, Fisher J: A chemical perspective on the anthracycline antitumour antibiotics. *Environ Health Perspect* 64: 3-18, 1985

Aebi, H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984

Alegria AE, Samuni A, Mitchell JB, Riesz P, Russo A: Free radicals induced by adriamycin-sensitive and adriamycin-resistant cells: A spin-trapping study. *Biochemistry* 28: 8653-8658, 1989

Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I, Cerutti P: The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 30: 9305-9313, 1991

Amstad PA, Liu H, Ichimiya M, Berezsky IK, Trump BF: Manganese superoxide dismutase expression inhibits soft agar growth in JB6 clone41 mouse epidermal cells. *Carcinogenesis* 18: 479-484, 1997

Arcamone F, Cassinelli G., Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C: Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 9: 1101-1110, 1969

Arico M, Pedroni E: Severe and fatal anthracycline cardiotoxicity at doses below 400 mg/m<sup>2</sup>: evidence for enhanced toxicity with multiagent chemotherapy. *Am J Haematol* 36: 217-278, 1991

Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki L-M: Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 60: 1789-1792, 2000

Asbell MA, Schwartzbach E, Bullock FJ, Yesair DW: Daunomycin and adriamycin metabolism via reductive glycosidic cleavage. *J Pharmacol Exp Ther* 182: 63-69, 1972

Bachmann E, Zbinden G: Effect of doxorubicin and rubidazone on respiratory function and  $\text{Ca}^{2+}$  transport in rat heart mitochondria. *Toxicol Lett* 3: 29-34, 1979

Bachmann E, Weber E, Zbinden G: Effects of mitoxantrone and doxorubicin on energy metabolism of the rat heart. *Cancer Treat Rep* 71: 361-366, 1987

Bachur NR, Gordon SL, Gee MV: Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol Pharmacol* 13: 901-910, 1977

Bachur NR, Gordon SL, Gee MV: A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res* 38: 1745-1750, 1978

Bachur NR, Gordon SL, Gee MV, Kon H: NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 954-957, 1979

Bachur NR, Gee MV, Friedman RD: Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Res* 42: 1078-1081, 1982

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Kelly J, Stohs SJ: Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology* 95: 1-9, 1995

Beckmann JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437, 1996

Benjamin RS, Riggs CE, Bachur NR: Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in humans with normal hepatic and renal function. *Cancer Res* 37: 1416-1420, 1977

Bianchi C, Bagnato A, Paggi MG, Floridi A: Effect of adriamycin on electron transport in rat heart, liver, and tumor mitochondria. *Exp Mol Pathol* 46: 123-135, 1987

Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR: Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 62: 865-872, 1978

Blum RH, Carter SK: Adriamycin: a new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med* 80: 249-259, 1974

Borello S, Demple B: NF $\kappa$ B-independent transcriptional induction of the human manganese superoxide dismutase gene. *Arch Biochem Biophys* 348: 289-294, 1997

Boveris A, Chance B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716, 1973

Boveris A: Mitochondrial production of superoxide radicals and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 78: 67-82, 1977

Brawn K, Fridovich I: DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Arch Biochem Biophys* 206: 414-419, 1981

Breed JGS, Zimmerman ANE, Dormans JAMA, Pinedo HM: Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res* 40: 2033-2038, 1980

Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR: Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem* 264: 7826-7830, 1989

Buser K, Jencourt F: Breast cancer pretreatment drug resistance parameters in tumor tissue and their correlation with clinical and prognostic characteristics. *Ann Oncol* 8: 335-341, 1997

Butler J, Hoey BM, Swallow AJ: Reactions of the semiquinone free radicals of anti-tumor agents with oxygen and iron complexes. *FEBS Lett* 182: 95-98, 1985

Calabrese EJ, Canada AT: Catalase: its role in xenobiotic detoxification. *Pharmacol Ther* 44: 297-307, 1989

Cappelli V, Moggio R, Monti E, Paracchini F, Reggiani C, Piccinini F: Reduction of myofibrillar ATPase activity and isomyosin shift in delayed doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 21: 93-101, 1989

Carter SK: Adriamycin – a review. *J Natl Cancer Inst* 55: 1265-1274, 1975

Cerutti P, Larsson R, Krupitza G, Muehlematter D, Crawford D, Amstad P: Pathophysiological mechanisms of oxidants. In: Cerutti PA, editor. *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, Liss AR, New York, 1988

Chan EM, Thomas MJ, Bandy B, Tibbits GF: Effects of doxorubicin, 4'-epirubicin, and antioxidant enzymes on the contractility of isolated cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 904-910, 1996

Chan YL, Gutell R, Noller HF, Wool IG: The nucleotide sequence of a rat 18S ribosomal ribonucleic acid gene and a proposal for the secondary structure of 18S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem* 259: 224-230, 1984

Chen Y, Saari JT, Kang YJ: Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats. *Free Radic Biol Med* 17: 529-536, 1994

Copin JC, Gasche Y, Chan PH: Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 28: 1571-1576, 2000

Costa L, Malatesta V, Morazzoni F, Scotti R, Monti E, Paracchini L: Direct detection of paramagnetic species in adriamycin perfused rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 275-280, 1988

Cummings J, McArdle CS: Studies on the in vivo disposition of adriamycin in human tumours which exhibit different responses to the drug. *Br J Cancer* 53: 835-838, 1986

Cummings J, Anderson L, Willmott N, Smyth JF: The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer* 27: 532-535, 1991

Dalloz F, Maingon P, Cottin Y, Briot F, Horiot JC, Rochette L: Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat. *Free Radic Biol Med* 26: 785-800, 1999

