

**Kardiotoxische Effekte von Chemotherapeutika –  
Evaluierung eines impedanzbasierten *in vitro*  
Testsystems und Bestimmung der Kardiotoxizität  
niedermolekularer Kinaseinhibitoren**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Bettina Tanitha Baumgarten

aus Buchholz i. d. N.

April 2021

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für analytische Wissenschaften – ISAS e.V. – in der Arbeitsgruppe für kardiovaskuläre Pharmakologie durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Kristina Lorenz

2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Hermann

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Jürgen Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2021



**DuEPublico**  
Duisburg-Essen Publications online



UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN  
*Offen im Denken*



ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/74744  
**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20240408-090558-0

Alle Rechte vorbehalten.

## Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten führte die stetige Weiterentwicklung von Chemotherapeutika zu einem signifikanten Anstieg der Überlebensraten von Krebserkrankungen. Ein zunehmend relevantes Problem bilden jedoch die kardiotoxischen Nebenwirkungen vieler Chemotherapeutika. Akute Einflüsse auf die Kontraktion des Herzens erschweren den Einsatz vieler Wirkstoffe und strukturelle Schädigungen der Herzzellen können selbst Jahre nach einer erfolgreichen Behandlung zu verringerter Herzfunktion bis hin zu Herzversagen führen. Kardiotoxische Effekte werden häufig erst in späteren klinischen Studien oder gar nach der Zulassung eines Medikaments offensichtlich. Ein Mangel an alternativen Therapien führt häufig dazu, dass kardiotoxische Substanzen dennoch in der Klinik verwendet werden. Ein Mangel an präklinischen Methoden zur Untersuchung von kardiotoxischen Effekten ist eines der zugrundeliegenden Probleme.

In dieser Arbeit haben wir einen methodischen Ablauf etabliert, um die kardiotoxischen Effekte von Substanzen *in vitro* zu untersuchen und charakterisierten hiermit die kardiotoxischen Effekte einer Reihe niedermolekularer Kinaseinhibitoren, die sich zurzeit in präklinischen und klinischen Studien zur Tumorbehandlung befinden. Bei der hier vorgestellten Methode handelt es sich um einen impedanzbasierten Assay zur Bestimmung verschiedener kardialer Zellparameter in neonatalen Mauskardiomyozyten, i.e. das Zellüberleben, die kontraktile Funktion der Zellen sowie das Auftreten von Arrhythmien. Wir konnten durch Testung bekannter kardiotoxischer Medikamente zeigen, dass der vorgestellte impedanzbasierte Assay eine hohe Übereinstimmung zwischen den erhobenen *in vitro* Daten und den klinischen Nebenwirkungen aufwies. Die Anwendung des Assays ermöglichte die Charakterisierung der strukturellen und funktionellen Kardiotoxizität neuer niedermolekularer Inhibitoren der Proteinkinase B (AKT/PKB) oder der extrazellulär-Signal regulierten Kinase 1 und 2 (ERK1/2).

Obwohl dieser Impedanzassay noch Raum für Optimierungen lässt, bietet er eine Möglichkeit der *in vitro* Bestimmung von kardiotoxischen Effekten, wie sie bislang nicht standardmäßig verwendet wird. Dies könnte enorm zur Früherkennung von kardiotoxischen Effekten von Chemotherapeutika beitragen und akute und chronische Nebenwirkungen in Krebstherapien reduzieren.

## Abstract

In the past few decades, the steady advancement of chemotherapeutic agents has led to a significant increase in cancer survival rates. However, the cardiotoxic side effects of many chemotherapeutic agents are an increasingly relevant problem. Acute influences on the contraction of the heart make the use of many substances more difficult and structural damage to the heart cells can lead to reduced heart function and even heart failure, even years after successful cancer treatment. Often cardiotoxic effects only become apparent in late-stage clinical studies or even after the approval of a drug. However, a lack of alternative therapies necessitates the use of cardiotoxic substances in the clinic. A lack of preclinical methods for studying cardiotoxic effects is one of the underlying problems.

In this thesis, we established a methodological procedure to investigate the cardiotoxic effects of substances *in vitro* and characterised the cardiotoxic effects of a number of small-molecule kinase inhibitors that are currently in preclinical and clinical studies on tumour treatment. The method presented here is an impedance-based assay for the determination of various cardiac cell parameters in neonatal mouse cardiomyocytes. We were able to show that the impedance-based assay presented showed a high level of agreement between the collected *in vitro* data and the clinical side effects. The application of the assay made it possible to characterise the structural and functional cardiotoxicity of new small molecule Inhibitors of the protein kinase B (AKT/PKB) or the extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2).

Although this impedance assay still leaves room for optimisation, it offers a possibility of *in vitro* characterisation of cardiotoxic effects, which could set a new standard. This could make an enormous contribution to the recognition of cardiotoxic effects of chemotherapeutic drugs and the reduction of acute and chronic side effects in cancer therapies.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	X
Tabellenverzeichnis .....	XII
1 Einleitung .....	13
1.1 Kardiotoxizität in der Chemotherapie .....	14
1.1.1 Für die Krebstherapie zugelassene Wirkstoffe .....	17
1.2 Die PI3K/AKT Kaskade .....	19
1.2.1 AKT.....	20
1.2.2 Nachgeschaltete Zielproteine von AKT.....	21
1.2.3 Inaktivierung der PI3K/AKT/mTORC1 Kaskade.....	23
1.2.4 Die Rolle der PI3K/AKT/mTORC1 Kaskade in Tumorerkrankungen.....	24
1.2.5 AKT-Inhibitoren .....	26
1.3 Die MAP-Kinase Signalkaskade.....	29
1.3.1 Raf/MEK/ERK Signalweg .....	30
1.3.2 Die Rolle von Ras/Raf/MEK/ERK in Tumorerkrankungen .....	33
1.3.3 MEK Inhibitoren .....	34
1.3.4 ERK-Inhibitoren.....	36
1.4 PI3K/AKT und Raf/MEK/ERK im Herzen .....	40
1.5 Präklinische <i>in vitro</i> Testverfahren für Kardiotoxizität .....	41
1.5.1 Impedanz-Messverfahren als <i>in vitro</i> Früherkennung für Kardiotoxizität.....	43
1.6 Zielsetzung .....	47
2 Material .....	48
2.1 Chemikalien .....	48
2.2 Inhibitoren .....	49
2.3 Kits .....	50

2.4	Verbrauchsmaterialien .....	50
2.5	Reagenzien für die Zellkultur.....	51
2.6	Antikörper .....	51
2.7	Biologisches Material.....	51
2.7.1	Eukaryotische Zellen.....	51
2.7.2	Tiere .....	52
2.8	Geräte .....	52
2.9	Programme .....	52
3	Methoden.....	53
3.1	Zellbiologische Methoden.....	53
3.1.1	Präparation von neonatalen Mauskardiomyozyten .....	53
3.1.2	Kultivierung von H9c2 Zellen .....	54
3.1.3	Kryokonservierung und Auftauen von H9c2 Zellen .....	54
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl .....	55
3.2	Proteinbiochemische Methoden .....	55
3.2.1	Herstellung von Zelllysaten aus NMCM .....	55
3.2.2	SDS-PAGE.....	57
3.2.3	Western Blot.....	58
3.2.4	Proteindetektion mit Chemilumineszenz .....	59
3.2.5	Erneute Analyse membrangebundener Proteine .....	60
3.3	Weitere Methoden .....	60
3.3.1	Phalloidin Assay.....	60
3.3.2	MTT-Assay .....	61
3.3.3	ATP-Assay .....	62
3.3.4	Laktat-Assay .....	63
3.3.5	Konfluenz-Assay .....	64
3.3.6	Impedanzmessung mit dem CardioExcyte96 von Nanion .....	64

3.4	Statistik.....	65
4	Ergebnisse .....	66
4.1	Evaluierung des Impedanz-Assays zur Bestimmung von Kardiotoxizität.....	66
4.1.1	Auswahl der Referenzsubstanzen.....	66
4.1.2	Identifizierung kardiotoxischer Effekte der Referenzsubstanzen über die Base-Impedanz.....	69
4.1.3	Vergleich der Base-Impedanz mit gängigen <i>in vitro</i> Zytotoxizitäts-Assays....	71
4.1.4	Identifizierung der funktionellen Toxizität der Referenzsubstanzen .....	75
4.1.5	Validierung des Impedanz-Assays für die Erkennung von pro-arrhythmischen Substanzen.....	78
4.2	Charakterisierung der Kardiotoxizität niedermolekularer AKT-Inhibitoren ...	82
4.2.1	Ableitung der Test-Konzentrationen und Bestimmung der Inhibierungseffizienz der AKT-Inhibitoren in Kardiomyozyten .....	82
4.2.2	Die allosterischen AKT-Inhibitoren verursachen starke Zellschädigung .....	86
4.2.3	Identifizierung funktioneller Toxizität der AKT-Inhibitoren auf die kontraktile Funktion von NMCM.....	87
4.2.4	Borussertib und Miransertib verursachen Arrhythmien in NMCM.....	89
4.2.5	AKT-Inhibitoren verhindern hypertrophes Zellwachstum.....	90
4.2.6	Der Einfluss von Isoproterenol auf die kardiotoxische Wirkung der AKT-Inhibitoren .....	91
4.3	Charakterisierung der Kardiotoxizität niedermolekularer ERK-Inhibitoren ...	95
4.3.1	Ableitung der Test-Konzentrationen und Bestimmung der Inhibierungseffizienz der ERK-Inhibitoren in Kardiomyozyten.....	95
4.3.2	ERK-Inhibitoren verursachen konzentrationsabhängige Zellschädigung in NMCM .....	96
4.3.3	DEL-22379 und MK-8353 beeinträchtigen die Kontraktion der Zellen.....	98
4.3.4	DEL-22379 verursacht Arrhythmien bei hohen Konzentrationen .....	99
5	Diskussion .....	101

5.1	Kardiotoxizität in der Krebstherapie .....	101
5.2	Evaluierung des Impedanzassays zur Vorhersage kardiotoxischer Effekte von Chemotherapeutika .....	102
5.2.1	Evaluierung der Vorhersagegenauigkeit der klinischen Nebenwirkungen der Referenzsubstanzen durch das Impedanzassay .....	103
5.2.2	Vergleich weiterer Assays mit den Impedanz- und klinischen Daten. ....	105
5.2.3	Grenzen und Probleme des Impedanzassays.....	107
5.2.4	Mögliche Erweiterungen und Verbesserungen des Impedanzassays.....	108
5.2.5	Zusammenfassung der Evaluierung .....	109
5.3	Charakterisierung neuer AKT-Inhibitoren .....	111
5.3.1	Borussertib .....	113
5.3.2	Ipatasertib (GDC-0068) .....	115
5.3.3	Capivasertib (AZD-5363) .....	115
5.3.4	MK-2206 .....	117
5.3.5	Miransertib (ARQ 092) .....	118
5.3.6	Stimulation der Herzfunktion mit dem $\beta$ -AR Agonisten Isoproterenol.....	119
5.3.7	AKT-Inhibitoren verhindern Stimulus-induziertes hypertrophes Zellwachstum im Herzen .....	121
5.4	Charakterisierung neuer ERK-Inhibitoren .....	122
5.4.1	DEL-22379.....	123
5.4.2	Sch772984 und MK-8353 .....	124
5.4.3	Ravoxertinib (GDC-0994), Ulixertinib (BVD-523) und Ly-3214996.....	125
5.5	Zusammenfassung und Ausblick .....	126
6	Literaturverzeichnis.....	128
7	Anhang .....	153



## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
4EBP1	4E Bindendes Protein
Ang I	Angiotensin 1
Ang II	Angiotensin 2
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	Angiotensin 2 Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosin Triphosphat
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bcl-2	B-Zell Lymphom 2
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovines Rinderserum
CiPA	Comprehensive in vitro Pro-arrhythmia Assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUSP	Dualspezifische Phosphatase
EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat Dihydrat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EKG	Echokardiogramm
ELK	ETS-like Protein
EMA	Europäische Arzneimittel Agentur
ERK	Extrazellular-Signal Regulated Kinase
FCS	Fetales Kalbsserum
FDA	Food and Drug Administration
FOXO1	Forkhead-Box-Protein O1
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRB2	Wachstumsfaktor gebundenes Protein 2
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
Hsp27	Hitzeschock Protein 27
Hsp90	Hitzeschock Protein 90
ICH	International Council for Harmonisation

IGF	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor
INT	Iodnitrotetrazoliumchlorid
ISO	Isoproterenol
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KIM	Kinase interaktionsmotiv
LDH	L-Lactic Dehydrogenase
LVEF	Linksventrikuläres Auswurfvolumen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP2K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAP3K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MEA	Multi-Elektroden Array
MEK	MAPK/ERK Kinase
MI	Miokardinfarkt
MKP	MAPK-Phosphatase
MPMS	Methoxyphenazin Methosulfat
MSK1	Mitogen- und Stressaktivierte Kinase 1
mTORC1	Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1
mTORC2	Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2
NAD	$\beta$ -Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NEL	Nukleare Exportsequenz
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NMCM	Neonatale Mauskardiomyozyten
P70S6K	p70 S6 Kinase
PE	Phenylephrin
PHLPP	PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatases
PKA/B/C	Proteinkinase A/B/C
PLC	Phospholipase C
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PRAS40	Prolinreiches AKT1 Substrat 1
PTEN	Phosphatase- und Tensinhomolog
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase

SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Serca2a	Calcium-ATPase des sarko- und endoplasmatischen Retikulums
SOS	Son of sevenless
TdP	Torsades de points
TSC1	Tuberous Sclerosis Complex 1
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
PDGF	Platelet-derived growth factors
PDK1	Phosphoinositol-abhängigen Kinase-1
PFA	Paraformaldehyd
PH (Domäne)	Pleckstrin-Homologie (Domäne)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PMDA Japan	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency Japan
PMS	Phenazin-Methodulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	Wold Health organization