Daosukho C, Kiningham K, Kasarskis EJ, Ittarat W, St. Clair DK: Tamoxifen enhancement of TNF $\alpha$  induced MnSOD expression: modulation of NF- $\kappa$ B dimerization. *Oncogene* 21: 3603-3610, 2002

Daosukho C, Ittarat W, Lin SM, Sawyer DB, Kiningham K, Lien YC, St. Clair DK: Induction of manganese superoxide dismutase (MnSOD) mediates cardioprotective effect of tamoxifen (TAM). *J Mol Cell Cardiol* 39: 792-803, 2005

Davies KJ, Doroshov JH: Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 261: 3060-3067, 1986

DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Harris B, Hadley R, Harper PC, Carney JM, Butterfield DA: Antioxidants protect against reactive oxygen species associated with adriamycin-treated cardiomyocytes. *Cancer Lett* 136: 41-46, 1998

Deffie AM, Batra JK, Goldenberg GJ: Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines. *Cancer Res* 49: 58-62, 1989

Deman A, Ceysens B, Pauwels M, Zhang J, Vanden Houte K, Verbeelen D, Van den Branden C: Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 16: 147-150, 2001

Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B: Adriamycin (NSC-123, 127): A new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother Rep* 53: 33-37, 1969

Di Marco A, Zunino F, Silvestrini R, Gambarucci C, Gambetta RA: Interaction of some daunomycin derivatives with deoxyribonucleic acid and their biological activity. *Biochem Pharmacol* 20: 1323-1328, 1971

Doroshov JH, Locker GY, Myers CE: Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest* 65: 128-135, 1980

Doroshov JH: Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 43: 460-472, 1983

Doroshov JH, Davies KJA: Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. *J Biol Chem* 261: 3068-3074, 1986

Doroshov JH: Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *N Engl J Med* 324: 843-845, 1991

Drane P, Bravard A, Bouvard V, May E: Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression – implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene* 20: 430-439, 2001

Draper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186: 421-431, 1990

Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M: A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 15: 353-363, 1993

Duchstein HJ, Riederer S, Erbach C: Aktive Stickstoffspezies. Ein neues Forschungsgebiet für die Pharmazeutische Industrie. *Pharm Unserer Zeit* 28: 197-207, 1999

Dusre L, Mimnaugh EG, Myers CE, Sinha BK: Potentiation of doxorubicin cytotoxicity by buthionine sulfoximine in multidrug-resistant human breast tumor cells. *Cancer Res* 49: 511-515, 1989

Eksborg S, Strandler HS, Edsmyr F, Näslund I, Tahvanainen P: Pharmacokinetic study of iv infusions of adriamycin. *Eur J Clin Pharmacol* 28: 205-212, 1985

Epperly MW, Defilippi S, Sikora C, Gretton J, Kalend A, Greenberger JS: Intratracheal injection of manganese superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposomes protects normal lung but not orthotopic tumors from irradiation. *Gene Ther* 7: 1011-1018, 2000

Esterbauer H: Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 238: 223-233, 1990

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128, 1991

Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum Analyt Biochem* 137: 266-267, 1984

Ferrero ME, Ferrero E, Gaja G, Bernelli-Zazzera A: Adriamycin: energy metabolism and mitochondrial oxidations in the heart of treated rabbits. *Biochem Pharmacol* 25: 125-130, 1976

Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Wang AHJ: Structural comparison of anti-cancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 29: 2538-2549, 1990

Freeman BA, Turrens JF, Mirza Z, Crapo JD, Young SL: Modulation of oxidant lung injury by using liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase. *Fed Proc* 44: 2591-2595, 1985

Fridovich I: Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264: 7761-7764, 1989

Gajewska J, Szczypka M, Izbicki T, Klepacka T, Laskowska-Klita T: Antioxidant and glutathione-associated enzymes in Wilms' tumour after chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 483-488, 1996

Gianni L, Vigan L, Niggeler M, et al.: Human ferritin (HLF) as iron source for lipid peroxidation by adriamycin. *Proc Am Assoc Cancer Res* 29: 378, 1988

Gigli M, Doglia SM, Millot JM, Valentini L, Manfait M: Quantitative study of doxorubicin in living cell nuclei by microspectrofluorometry. *Biochim Biophys Acta* 950: 13-20, 1988

Gille L, Nohl H: Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* 23: 775-782, 1997

Goodman J, Hochstein P: Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycle of adriamycin and daunorubicin. *Biochem Biophys Res Commun* 77: 797-803, 1977

Goormaghtigh E, Brasseur R, Ruyschaert JM: Adriamycin inactivates cytochrome c oxidase by exclusion of the enzyme from its cardiolipin essential environment. *Biochem Biophys Res Commun* 104: 314-320, 1982

Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R, Ruyschaert JM: Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem* 35: 247-257, 1990

Gottdiener JS, Mathisen DJ, Borer JS, Bonow RO, Myers CE, Barr LH, Schwartz DE, Bacharach SL, Green MV, Rosenberg SA: Doxorubicin cardiotoxicity: assessment of late left ventricular dysfunction by radionuclide cineangiography. *Ann Intern Med* 94 (Part I): 430-435, 1981

Gottlieb JA, Lefrak EA, O'Bryan RM, Burgess MA: Fatal adriamycin cardiomyopathy: prevention by dose limitation (abstr). *Proc Am Assoc Cancer Res* 14: 88, 1973

Greene RF, Collins JM, Jenkins JF, Speyer JL, Myers CE: Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res* 43: 3417-3421, 1983

Guner G, Islekel H, Oto O, Hazan E, Acikel U: Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Lett* 103: 233-239, 1996

Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Z, Weydert C, Longmate JA, Huang T-T, Spitz DR, Oberley LW, Li JJ: Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive response. *Mol Cell Biol* 23: 2362-2378, 2003

Gutteridge JMC: Lipid peroxidation and possible hydroxyl radical formation stimulated by the selfreduction of a doxorubicin-iron (III) complex. *Biochem Pharmacol* 33: 1725-1728, 1984

Halliwell B, Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85, 1989

Halliwell B: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91: 14-21, 1991

Hann JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog, Kola I: Mice with homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, GPX 1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents Paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 273: 22528-22536, 1998

Haq MM, Legha SS, Choski J, Hortobagyi GN, Benjamin RS, Ewer M, Ali M: Doxorubicin-induced congestive heart failure in adults. *Cancer* 56: 1361-1365, 1985

Hartmann Z: Glutathione peroxidase activity in tumorigenesis. *Environ Med Mutagen* 10: 3-15, 1987

Hassan HM: Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med* 5: 377-385, 1988

Hatefi Y: The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54: 1015-1069, 1985

Hegstad C, Ytrehus K, Myklebust R, Jørgensen L: Ultrastructural changes in the myocardial myocytic mitochondria: crucial step in the development of oxygen radical-induced damage in isolated rat hearts. *Basic Res Cardiol* 89: 128-138, 1994

Henderson CA, Metz EN, Balcerzak SP, Sagone AL, Jr: Adriamycin and daunomycin generate reactive oxygen compounds in erythrocytes. *Blood* 52: 878-885, 1978

Herman EH, Ferrans VJ: Pretreatment with ICRF-187 provides long-lasting protection against chronic daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol* 16: 102-106, 1986

Hess ML, Manson NH: The oxygen free radical system and myocardial dysfunction. *Adv Myocardiol* 5: 177-181, 1985

Himeno T, Watanabe N, Yamauchi N, Maeda M, Okamoto T, Tsuji Y, Akiyama S, Sasaki H, Niitsu Y: Induction of synthesis of manganese superoxide dismutase in L-M (pNTnF) cells carrying an inducible TNF gene. *Int J Cancer* 50: 458-462, 1992

Ho YS, Crapo JD: Nucleotide sequences of cDNAs coding for rat manganese-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acids Res* 15: 10070, 1987

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD: Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 278-286, 1991

Hurt J, Hsu JL, Dougall WC, Visner GA, Burr IM, Nick HS: Multiple mRNA species generated by alternate polyadenylation from the rat manganese superoxide dismutase gene. *Nucleic Acids Res* 20: 2985-2990, 1992

Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanie L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC: p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res* 64: 2350-2356, 2004

Iliskovic N, Singal PK: Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure. *Am J Pathol* 150: 727-734, 1997

Iliskovic N, Hasinoff BB, Malisza KL, Li T, Danelisen I, Singal PK: Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 196: 43-49, 1999

Ishikawa T, Akerboom TPM, Sies H: Role of key defense systems in target organ toxicity. In Cohen GM (ed) *Target Organ Toxicity*. Boca Raton, FL, CRC Press: 129-143, 1986

Ito H, Miller SC, Billingham ME, Akimoto H, Torti SV, Wade R, Gahlmann R, Lyons G, Kedes L, Torti FM: Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 87: 4275-4279, 1990

Izutani R, Katoh M, Asano S: Enhanced expression of manganese superoxide dismutase mRNA and increased TNF and mRNA expression by gastric mucosa in gastric cancer. *World J Surg* 20: 228-233, 1996

Jeyaseelan R, Poizat C, Wu HY, Kedes L: Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Biol Chem* 272: 5828-5832, 1997

Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T: Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11848-11852, 1996

Kahlos K, Anttila S, Asikainen T, Kinnula K, Raivio KO, Mattson K, Linnainmaa K, Kinnula VL: Manganese superoxide dismutase in healthy human pleural mesothelium and in malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 570-580, 1998

Kalyanaraman B, Sealy RC, Sinha BK: An electron spin resonance study of the reduction of peroxides by anthracycline semiquinones. *Biochim Biophys Acta* 779: 270-275, 1984

Kang YJ, Chen Y, Epstein PN: Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice. *J Biol Chem* 271: 12610-12616, 1996

Kaul N, Siveski-Illiskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK: Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* 30: 55-67, 1993

Keizer H, Pinedo H, Schuurhuis G, Joenje H: Doxorubicin: a critical review of free radical dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 47: 219-231, 1990

Kinnula K, Linnainmaa K, Raivio KO, Kinnula VL: Endogenous antioxidant enzymes and glutathione s-transferase in protection of mesothelioma cells against hydrogen peroxide and epirubicin toxicity. *Br J Cancer* 77: 1097-1102, 1998

Kinnula VL, Pietarinen-Runtti P, Raivio K, Kahlos K, Pelin K, Mattson K, Linnainmaa K: Manganese superoxide dismutase in human pleural mesothelioma cell lines. *Free Radic Biol Med* 21: 527-532, 1996

Kinscherf R, Claus R, Wagner M, Gehrke C, Kamencic H, Hou D, Nauen O, Schmiedt W, Kovacs G, Pill J, Metz J, Deigner HP: Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *FASEB J* 12: 461-467, 1998

Kleyer DL, Koch TH: Electrophilic trapping of the tautomer of 7-deoxydaunomycinone. A possible mechanism for covalent binding of daunomycin to DNA. *J Am Chem Soc* 105: 5154-5155, 1983

Kobayashi D, Watanabe N, Sasaki H, Okamoto T, Tsuji N, Sato T, Yamauchi N, Niitsu Y: Suppression of intracellular resistance factors by adriamycin augments heat-induced apoptosis via interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme activation in pancreatic carcinoma cells. *Int J Cancer* 76: 552-555, 1998

Koh E, Nakamura T, Takahashi H: Troponin-T and Brain Natriuretic Peptide as predictors for adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circ J* 68: 163-167, 2004