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Schema der kardiotoxischen Nebenwirkungen verschiedener Krebstherapeutika-Klassen (nach Lenneman et al. 2016 [15]).....	16
<b>Abbildung 2</b> Strukturen der von der FDA zugelassenen Wirkstoffe Doxorubicin und Sorafenib. ....	19
<b>Abbildung 3</b> Der PI3K/AKT/mTOR Signalweg.....	24
<b>Abbildung 4</b> Strukturen der verschiedenen AKT-Inhibitoren. ....	29
<b>Abbildung 5</b> Die RAF/MEK/ERK Signalkaskade.....	32
<b>Abbildung 6</b> Strukturen der verschiedenen MEK-Inhibitoren.....	35
<b>Abbildung 7</b> Schematische Darstellung der Lokalisation der verschiedenen Wirkstoffe in der Raf/MEK/ERK-Kaskade und der PI3K/AKT/mTORC1-Kaskade .....	36
<b>Abbildung 8</b> Strukturen der verschiedenen ERK-Inhibitoren.....	40
<b>Abbildung 9</b> Schematische Darstellung der Impedanzmessung in einer voll ausgebildeten Zellmonoschicht.....	45
<b>Abbildung 10</b> Chemische Struktur von gelbem Tetrazoliumbromid und lila Formazan.....	62
<b>Abbildung 11</b> Einfluss der Wirkstoffe auf die Base-Impedanz .....	70
<b>Abbildung 12</b> Verschiedene <i>in vitro</i> Assays zur Bestimmung von Zellüberleben und Metabolismus in H9c2 Zellen .....	73
<b>Abbildung 13</b> Die Negativkontrollsubstanzen Valsartan und Ramipril in verschiedenen <i>in vitro</i> Assays.....	74
<b>Abbildung 14</b> Die Impedanzmessung gibt Aufschluss über das Schlagmuster der NMCM nach einstündiger Behandlung mit verschiedenen Referenzsubstanzen .....	77
<b>Abbildung 15</b> Einfluss der Substanzen auf den Schlagrhythmus der NMCM.....	79
<b>Abbildung 16</b> Konzentrationsreihe von Borussertib zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit der Kardiotoxizität.....	84
<b>Abbildung 17</b> Impedanzbasierte Messung des Zellüberlebens nach Inkubation mit den AKT-Inhibitoren.....	86
<b>Abbildung 18</b> Die Impedanzmessung zur Untersuchung des Schlagmusters der NMCM nach einstündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der AKT-Inhibitoren .....	88

<b>Abbildung 19</b> Die Impedanzmessung gibt Aufschluss über den Schlagrhythmus und somit über das arrhythmische Potential der Substanzen in den NMCM nach 1h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der AKT-Inhibitoren .....	89
<b>Abbildung 20</b> Phalloidin Assay zur Untersuchung von Zellgrößen von NMCM nach Inkubation mit AKT-Inhibitoren für 24 h .....	91
<b>Abbildung 21</b> Einfluss der AKT-Inhibitoren auf das Zellüberleben nach Stimulation mit Isoproterenol (ISO) .....	92
<b>Abbildung 22</b> Einfluss der AKT-Inhibitoren auf das Schlagverhalten der NMCM nach Inhibitorzugabe und Stimulation mit Isoproterenol (ISO) .....	93
<b>Abbildung 23</b> Einfluss der AKT-Inhibitoren auf den Schlagrhythmus der NMCM nach Stimulation mit Isoproterenol (ISO) .....	94
<b>Abbildung 24</b> Einfluss der ERK-Inhibitoren auf das Zellüberleben.....	97
<b>Abbildung 25</b> Die Impedanzmessung gibt Aufschluss über das Schlagmuster der NMCM nach einstündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der ERK-Inhibitoren .....	99
<b>Abbildung 26</b> Die Impedanzmessung gibt Aufschluss über den Schlagrhythmus und somit über das arrhythmische Potential der Substanzen in den NMCM nach 1 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der ERK-Inhibitoren.....	100

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Daten und eingesetzte Konzentrationen der Referenzsubstanzen .....	68
<b>Tabelle 2</b> Klinische kardiale Nebenwirkungen der Referenzsubstanzen entnommen aus der Zusammenfassung der Merkmale des jeweiligen Arzneimittels [33,125,136,200–202].	68
<b>Tabelle 3</b> Konzentrationen der AKT-Inhibitoren .....	85
<b>Tabelle 4</b> Kardiale IC <sub>50</sub> Werte der Phosphorylierungsinhibierung von AKT und PRAS40 durch die AKT-Inhibitoren in H9c2 Zellen (Durchgeführt von Stefan Schraml) .....	85
<b>Tabelle 5</b> Konzentrationen der ERK-Inhibitoren für die Impedanzmessung .....	96
<b>Tabelle 6</b> IC <sub>50</sub> Werte der Phosphorylierungshemmung von ERK und P90RSK durch die Erk-Inhibitoren in H9c2 Zellen (Durchgeführt von Stefan Schraml) .....	96

# 1 Einleitung

In Deutschland stellten Krebserkrankungen in den letzten 10 Jahren die zweithäufigste Todesursache dar, nach kardiovaskulären Krankheiten (Statistisches Bundesamt 2020). Als Krebserkrankungen bezeichnet man das unkontrollierte Teilen und Wachstum von Zellen. Bösartige Tumore können nicht nur das umliegende Gewebe schädigen, sondern sich durch Besiedelung von gesundem Gewebe im ganzen Körper ausbreiten. Obwohl die meisten Tumorerkrankungen im Volksmund gleichermaßen als Krebs bezeichnet werden, können die biologischen Ursachen und deren biochemischen Auswirkungen auf das Gewebe und den Körper sehr unterschiedlich sein. Verschiedene Mutationen können in gesunden Zellen zu einer Dysregulation des Zellzyklus, des Zellmetabolismus und des Zellüberlebens führen und so unkontrolliertes Zellwachstum bedingen [1–3]. Durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung ist die Inzidenz von Krebserkrankungen stark gestiegen und seit vielen Jahren unter den häufigsten Todesursachen in Ländern der ersten Welt. Dadurch ist die Erforschung von Krebserkrankungen sowie die Entwicklung von Therapieoptionen von wachsender Bedeutung und das wissenschaftliche Verständnis weit vorangeschritten. Operative Eingriffe, Chemotherapie und Strahlentherapie haben die Überlebenschancen für Betroffene in den letzten 25 Jahren nahezu verdoppelt (WHO, [4]).

Abhängig von der Lokalisation des Tumors, der Art der Mutation und der medizinischen Vorgeschichte des Patienten kann es schwierig sein, eine passende Behandlungsart zu finden. Genetische Risikofaktoren, Komorbiditäten sowie verschiedene Formen von Medikamenten Resistenzen können die Wahl eines geeigneten Medikaments zusätzlich erschweren. Um die individuellen Limitationen in der Behandlung von Tumoren so gut es geht zu umgehen, ist es notwendig, eine möglichst große Zahl an möglichen Medikamenten zu haben, aus denen man bei Bedarf auswählen kann, daher werden stetig neue Angriffspunkte gefunden und Wirkstoffe zur Bekämpfung von Tumoren entwickelt.

Moderne Behandlungsmöglichkeiten haben jedoch häufig Kurz- und Langzeitnebenwirkungen. Viele Krebstherapien sind bekannt für ihre schweren Nebenwirkungen während und nach der Therapie. Da heute immer mehr Krebspatienten auch langfristig überleben, rücken vor allem Spätfolgen stärker in den Fokus. Leider sind die akuten Nebenwirkungen oft unumgänglich und Langzeitschäden werden ohne zielgenaue Untersuchungen oft viel zu spät erkannt [1].