Kralik PM, Xu B, Epstein PN: Catalase transfection decreases hydrogen peroxide toxicity in a pancreatic beta cell line. *Endocr Res* 24: 79-87, 1998

Kumar D, Kirshenbaum L, Li T, Danelisen I, Singal P: Apoptosis in isolated adult cardiomyocytes exposed to adriamycin. *Ann N Y Acad Sci* 874: 156-168, 1999

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM: Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9782-9787, 1996

Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA: A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 32: 302-314, 1973

Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, Rasmussen S, Blumenschein GR, Freireich EJ: Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med* 96: 133-139, 1982a

Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, Ali MK: Clinical and pharmacologic investigation of the effects of  $\alpha$ -tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 393: 411-418, 1982b

Legha SS, Hortobagyi GN, Benjamin RS: Anthracyclines. In Lokich JJ (ed) *Cancer chemotherapy by infusion*: 100-113, Precept Press, Chicago, 1987

Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M: Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20: 463-466, 1996

Leonard A, Brown T, Hunter WN: Anthracycline binding to DNA: high resolution structure of d(TGTACA) complexes with 4'-epiadriamycin. *Eur J Biochem* 204: 69-74, 1992

Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331, 1997

Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW: The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 60: 3927-3939, 2000

Li T, Danelisen I, Belló-Klein A, Singal PK: Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res* 46: 523-530, 2000

Li T, Singal PK: Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 102: 2105-2110, 2000

Li T, Danelisen I, Singal PK: Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem* 232: 19-26, 2002

Li Y, Huang T-T, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11: 376-381, 1995

Lipschultz SE, Rifai N, Dalton VM, Levy DE, Silverman LB, Lipsitz SR, Colan SD, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Gelber RD, Sallan SE: The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 351: 145-153, 2004

Liu R, Oberley LW: Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. *Hum Gene Ther* 8: 585-595, 1997

- Lowrey K, Glende EA, Recknagel RO: Destruction of liver microsomal calcium pump activity by carbon tetrachloride and bromotrichloromethane. *Biochem Pharmacol* 30: 135-140, 1981
- Maeda M, Watanabe N, Okamoto T, Tsuji N, Niitsu Y: Endogenous tumor necrosis factor functions as a resistant factor against adriamycin. *Int J Cancer* 58: 376-379, 1994
- Maisch B, Gregor O, Zeuss M, Kochsiek K: Acute effect of calcium channel blockers on adriamycin exposed isolated adult cardiocytes. *Basic Res Cardiol* 80: 626-635, 1985
- Malatesta V, Morazzoni F, Gervasini A, Arcamone F: Chelation of copper (II) ions by doxorubicin and 4'-epidoxorubicin: an e.s.r. study. *Anticancer Drug Des* 1: 53-57, 1985
- Marcillat O, Zhang Y, Davies KJ: Oxidative and non-oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin. *Biochem J* 259: 181-189, 1989
- Mason JW, Bristow MR, Billingham ME, Daniels JR: Invasive and non-invasive methods of assessing adriamycin cardiotoxic effects in man: superiority of histopathologic assessment using endomyocardial biopsy. *Cancer Treat Rep* 62: 857, 1978
- Matsui H, Morishima I, Numaguchi Y, Toki Y, Okumura K, Hayakawa T: Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 65: 1265-1274, 1999
- McCord JM: Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. In: Hodgson E, Bend JR, Philpot RM (eds). *Reviews in Biochem Toxicol* 1. Amsterdam: Elsevier: 109-124, 1979
- McCord JM: Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 26: 351-357, 1993
- Meister A, Anderson ME: Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760, 1983

Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, Crapo JD, Wallace DC: A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 18: 159-163, 1998

Mimnaugh EG, Siddik ZH, Drew R, Sikic BI, Gram TE: The effects of  $\alpha$ -tocopherol on the toxicity, disposition and metabolism of adriamycin in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 49: 119-126, 1979

Mimnaugh EG, Kennedy KA, Trush MA, Sinha BK: Adriamycin-enhanced membrane lipid peroxidation in isolated rat nuclei. *Cancer Res* 45: 3296-3304, 1985

Minotti G, Recalcati S, Mordente A, Liberi G, Calafiore AM, Mancuso C, Preziosi P, Cairo G: The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase / iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB J* 12:541-552, 1998

Minow RA, Benjamin RS, Lee EF, Gottlieb JA: Adriamycin cardiomyopathy – risk factors. *Cancer* 39: 1397-1402, 1977

Morgan WA, Kaler B, Bach PH: The role of reactive oxygen species in adriamycin and menadione-induced glomerular toxicity. *Toxicol Lett* 94: 209-215, 1998

Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65: 55-63, 1983

Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC: Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Sci* 197: 165-167, 1977

Myers CE: The anthracyclines. In Pinedo & Chabner (eds) *Cancer chemotherapy and biological response modifiers* 9: 36-49, 1987

Nakano T, Oka K, Taniguchi N: Manganese superoxide dismutase expression correlates with p53 status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy. *Cancer Res* 56: 2771-2775, 1996

Nohl H: Demonstration of the existence of an organo-specific NADH dehydrogenase in heart mitochondria. *Eur J Biochem* 169: 585-591, 1987

Oberley LW, Buettner GR: Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* 39: 1141-1149, 1979

Oberley LW, St.Clair DK, Autor AP, Oberley TD: Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch Biochem Biophys* 254: 69-80, 1987

Odom AL, Hatwig CA, Stanley JS, Benson AM: Biochemical determinants of adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. *Biochem Pharmacol* 43: 831-836, 1992

Okamoto T, Watanabe N, Yamauchi N, Tsuji Y, Tsuji N, Itoh Y, Neda H, Niitsu Y: Endogenous tumor necrosis factor exerts its protective function intracellularly against the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor. *Cancer Res* 52: 5278-5281, 1992