Um die Entwicklung neuer Therapeutika so effizient wie möglich zu gestalten, sollten Wirkungsweise, Effizienz und Nebenwirkungen möglichst früh zuverlässig evaluiert werden

können. Häufig fehlt es an passenden Modellen zur zuverlässigen Überprüfung von schädlichen Effekten der Substanzen, wodurch viele unerwünschte Wirkungen erst in Tiermodellen, klinischen Studien oder gar erst nach Zulassung des Medikaments erkannt werden. Effiziente präklinische Studien zur Offenlegung von potenziell toxischen Effekten sind rar und bieten häufig nur einen sehr eingeschränkten Blickwinkel in mögliche Toxizität, insbesondere die Kardiotoxizitäten [5–7].

## 1.1 Kardiotoxizität in der Chemotherapie

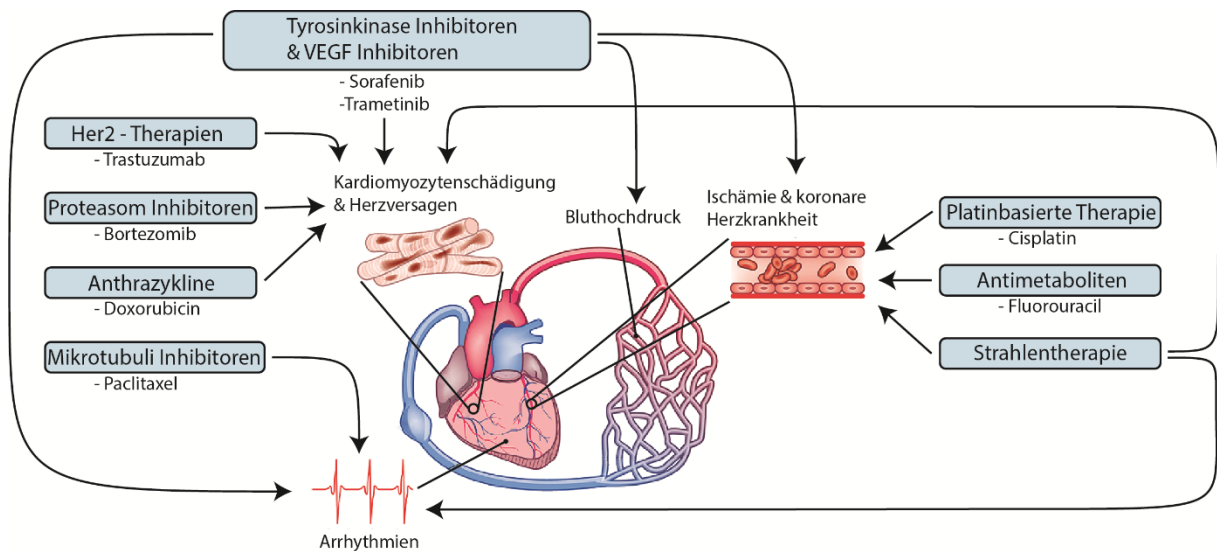
Eine häufige und schwerwiegende Nebenwirkung von Chemotherapeutika ist ihre Kardiotoxizität. Kardiotoxizität beschreibt die pathologische Wirkung einer Substanz auf die Elektrophysiologie, Struktur oder Funktion des Herzens. Hierzu gehören kardiovaskuläre Ereignisse wie Blutdruckveränderungen, Thrombose, elektrokardiologische Veränderungen, Arrhythmien, Myokarditis, Perikarditis, Herzinfarkt, Kardiomyopathie, linksventrikuläre Herzinsuffizienz und kongestive Herzinsuffizienz [8,9]. Kardiotoxizität von Wirkstoffen kann akut (während oder kurz nach der Behandlung), subakut (Tage oder Wochen nach der Behandlung) oder chronisch (Wochen bis Jahre nach der Behandlung) auftreten [10]. In den letzten 70 Jahren waren kardiotoxische Nebenwirkungen von klinisch verwendeten Wirkstoffen mit 20 % die zweithäufigste Ursache für die Annullierung ihrer Medikamentenzulassungen und ihrer Entfernung vom Markt [7,8,11]. Viele der heute zugelassenen Chemotherapeutika können kardiotoxische Nebenwirkungen auslösen. Dies bringt eine Dosislimitierung mit sich, die den Behandlungserfolg einschränken kann. Da viele Krebsarten schwer zu behandeln sind, wird das Risiko, kardiotoxische Therapeutika einzusetzen, häufig akzeptiert, um zumindest die kurzfristige Überlebenschance des Patienten zu verbessern. Allerdings äußern sich diese Nebenwirkungen auf unterschiedliche Arten, von funktionellen Störungen wie Arrhythmien hin zu strukturellen Schäden an den Kardiomyozyten [12,13]. Eine funktionelle Schädigung des Herzens beeinträchtigt oft die Ionenkanäle und somit die Elektrophysiologie oder die Signalweiterleitung innerhalb der Zellen und führt so zu einer Beeinträchtigung der Kontraktionskraft des Muskels. Strukturelle Schäden an den Herzzellen zeigen sich im Absterben von Kardiomyozyten und deren Ersatz durch fibrotisches Gewebe. Da fibrotisches Gewebe im Gegensatz zu funktionalen Herzmuskelzellen nicht kontrahieren kann, nimmt die Schlagfähigkeit des Herzens mit zunehmender Fibrose ab. Diese Art der Schädigung kann lange Zeit asymptomatisch verlaufen. Die Auswirkungen führen schließlich zu Kardiomyopathien,



linksventrikulärem Herzversagen und myokardialen Infarkten [14]. Wo akute kardiotoxische Nebenwirkungen noch ein vertretbares Risiko darstellen, da sie meist schnell erkennbar und durch Abbruch der Behandlung reversibel sind, sind strukturelle Schädigungen des Herzens ein großes Risiko für den Patienten. Die molekularen Ursachen für die verschiedenen toxischen Effekte sind allerdings vielfältig und ohne langwierige Studien mit Patienten oft nicht vorhersehbar. So können toxische Substanzen die Kinase-Signalwege in den Zellen stören, Mitochondrien schädigen, kardiale Ionenkanäle blockieren oder andere lebensrelevante Strukturen angreifen [15,16].

Dass die Kardiotoxizität vieler Chemotherapeutika bekannt ist und geduldet wird, ist häufig an einem Mangel an Alternativen geschuldet. In der Medizinalchemie werden Wirkstoffe selten optimiert, um kardiotoxische Effekte zu reduzieren, da erst aufwändige *in vivo* oder klinische Studien geeignete Daten über die Dositoleranz der Wirkstoffe im Herzen und deren toxische Wirkung auf die kardiale Funktion liefern [16]. Viele Substanzklassen, die aktuell in der Krebstherapie eingesetzt werden, zeigen ein hohes kardiotoxisches Potential, wie zum Beispiel Anthrazykline, Kinaseinhibitoren und platinbasierte Chemotherapeutika (Abb. 1).

Anthrazykline sind eine Antibiotikaklasse, produziert von verschiedenen Arten der bakteriellen Gattung *Streptomyces*. Sie gehören zu den effektivsten Krebstherapeutika und werden seit Jahrzehnten gegen verschiedene Krebsarten wie Lymphome, Leukämie und Brustkrebs eingesetzt. Ihre Verfügbarkeit für Patienten ist jedoch durch ihre kardiotoxische Wirkung beschränkt. Anthrazykline wie Doxorubizin, Mitoxantron und Epirubicin lösen bei bis zu einem Fünftel der Patienten kardiale Kurz- und Langzeitkomplikationen wie linksventrikulärer Dysfunktion bis hin zu Herzversagen aus. Ihre effektive antiproliferative Wirkung vermitteln sie über verschiedene Mechanismen. Sie binden zum einen an die Topoisomerase 2 $\alpha$  und interkalieren in die DNA, was die weitere Nukleinsäuresynthese verhindert. Die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies, die Unterdrückung der Mitochondrienfunktion und die Zerstörung der strukturellen Integrität der Zellmembranen führen zusätzlich zum Absterben der Zellen. Die schnell wachsenden Krebszellen werden durch diese Mechanismen am stärksten beeinträchtigt, allerdings wird auch gesundes Gewebe so geschädigt, was zu starken, oft irreversiblen Nebenwirkungen führt [15,17].



**Abbildung 1** Schema der kardiotoxischen Nebenwirkungen verschiedener Krebstherapeutika-Klassen (nach Lenneman et al. 2016 [15]).

Ein zunehmend untersuchter Ansatzpunkt für Krebstherapien sind die verschiedenen Kinase-Signalwege, da Mutationen in diesen eine der Hauptursachen für die Entstehung von Tumoren sind. Die Inhibierung dieser Signalwege zur Eindämmung des Zellwachstums ist daher eine naheliegende Therapieform. *Multi-Targeted* Tyrosinkinase-Inhibitoren waren die ersten Kinase-Inhibitoren, die ihren Weg in die Klinik gefunden haben. Die ersten dieser Inhibitoren waren Antikörper basierte Inhibitoren, die den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) blockierten. Später kamen niedermolekulare Verbindungen hinzu, welche auf unterschiedliche Weise an die Inhibitoren binden können. Allosterische Inhibitoren können Kinasen an einer allosterischen, d.h. nicht für die Enzymaktivität relevanten Stellen, binden und eine Konformationsänderung zur aktiven Form verhindern oder eine Konformationsänderung zu einer inaktiven Form erzwingen, um die Kinaseaktivität ihrer Ziele zu unterdrücken [18]. ATP-kompetitive Inhibitoren binden in der ATP-Bindestelle der Kinase. Man unterscheidet zwischen Typ 1 und Typ 2 Inhibitoren. Typ 1 Inhibitoren binden in der ATP-Bindetasche der aktiven Form der Kinase und verhindern die Bindung von ATP. Typ 2 Inhibitoren binden die inaktive Form und stabilisieren diese. Da ATP-Bindungsstellen über viele Kinasen hinweg sehr homolog sind, besitzen ATP-kompetitive Inhibitoren häufiger unerwünschte *off-target* Effekte und klinischen Nebenwirkungen [18]. Kovalente Inhibitoren binden im Gegensatz zu nicht-kovalenten Inhibitoren irreversibel an ihr Zielprotein und können so ihre Kinasen über einen langen Zeitraum inhibieren. Die Inhibierung wird erst durch die Translation neuer Proteine

revidiert. Obwohl die absolute Unterdrückung von Enzymen potentiell positiv in der Bekämpfung von Tumorerkrankungen sein kann, werden höhere *on-target* Toxizitäten mit kovalenten Inhibitoren in Verbindung gebracht [19]. Einige Inhibitoren können auch spezifische Funktionen wie Dimerisierung, Translokation oder Protein-Protein Interaktion beeinflussen und ihre Zielproteine so inhibieren.

Die ersten niedermolekularen Inhibitoren konnten VEGF und andere Rezeptor- und nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen inhibieren [15]. Da VEGF eine wichtige Rolle in Angiogenese, Zellüberleben, Vasodilatation und kardialer Kontraktion spielt, ist es nicht verwunderlich, dass seine Inhibierung zu *on-target* Nebenwirkungen führt, wie Bluthochdruck, Thromboembolien und kardialer Dysfunktion. Ein häufiges Ziel von niedermolekularen Chemotherapeutika sind auch die zentralen Signalkaskaden PI3K/AKT und die MAPK-Signalkaskade. Da diese Signalwege eine Reihe an Zellfunktionen beeinflussen wie Proliferation, Apoptose und Metabolismus, sind sie häufig in die Entstehung von Krebs involviert und bilden ein vielversprechendes *Target*. Die weitgefächerten Funktionen dieser Signalkaskaden führen allerdings schnell zu unerwünschten Nebeneffekten; außerdem führt die schlechte Selektivität von niedermolekularen Inhibitoren zusätzlich zu einer Reihe von *off-target* Effekten, die ebenfalls zu ihrer Kardiotoxizität beitragen [15,20].

### 1.1.1 Für die Krebstherapie zugelassene Wirkstoffe

#### Doxorubizin

Doxorubizin ist ein Anthrazyklin und ein potentes Chemotherapeutikum, das zur Behandlung einer Vielzahl von Krebserkrankungen wie Brustkrebs, Lungenkrebs und Lymphomen eingesetzt wird. Es wurde bereits 1974 von der FDA zur Behandlung von Tumoren in Erwachsenen und Kindern zugelassen. Doxorubizin ist ein Topoisomerase II Hemmer, der in die DNA interkaliert und so die DNA-Replikation stört, die Proteinbiosynthese inhibiert, reaktive Sauerstoffradikale (ROS) bildet und damit Apoptose einleitet [21].

Doxorubicin wird intravenös verabreicht und erreichte in ersten Studien im Menschen bei einer Dosis von 75 mg/m<sup>2</sup> eine maximale Serumkonzentration ( $c_{\max}$ ) von 5  $\mu$ M [22]. Die Anwendung an Patienten hat gezeigt, dass Doxorubizin akute oder kumulativ dosisabhängige Kardiotoxizität verursacht und zu Kardiomyopathie, verringertem Auswurfvolumen und Herzversagen führen kann. Die Inzidenz von akuter Kardiotoxizität (11 %) ist sehr viel höher als chronische (1,7 %) und kann in der Regel innerhalb der ersten Tage der Therapie erkannt

werden und umfasst Myoperikarditis, Palpitationen, Tachykardie und Arrhythmien. Chronische Kardiotoxizität tritt seltener auf und ihre Inzidenz ist stark dosisabhängig, zeigt sich aber meist erst Monate bis Jahre nach der letzten Dosis Verabreichung. Die Wahrscheinlichkeit einer chronischen Kardiotoxizität hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der dosisabhängigen Schädigung der Zellen, dem Einsatz von Kombinationstherapien, dem Alter des Patienten und Vorerkrankungen [23]. Wie genau die Kardiotoxizität von Doxorubizin vermittelt wird, ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt. Autophagie, Mitophagie, ROS Produktion und induzierte Apoptose wurden als mögliche Ursachen untersucht [24–27].