Olson RD, Boerth RC, Gerber JG, Nies AS: Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: Evidence for oxidative stress. *Life Sci* 29: 1393-1401, 1981

Olson RD, Mushlin PS: Doxorubicin cardiotoxicity: Analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J* 4: 3076-3086, 1990

Omar BA, McCord JM: The cardioprotective effect of Mn-superoxide dismutase is lost at high doses in the postischemic isolated rabbit heart. *Free Radic Biol Med* 9: 473-478, 1990

Ozols RF, Young RC, Speyer JL, Sugarbaker PH, Greene R, Jenkins J, Myers CE: Phase I and pharmacological studies of adriamycin administered intraperitoneally to patients with ovarian cancer. *Cancer Res* 42: 4265-4269, 1982

Pajonk F, Pajonk K, McBride WH: Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 91: 1956-1960, 1999

Palazzotti B, Pani G, Colavitti R, De Leo ME, Bedogni B, Borrello S, Galeotti T: Increased growth capacity of cervical-carcinoma cells over-expressing manganous superoxide dismutase. *Int J Cancer* 82: 145-150, 1999

Pan SS, Bachur NR: Xanthine oxidase catalyzed reductive cleavage of anthracycline antibiotics and free radical formation. *Mol Pharmacol* 17: 95-99, 1980

Pan SS, Pederson L, Bachur NR: Comparative flavoprotein catalysis of anthracycline antibiotic reductive cleavage and oxygen consumption. *Mol Pharmacol* 19: 184-186, 1981

Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Colavitti R, Palazzotti B, Borrello S, Galeotti T: Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res* 60: 4654-4660, 2000

Park D: Peroxyl and alcoxyl radicals cause DNA base modifications. *Cancer Lett* 28: 1235-1240, 1992

Petit JM, Huet O, Gallet PF, Maftah A, Ratinaud MH, Julien R: Direct analysis and significance of cardiolipin transverse distribution in mitochondrial inner membranes. *Eur J Biochem* 220: 871-879, 1994

Pillar TM, Seitz HJ: Oxidative stress response induced in rat primary hepatocyte monolayers by mechanical removal of adherent cells. *Cell Tissue Res* 295: 363-367, 1999

Piper HM, Volz A: Adult ventricular heart muscle cells. In: Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research Piper HM (ed). Springer Verlag, Heidelberg: 159-177, 1990

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis. Nature 389: 300-305, 1997

Pommier Y, Schwartz RE, Zwellung LA, Kohn KW: Effects of DNA intercalating agents on topoisomerase II induced DNA strand cleavage in isolated mammalian cell nuclei. Cancer Res 24: 6406-6410, 1985

Portakal O, Özkaya Ö, Inal ME, Bozan B, Kosan M, Sayek I: Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. Clin Biochem 33: 279-284, 2000

Powis G: Free radical formation by antitumor quinones. Free Radic Biol Med 6: 63-101, 1989

Praga C, Beretta G, Vigo PL, Lenaz GR, Pollini C, Bonadonna G, Canetta R, et al: Adriamycin cardiotoxicity: A survey of 1273 patients. Cancer Treat Rep 63: 827-834, 1979

Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE: Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: Implications for cardiotoxicity. Cancer Res 48: 4766-4769, 1988

Reinhart PH, Taylor WM, Bygrave FL: Calcium ion fluxes induced by the action of  $\alpha$ -adrenergic agonists in perfused rat liver. Biochem J 208: 619-630, 1982

Revis NW, Marusic N: Effects of doxorubicin and its aglycone metabolite on calcium sequestration by rabbit heart, liver, and kidney mitochondria. Life Sci 25: 1055-1063, 1979

Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlabach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M: Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271: 67-74, 1995

Ripple MO, Henry WF: Prooxidant antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89: 40-48, 1997

Röhrdanz E, Kahl R: Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 24: 27-38, 1998

Röhrdanz E, Obertriffter B, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R: Influence of adriamycin and paraquat on antioxidant enzyme expression in primary rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 74: 231-237, 2000

Rosenoff SH, Brooks E, Bostick F, Young RC: Alterations in DNA synthesis in cardiac tissue induced by adriamycin in vivo – relationship to fatal toxicity. *Biochem Pharmacol* 24: 1898-1901, 1975

Safrit JT, Bonavida B: Sensitivity of resistant human tumour cell lines to tumor necrosis factor and adriamycin used in combination: correlation between down-regulation of tumor necrosis factor-messenger RNA induction and overcoming. *Cancer Res* 52: 6630-6637, 1992

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 7.39-7.52, 1989

Santostasi G, Kutty RK, Krishna G: Increased toxicity of anthracycline antibiotics induced by calcium entry blockers in cultured cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 108: 140-149, 1991

Sarvazyan NA, Askari A, Huang WH: Effects of doxorubicin on cardiomyocytes with reduced level of superoxide dismutase. *Life Sci* 57: 1003-1010, 1995

Sarvazyan N: Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol* 271: H2079-H2085, 1996

Sazuka Y, Tanizawa H, Takino Y: Effect of adriamycin on the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in tissues of mice. *Jpn J Cancer Res* 80: 89-94, 1989a

Sazuka Y, Tanizawa H, Takino Y: Effect of adriamycin on DNA, RNA and protein biosyntheses in mouse tissues, in connection with its cardiotoxicity. *Jpn J Cancer Res* 80: 1000-1005, 1989b

Scheulen ME, Kappus H, Nienhaus A, Schmidt CG: Covalent protein binding of reactive adriamycin metabolites in rat liver and rat heart microsomes. *J Cancer Res Clin Oncol* 103: 39-48, 1982

Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA: The role of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* 2: 13-22, 1995