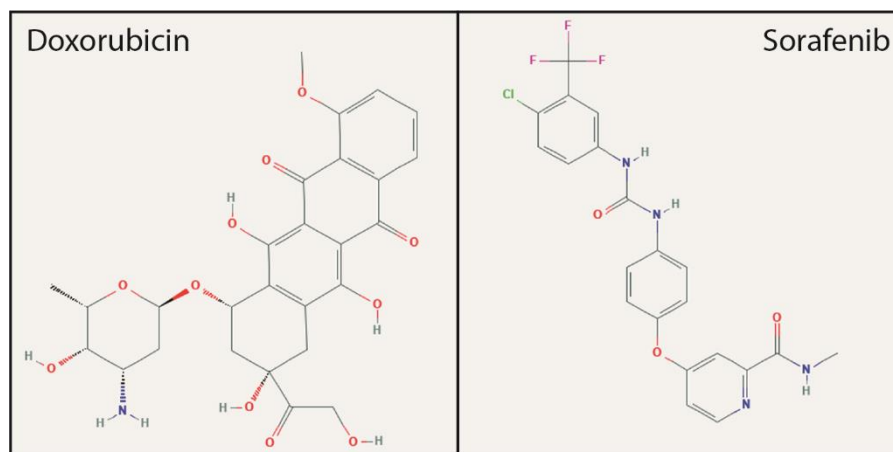
### Sorafenib (Nexavar)

Sorafenib ist seit 2005 von der FDA (*Food and Drug Administration*) als Tumorthapeutikum für Nieren-, Leber- und Schilddrüsenkrebs zugelassen. Es handelt sich um einen Multikinase-Inhibitor, der unter anderem Raf-Kinasen (C-Raf, IC<sub>50</sub>: 6 nM; B-Raf, IC<sub>50</sub>: 22 nM), VEGF-Rezeptoren (VEGFR, IC<sub>50</sub>: 15 nM) und Rezeptoren für *Platelet-derived growth factors* (PDGFR, IC<sub>50</sub>: 57 nM) inhibiert [28]. Es besitzt eine hohe Effektivität gegen C-Raf und die krebsinduzierende Mutation V600E von B-Raf. Sorafenib inhibiert B-Raf durch die Bindung an die inaktive Form des Proteins und verhindert so eine Konformationsänderung zur aktiven Form [28–30].

In mehreren klinischen Phase 1 Studien wurden die pharmakokinetischen Eigenschaften von Sorafenib untersucht. Die höchste Serumkonzentration im Menschen wurde bei einer Dosis von 400 mg bei einem Zeitplan von 21 Tagen mit und 7 Tagen ohne Medikation gemessen. Am letzten Tag der Zyklus lag der c<sub>max</sub> bei 10 mg/L (21,5 µM). Eine längere Behandlung oder höhere Dosis erhöhten den c<sub>max</sub> nicht. Die Halbwertszeit der Substanz im Körper schien nicht von der Dosis abzuhängen und lag durchschnittlich bei ca. einem Tag. Der AUC<sub>0-12</sub> von Sorafenib wurde bei der zuvor genannten Dosis und Zeitplan mit 24 mg\*h/L bestimmt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Dosis und Gesamtheit der Nebenwirkungen beobachtet werden [31].

Sorafenib besitzt eine Reihe möglicher Nebenwirkungen, die unter anderem auch das Herz betreffen. Die häufigste Nebenwirkung ist Bluthochdruck (>10 %), dessen Ursache auf die *on-target* Inhibierung des VEGF-Rezeptors zurückzuführen ist. Mit geringerer Frequenz (1-10 %) treten Myokardinfarkt, koronare Herzerkrankung und Herzinsuffizienz auf [16,32,33]. Die Ursachen, die zu diesen schwerwiegenden Kardiotoxizitäten führen, sind nach wie vor umstritten. Unter anderem scheint Sorafenib das Überleben von Endothelzellen zu

reduzieren und durch C-Raf Inhibierung eventuell eine Kardiomyozyten-Schädigung zu verursachen [34]. Es wurde gezeigt, dass Sorafenib zu einer erhöhten ROS Produktion in den Zellen führt und so eventuell seine zytotoxische Wirkung sowie mitotoxische Effekte vermittelt. Zusätzlich wurde Sorafenibs Einfluss auf die Calciumhomöostase festgestellt, was zu den in Patienten beobachteten Veränderungen in der Herzfunktion passt [35,36].



**Abbildung 2** Strukturen der von der FDA zugelassenen Wirkstoffe Doxorubicin und Sorafenib.

## 1.2 Die PI3K/AKT Kaskade

Die PI3K/AKT Kaskade ist ein intrazellulärer Signalweg, dessen Aktivierung das Zellüberleben fördert, indem es zelluläre Wachstumsfaktoren aktiviert und durch die Inaktivierung von pro-apoptotischen Proteinen den Zelltod verhindert [37]. Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) können durch verschiedene Transmembranrezeptoren aktiviert werden. Hierzu gehören u.a. Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), Integrine, B- und T-Zellrezeptoren und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). PI3Ks gehören zur Familie der Lipidkinasen und phosphorylieren die 3'-OH Gruppe am Inositolring von Inositol-enthaltenden Phospholipiden [38]. Nach Aktivierung der PI3K durch entsprechende Rezeptoren phosphoryliert diese Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) (Abb. 3). PIP<sub>3</sub> kann eine Reihe verschiedener Proteine rekrutieren und aktivieren, darunter auch AKT [39]. AKT ist der Dreh- und Angelpunkt dieser Kaskade und beeinflusst eine Reihe an Zellfunktionen durch die Phosphorylierung und meist Inhibierung von einer breiten Auswahl an Zielproteinen [40,41].

### 1.2.1 AKT

Die Kinase AKT, auch Protein Kinase B (PKB) genannt, erhielt ihren Namen ursprünglich durch das transformierende Retrovirus AKT8. AKT8 wurde 1977 aus der Mauslinie AKR als Onkogen isoliert und später dazu verwendet, die Gensequenzen für AKT 1 und 2 in einer menschlichen Genbibliothek zu identifizieren [42,43].

AKT ist eine Serin/Threonin Kinase, von der drei Isoformen mit sehr homologen Aminosäuresequenzen existieren (AKT1-3/PKB $\alpha/\beta/\gamma$ ). AKT1 wird nahezu ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert; AKT2 liegt hauptsächlich in insulinsensitiven Geweben vor, wie der Leber, Skelettmuskeln und Fettgewebe; AKT3 findet sich vorwiegend im Gehirn und in den Hoden [44]. Zusätzlich unterscheiden sich die Isoformen in ihrer subzellulären Lokalisation. AKT1 befindet sich hauptsächlich im Zytosol, während AKT3 vorwiegend im Zellkern und dessen Membran zu finden ist; AKT2 lokalisiert sich im Zytosol nahe der Zellkernmembran und Mitochondrien [45,46]. Zudem zeigten *Knock-out* Versuche in Mäusen, dass eine Deletion von AKT2 und 3, einzeln und gleichzeitig, nicht letal sind, jedoch zu starken Einschränkungen in der Entwicklung und zu Morbiditäten bei den Tieren führten. Eine Deletion von AKT1 erwies sich als embryonal letal. Dies weist darauf hin, dass nicht alle Funktionen von AKT in den einzelnen Isoformen redundant sind. Was genau die spezifischen Funktionen der Isoformen sind, unabhängig von ihrer Lokalisation, ist bisher noch ungeklärt [46].

Viele Studien behandeln die drei Isoformen von AKT jedoch als funktionell redundant und betrachten diese daher nicht individuell. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit bezeichnet die Abkürzung AKT daher vornehmlich AKT1, schließt AKT2/3 allerdings nicht kategorisch aus. Phosphorylierungsstellen und ähnliches beziehen sich ebenfalls auf AKT1 und können für die anderen Isoformen leicht abweichen.

AKT besteht aus 3 strukturell distinguierten Domänen und weist hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Protein Kinasen A (PKA) und C (PKC) auf. Die N-terminale Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne besteht aus 100 Aminosäuren und interagiert mit membrangebundenen Phospholipiden wie PIP<sub>3</sub> und PIP<sub>2</sub>. Die mittlere Domäne von AKT ist die Kinasedomäne, welche wie andere AGC Proteinkinasen ein regulatorisches Threonin (Thr308) beinhaltet, dessen Phosphorylierung für die Aktivierung von AKT nötig ist. Die 40 Aminosäuren lange C-terminale Domäne von AKT formt eine hydrophobe Einkerbung im Protein und beinhaltet ein regulatorisches Serin (Ser473), dessen Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung des Proteins und somit zur Aktivierung der Kinasefunktion führt [41,47,48].

Über die Bindung der PH-Domäne an PIP<sub>3</sub> kommt es zu einer Konformationsänderung von AKT und die Kinase wird an die Plasmamembran rekrutiert. Dort wird AKT von der Phosphoinositol-abhängigen Kinase-1 (PDK1) an Thr308 phosphoryliert (Abb. 3) [44]. Zur vollständigen Aktivierung von AKT bedarf es jedoch einer weiteren Phosphorylierung an Ser473. Eine Reihe verschiedener Kinasen sind in der Lage AKT an dieser Stelle zu phosphorylieren, hierzu gehören der *Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) als auch PDK1 und AKT selbst. Eine Bindung an verschiedene Proteine wie der extrazellulärsignal-regulierten Kinase 1 und 2 (ERK1/2), Hsp90, Hsp27 oder Aktin helfen die Aktivität von AKT zu regulieren. Phosphoryliertes und somit aktiviertes AKT hat ein weites Spektrum an Substraten, die sich sowohl in der Plasmamembran, dem Zytosol als auch dem Zellkern befinden und eine große Anzahl an zellulären Prozessen beeinflussen, wie Zellüberleben und –tod sowie Zellwachstum und Proliferation [41].

### 1.2.2 Nachgeschaltete Zielproteine von AKT

Neben Zellüberleben, -wachstum und -proliferation beeinflusst AKT verschiedene zelluläre Funktionen, unter anderem den Glukosemetabolismus, die Proteinexpression und die Migration (Abb. 3). So nimmt AKT zum Beispiel Einfluss auf den ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) Signalweg, der eine wichtige Rolle in der Immunantwort und Entzündungsreaktion des Körpers spielt. NF- $\kappa$ B beeinflusst zusätzlich die Zellproliferation und die Apoptose. Weitere Signalwege, die durch AKT beeinflusst werden, sind der über GSK3 vermittelte Einfluss auf die Glykogensynthese und der p53 Signalweg, der die Zellzyklusprogression beeinflusst und als Tumorsuppressor agiert [49,50].

#### Zellüberleben und –tod

Durch Wachstumsfaktoren vermittelte Aktivierung des AKT Signalwegs kann zu einer Unterdrückung der Apoptose und dadurch verstärktem Überleben der Zellen führen. Hierbei phosphoryliert AKT das pro-apoptotische Protein Caspase-9, ein wichtiger Bestandteil der apoptotischen Cytochrom-c/APAf-1/Caspase-9 Signalkaskade, welches so inaktiviert wird und den Signalweg negativ reguliert [41,51].

Die Phosphorylierung weiterer direkt oder indirekt an der Apoptose beteiligter Proteine wie

des *Bcl-2-Antagonist of Cell Death* (BAD) und des *Forkhead-Box-Protein O1* (FOXO1) durch AKT verstärkt die anti-apoptotische Wirkung zusätzlich. BAD bindet und deaktiviert in seinem unphosphorylierten Zustand das anti-apoptotische Protein B-Zell Lymphom 2 (Bcl-2). Nach der Phosphorylierung durch AKT kann BAD das anti-apoptotische Protein nicht mehr binden und die Apoptose wird so gehemmt. Der pro-apoptotische Transkriptionsfaktor FOXO1 wird durch die AKT vermittelte Phosphorylierung inhibiert. FOXO1 vermittelt seine pro-apoptotische Wirkung durch die Hoch- und Herunterregulation verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine [40,52].

### Zellwachstum und Proliferation

Ein direktes Phosphorylierungsziel von AKT ist das Tuberin (Tuberous Sclerosis Complex 2; TSC2), das unphosphoryliert an der Zellmembran mit Harmatin (Tuberous Sclerosis Complex 1; TSC1) kolokalisiert. Tuberin ist ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) und inhibiert die kleine GTPase *Ras homolog enriched in brain* (Rheb), ein wichtiger Aktivator für den *Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1* (mTORC1). Nach Phosphorylierung von Tuberin durch AKT transloziert dieses in das Zytosol, wodurch es die Transkription nicht mehr inhibieren kann. Rheb kann nun mTORC1 aktivieren, was weitere Proteine wie die p70 S6 Kinase (p70S6K1) und das eukaryotischer Initialisierungsfaktor 4E bindendes Protein (4EBP1) aktiviert und so die Zellproliferation beeinflusst [41,53,54]. Ein negativer Regulator von mTORC1 ist das prolinreiche AKT1 Substrat 1 (PRAS40), das ebenfalls direkt von AKT phosphoryliert werden kann. Nach seiner Phosphorylierung an Thr246 durch AKT, wird es zusätzlich durch mTORC1 an Ser183 phosphoryliert, wodurch es vom mTOR Komplex dissoziiert und seine inhibierende Wirkung aufgehoben wird. So wird durch die Aktivität von AKT ein mTOR inhibierendes Protein inaktiviert, so dass mTOR aktiviert wird [41,55].