Semenov DE, Lushnikova EL, Nepomnyashchikh LM: Anthracycline-induced cardiomyopathy is manifested in decreased protein synthesis, impaired intracellular regeneration, and non-necrotic death of cardiomyocytes. *Bull Exp Biol Med* 5: 505-510, 2001

Shimpo K, Nagatsu T, Yamada K, Sato T, Niimi H, Shamoto M, Takeuchi T, Umezawa H, Fujita K: Ascorbic acid and adriamycin toxicity. *Am J Clin Nutr* 54: 1298S-1301S, 1991

Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, Mossman BT: Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 266: 24398-24403, 1991

Singal PK, Pierce GN: Adriamycin stimulates low-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding and lipid peroxidation but depresses myocardial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 250: H419-H425, 1986

Singal PK, Deally CMR, Weinberg LE: Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 19: 817-828, 1987

Singal PK, Tong JG: Vitamin E deficiency accentuates adriamycin-induced cardiomyopathy and cell surface changes. *Mol Cell Biochem* 84: 163-171, 1988

Sinha BK, Chignell CF: Binding mode of chemically activated semiquinone free radicals from quinone anticancer agents to DNA. *Chem Biol Interact* 28: 301-308, 1979

Sinha BK, Gregory JL: Role of one-electron and two-electron reduction products of adriamycin and daunomycin in deoxyribonucleic acid binding. *Biochem Pharmacol* 30: 2626-2629, 1981

Sinha BK, Trush MA, Kennedy KA, Mimnaugh EG: Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA. *Cancer Res* 44: 2892-2896, 1984

Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK: Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 89: 2829-2835, 1994

Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK: Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* 91: 10-15, 1995

Slot J, Geuze H, Freeman B, Crapo JD: Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest* 55: 363-371, 1986

Solaini G, Ronca G, Bertelli A: Studies on the effects of anthracyclines on mitochondrial respiration in vitro. *Drugs Exp Clin Res* 11: 115-121, 1985

Solem LE, Henry TR, Wallace KB: Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 129: 214-222, 1994

Solem LE, Heller LJ, Wallace KB: Dose-dependent increase in sensitivity to calcium-induced mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte cell injury by doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1023-1032, 1996

Speth PA, Linssen PC, Boezeman JB, Wessels HM, Haanen C: Cellular and plasma adriamycin concentrations in long-term infusion therapy of leukemia patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 20: 305-310, 1987

Speth PA, Rajimakers RA, Boezeman JB, Linssen PC, de Witte TJ, Wessels HM, Haanen C: *In vivo* cellular adriamycin concentrations related to growth inhibition of normal and leukemic bone marrow cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 667-674, 1988

Steinhertz LJ, Steinhertz PG, Tan CTC, Heller G, Murphy L: Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *J Am Med Assoc* 266: 1672-1677, 1991

Stevens JB, Aitor AP: Induction of superoxide dismutase by oxygen in neonatal rat lung. *J Biol Chem* 252: 3509-3514, 1977

Stuart MJ, de Alarcon PA, Barvinchak MK: Inhibition of adriamycin-induced human platelet lipid peroxidation by vitamin E. *Am J Hematol* 5: 297-303, 1978

Suzuki T, Miyauchi T: A novel pharmacological action of ET-1 to prevent the cytotoxicity of doxorubicin in cardiomyocytes. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280: R1399-R1406, 2001

Svingen BA, Powis G: Pulse radiolysis studies of antitumor quinones: Radical lifetimes, reactivity with oxygen, and one-electron reduction potentials. *Arch Biochem Biophys* 209: 119-126, 1981

Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, Sun Y: Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem* 274: 12061-12066, 1999

Teixeira HD, Schumacher RI, Meneghini R: Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7872-7875, 1998

Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BC, Lin LF: Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Sci* 226: 466-468, 1984

Thayer WS: Adriamycin stimulated superoxide formation in submitochondrial particles. *Chem Biol Interact* 19: 265-278, 1977

Tritton TR, Murphee SA, Sartorelli AC: Adriamycin: a proposal on the specificity of drug action. *Biochem Biophys Res Commun* 84: 802-808, 1978

Vidal RF, Eksborg S, Sundberg M, Carlberg M, Elfsson B, Andersson BS: Doxorubicin- and daunorubicin-induced energy deprivation and nucleotide degradation in isolated cardiomyocytes. *Toxicology* 114: 1-10, 1996

Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL Jr, Von Hoff AL, Rozencweig M, Muggia FM: Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 91: 710-717, 1979

Von Hoff DD, Howser D, Lewis BJ, Holcenberg J, Weiss RB, Young RC: Phase I study of ICRF-187 using a daily for 3 days schedule. *Cancer Treat Rep* 65: 249-252, 1981

Wan XS, Devalaraja MN, St.Clair DK: Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 13: 1127-1136, 1994

Watanabe N, Niitsu Y, Neda H, Sone H, Yamauchi N, Umetsu T, Urushizaki I: Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 76: 1115-1119, 1985

Watanabe N, Yamauchi N, Maeda M, Neda H, Tsuji Y, Okamoto T, Tsuji N, Akiyama S, Sasaki H, Niitsu Y: Recombinant human tumor necrosis factor causes regression in patients with advanced malignancies. *Oncology* 51: 360-365, 1994

Watanabe N, Okamoto T, Tsuji N, Sasaki H, Akiyama S, Kobayashi D, Sato T, Yamauchi N, Niitsu Y: Reversal of tumor necrosis factor resistance in tumor cells by adriamycin via suppression of intracellular resistance factors. *Jpn J Cancer Res* 86: 395-399, 1995

Weisinger RA, Fridovich I: Superoxide dismutase: organelle specificity. *J Biol Chem* 248: 3582-3592, 1973a

Weisinger RA, Fridovich I: Mitochondrial superoxide dismutase: Site of synthesis and mitochondrial localization. *J Biol Chem* 248: 4793-4796, 1973b

Weiss RB, Sarosy G, Clagett-Carr K, Russo M, Leyland-Jones B: Anthracycline analogues: the past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol* 18: 185-197, 1986

Williams LD, Egli M, Gao Q, Bush P, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Frederick CA: Structure of nogalamycin bound to a DNA hexamer. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2225-2229, 1990

Wong CHW, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV: Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58: 923-931, 1989

Working PK, Newman MS, Huang SK, et al.: Pharmacokinetics, biodistribution and therapeutic efficacy of doxorubicin encapsulated in Stealth<sup>®</sup> – liposomes (Doxil<sup>®</sup>). *J Liposome Res* 4: 667-678, 1994

Wortmann JR, Lucas VS, Schuster E, et al.: Sudden death during doxorubicin administration. *Cancer* 44: 1588-1591, 1979

Wu S, Ko YS, Teng MS, Ko YL, Hsu LA, Hsueh C, Chou YY, Liew CC, Lee YS: Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1595-1607, 2002

Yamaguchi S, Sakurada S, Nagumo M: Role of intracellular SOD in protecting human leukemic and cancer cells against superoxide and radiation. *Free Radic Biol Med* 17: 389-395, 1994

Yamaguchi T, Terakado M, Horio F, Aoki K, Tanaka M, Nakajima H: Role of bilirubin as an antioxidant in an ischemia-reperfusion of rat liver and induction of heme oxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 129-135, 1996

Yamashita N, Hoshida S, Nishida M, Igarashi J, Taniguchi N, Tada M, Kuzuya T, Hori M: Heat shock-induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia-reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1805-1813, 1997

Yamauchi N, Watanabe N, Maeda M, Okamoto T, Sasaki H, Tsuji N, Tsuji Y, Umeno H, Akiyama S, Niitsu Y: Mechanism of synergistic cytotoxic effect between tumor necrosis factor and hyperthermia. *Jpn J Cancer Res* 83: 540-545, 1992

Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK: The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 98: 1253-1260, 1996

Yen HC, Oberley TD, Gairola CG, Szewda LI, St.Clair DK: Manganese superoxide dismutase protects mitochondrial complex I against adriamycin-induced cardiomyopathy in transgenic mice. *Arch Biochem Biophys* 362: 59-66, 1999

Yeung TK, Jaenke RS, Wilding D, Creighton AM, Hopewell JW: The protective activity of ICRF-187 against doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 58-64, 1992

Yin X, Wu H, Chen Y, Kang YJ: Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem Pharmacol* 56: 87-93, 1998

Yoshioka T, Homma T, Meyrick B, Takeda M, Moore-Jarrett T, Kon V, Ichikawa I: Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney Int* 46: 405-413, 1994

Young RC, Ozols RF, Myers CE: The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl J Med* 305: 139-153, 1981

Zähringer J, Kandolf R, Raum W: Decrease of myocardial mRNA in adriamycin-treated rats. *FEBS Lett* 123: 169-172, 1981

Zähringer J: Gen-Expression und Protein-Synthese im normalen Herzmuskel und bei der Adriamycin-Kardiomyopathie. *Fortschr Med* 101: 805-807, 1983

Zhang J, Clark JR, Herman EH, Ferrans VJ: Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1931-1943, 1996

Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, Yan T, Domann FE, St.Clair DK: Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells. *Cell Growth Differ* 7: 1175-1186, 1996

Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St.Clair DK: Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene* 14: 481-490, 1997

Zhou S, Heller LJ, Wallace KB: Interference with calcium-dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 175: 60-67, 2001

Zunino F, Gambetta R, Di Marco A, Zaccara A: Interaction of daunomycin and its derivatives with DNA. *Biochim Biophys Acta* 277: 489-498, 1972

Zunino F, Capranico G: DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* 5: 307-317, 1990

Zweier JL: Reduction of O<sub>2</sub> bei iron-adriamycin. *J Biol Chem* 259: 6056-6058, 1984

Zyad A, Bénard J, Tursz T, Clarke R, Chouaib S: Resistance to TNF- $\alpha$  and adriamycin in the human breast cancer MCF-7 cell line: relationship to MDR1, MnSOD, and TNF gene expression. *Cancer Res* 54: 825-831, 1994

## **7. Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abl	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog
ADR	Adriamycin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
ANOVA	Analysis of variance
ANT-1	Adenin-Nukleotid-Translokator-1
AOE	Antioxidative Enzyme
AP-1	Aktivator-Protein-1
ATP	Adenosin-triphosphat
BNP	Brain natriuretic peptide
BRCA	Breast cancer
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAT	Katalase
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie

---

CK	Kreatinkinase
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxid Dismutase
dATP	Desoxyadenosin-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-triphosphat
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidin-triphosphat
e <sup>-</sup>	Elektron
EcoRI	Escherichia coli, Stamm RI (> Restriktionsendonuklease)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
enTNF	Endogener Tumornekrosefaktor
ESR	Elektronenspinresonanz
et al.	und andere
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
Fe	Eisen
FeSOD	Eisen-Superoxid Dismutase
g	Gravitationsbeschleunigung oder Gramm
G	Guanin
GPX	Glutathion Peroxidase

---

GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiert)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
Id	Inhibitor der DNA-Bindung
i.p.	Intraperitoneal
IU	International Unit
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Kontrolle
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Kaliumdisulfit
l	Liter
M	Mol
MBq	Megabecquerel
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm

---

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmol	Millimol
MnSOD	Mangan Superoxid Dismutase
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MT	Metallothionein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid
myc	Myelocytomatose
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Wasserstoff
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Wasserstoff
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat
NF-κB	Nuklearer Faktor κB
ng	Nanogramm

---

nm	Nanometer
NO <sup>·</sup>	Stickstoffmonoxid
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (non small cell lung cancer)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxidanionradikal
OD	Optische Dichte
OH <sup>·</sup>	Hydroxylradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
ras	Rat sarcoma
RB1	Retinoblastom
R-CHOP	Schema aus Rituximab, Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin und Prednison
RISP	Reiske iron-sulfur protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
18/28S	Untereinheiten nach Svedberg
s	Sekunde oder Standardabweichung
SDS	Na-Dodecylsulfat
SEM	Standard error of mean
SOD	Superoxid Dismutase
SSC	Standard-Saline-Citrat

---

T	Thymin
TBq	Terabecquerel
TBS	Thiobarbitursäure
TE	Tris-EDTA
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNT	Troponin T
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
U	Unit
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
var	Varius
vs	Versus
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
w/v	Masse pro Volumeneinheit
x	Arithmetischer Mittelwert
$\mu$ Ci	Mikro-Curie
$\mu$ g	Mikrogramm
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

$\mu\text{M}$	Mikromol
z.B.	zum Beispiel
$\emptyset$	Durchmesser
%	Prozent

## **8. Anhang**

### **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt

**Frau Prof. Dr. R. Kahl**, die mir ihr Labor zur Verfügung gestellt hat und mich mit wertvollen Ratschlägen, viel Geduld und einem Blick für das Wesentliche bis zur Vollendung der Arbeit begleitet hat,

**Herrn Prof. Dr. G. Kojda**, der mir die Doktorarbeit ermöglicht hat und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat,

**Frau PD Dr. E. Röhrdanz**, die mich in die Laborarbeit eingeführt hat und für alles nicht nur ein offenes Ohr, sondern auch die nötige Portion Humor bewiesen hatte,

**Frau S. Ohler**, die mir bei der praktischen Unterweisung unmittelbar und sehr geduldig zur Seite gestanden hat,

**Frau Dr. Q-H Tran-Thi**, die mir bei der Aufarbeitung der MDA-Proben behilflich war,

**Herrn Dr. D. Hafner** für seine Ratschläge bei der statistischen Seite der Arbeit,

**Herrn Dr. Schlüter** für seine Unterstützung.

Weiterhin gebührt der Dank sämtlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Institute für Toxikologie und Pharmakologie, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für ihren Glauben an mich.

**Lebenslauf von Johanna Katharina Sledziona**Persönliches

Geburtsdatum	26.05.1977
Eltern	Sofie Sledziona, Ärztin Dr. med. Andreas Sledziona, Arzt
Geschwister	Michael Sledziona, Polizeibeamter

Ausbildung

1983-1987	Kath. Grundschule, Mönchengladbach
1987- 1995	Gymnasium an der Gartenstraße, Mönchengladbach
1995	Allgemeine Hochschulreife
1995	Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1997	Ärztliche Vorprüfung
1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf

seit 04/2003	Ärztin ( Innere Medizin )
--------------	---------------------------

## **HEMMUNG DER EXPRESSION DER MANGAN SUPEROXID DISMUTASE DURCH ADRIAMYCIN IN KARDIOMYOZYTEN DER ERWACHSENEN RATTE**

(von Johanna Katharina Sledziona)

Adriamycin wird als potentes Chemotherapeutikum bei der Therapie zahlreicher Krebserkrankungen erfolgreich angewandt. Die Dosis wird jedoch limitiert durch die dosisabhängige Kardiotoxizität, die auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Diskutiert werden sowohl die Auswirkungen freier Radikale, die bei der enzymatischen Aktivierung von Adriamycin entstehen, als auch die Interkalation in die DNA, was zu Veränderungen auf transkriptionaler Ebene führt. In der vorliegenden Arbeit werden die Effekte von Adriamycin auf die Genexpression der Mangan Superoxid Dismutase in Kardiomyozyten der Ratte untersucht. Zeitgleich erfolgen die Bestimmung der Viabilität über die Produktion von Formazan sowie die Untersuchung im Hinblick auf das Auftreten der Lipidperoxidation per Malondialdehyd.

Für die 24stündige Behandlung der Kardiomyozyten wurden verschiedene Konzentrationen des Anthrazyklins verwendet: u.a. 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 130  $\mu\text{M}$ . Die niedrigste Konzentration spiegelt die therapeutisch erreichbare Konzentration wider. Sie führt weder zu einer erhöhten Zytotoxizität noch zur Lipidperoxidation. Zytotoxische Effekte ließen sich erst bei 50  $\mu\text{M}$  beobachten, über 50 % der Kardiomyozyten starben bei 150  $\mu\text{M}$ . Für die Lipidperoxidation gab es weiterhin keinen Anhalt.

Die Genexpression dagegen zeigte einen frühzeitig auftretenden Abfall auf 63 %, beginnend bei der niedrigsten eingesetzten Dosis mit Fortsetzung des Effekts auch bei den deutlich höheren Dosen. Dabei sind die einzelnen Transkripte (bei der Ratte sind fünf bekannt) unterschiedlich stark von der Reduktion betroffen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Adriamycin die Genexpression der antioxidativ wirkenden Mangan Superoxid Dismutase reduziert, und zwar in Dosierungen, die weder Zytotoxizität noch Lipidperoxidation verursachen. Da die Lipidperoxidation ein Hinweis auf das Vorhandensein von oxidativem Stress ist, ist nach diesen Untersuchungsergebnissen eher die Interkalation in die DNA als die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies der Grund für die Herunterregulation der Mangan Superoxid Dismutase durch Adriamycin.