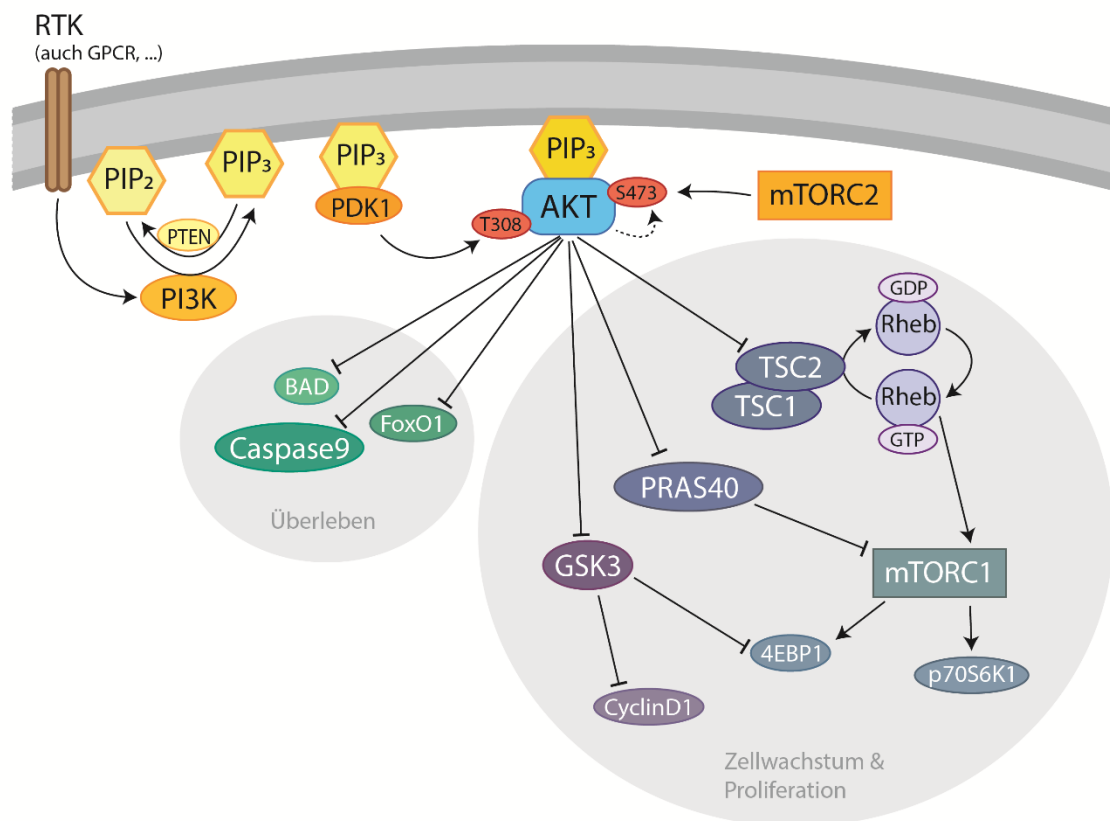
Ein weiteres Zielprotein ist die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3), ein Protein, das verschiedene Zielproteine phosphorylieren kann, wodurch diese meist inhibiert werden. Neben seiner Funktion im Glukosemetabolismus ist die GSK3 ein Bestandteil verschiedener intrazellulärer Signalwege, die unter anderem Proliferation, Migration und Apoptose beeinflussen. Hierzu gehören unter anderem das Zellzyklus vorantreibende Protein CyclinD1 und das an der mRNA Translation beteiligte Protein 4EBP1 [56,57].



### 1.2.3 Inaktivierung der PI3K/AKT/mTORC1 Kaskade

Da die PI3K/AKT Kaskade ein weites Spektrum an Funktionen hat und viele Proteine beeinflussen kann, ist eine strikte Regulation und sensitive Deaktivierung an verschiedenen Stellen der Kaskade unerlässlich. Eine frühe Unterdrückung dieses Signalwegs bereits am Anfang der Kaskade erfolgt durch das Phosphatase- und Tensinhomolog (PTEN). PTEN ist eine duale Lipid- und Proteinphosphatase, deren primäres Ziel PIP<sub>3</sub> ist. PTEN dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> und inhibiert so die PI3K/AKT/mTORC1 Kaskade [20,58,59].

Ein weiterer Deaktivierungsmechanismus ist die Dephosphorylierung von AKT durch die *PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatases* (PHLPP) und die Proteinphosphatase 2A (PP2A). Beide Isoformen von PHLPP (PHLPP1/2) dephosphorylieren AKT an der Stelle Ser473, unterscheiden sich jedoch in ihrer Affinität zu den unterschiedlichen AKT Isoformen. PP2A dephosphoryliert AKT hauptsächlich an der Stelle Thr308, kann allerdings auch Ser473 dephosphorylieren [47,59].



**Abbildung 3** Der PI3K/AKT/mTOR Signalweg wird durch die Stimulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) aktiviert und führt zu einer Phosphorylierung von Phosphoinositol-2-Phosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphoinositol-3-Phosphat (PIP<sub>3</sub>) durch die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K). PIP<sub>3</sub> bindet sowohl AKT als auch Phosphoinositol-abhängigen Kinase 1 (PDK1), welche AKT an der Stelle Thr308 phosphoryliert. Eine für die vollständige Aktivierung von AKT notwendige zweite Phosphorylierung an Ser473 wird u.a. durch den *mechanistic target of rapamycin complex 2* (mTORC2) oder AKT selbst durchgeführt. Das aktivierte AKT phosphoryliert verschiedene Zielproteine, die Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Überleben, Zellwachstum und Proliferation haben. Durch die Aktivierung von AKT wird mTORC1 indirekt aktiviert und beeinflusst die Proliferation und das Zellwachstum.

#### 1.2.4 Die Rolle der PI3K/AKT/mTORC1 Kaskade in Tumorerkrankungen

Die PI3K/AKT/mTORC1 Signalkaskade ist eine der Kaskaden, deren Dysregulation eine der häufigsten Ursachen für Tumorerkrankungen ist, da AKT die Proliferation, die Zellzyklusprogression und die Apoptose beeinflusst [60,61]. Am häufigsten sind es die Proteine PTEN und PI3K, die im Falle von Krebserkrankungen mutiert sind. Die PTEN Aktivität wird durch Mutationen gehemmt und führt zu einem Verlust der negativen Regulation und somit zu

einer Erhöhung der PI3K Aktivität. Eine kanzerogene Mutation der PI3K selbst (e.g. E542K, E545K, H1047R) führt zu erhöhter katalytischer Aktivität und einer Verstärkung des Signals der nachgeschalteten Kaskade [20,58]. Mutationen im AKT Protein selbst sind im Vergleich zu Amplifikation, Phosphorylierung und Überexpression von AKT eher selten in Krebserkrankungen zu finden, sind aber dennoch ein relevanter Faktor [62,63]. AKT1 weist die höchste Inzidenz an Mutationen unter den AKT Isoformen auf. Es sind verschiedene funktionelle Mutationen von AKT1 bekannt. Die wahrscheinlich häufigste Mutation ist AKT1<sup>E17K</sup>, die sich in der Lipidbindetasche des Proteins befindet und zu einer pathologischen Lokalisation der Kinase an der Zellmembran führt, wo sie konstitutive aktiv ist [64,65].

Zusätzlich zu seiner eigenen kanzerogenen Wirkung bei Dysregulation, trägt die PI3K/AKT Signalkaskade stark zur Entwicklung von Chemoresistenzen bei [66–68]. Eine Hochregulation von AKT kann durch Mutationen im AKT Signalweg oder als Folge von anderen karzinogenen Mutationen auftreten. Die gesteigerte Aktivität dieses Signalwegs kann die Proliferation von Krebszellen unterstützen und die Apoptose unterdrücken, die zur Tumorbehandlung durch Chemotherapeutika in Krebszellen induziert werden soll, und so die Wirksamkeit der Krebstherapie signifikant reduzieren. Eine Kombination von Chemotherapeutika mit PI3K/AKT-Inhibierenden Wirkstoffen verspricht eine bessere Behandlung von Tumoren und eine effiziente Vermeidung von Chemoresistenzen. Die Kombinationstherapie von Chemotherapeutika mit AKT-Inhibitoren wird bereits in verschiedenen Tumoren, vor allem in Brustkrebs, untersucht und empfohlen [63,68,69].

Ein potenzielles Ziel für Krebstherapien im PI3K/AKT Signalweg stellt mTORC1 dar, da es aufgrund seiner Rolle in Zellwachstum und Proliferation ein wichtiger Angelpunkt in der Tumorgenese ist. In der Vergangenheit wurde versucht, mTORC1 mittels Rapamycin-basierter allosterischer Inhibitoren zu hemmen. Allerdings war diese Inhibierung von mTORC1 unvollständig und zeigte unzureichende klinische Erfolge [70]. Zusätzlich vermittelt mTORC1 über IGF1Rs und andere RTKs wichtige negative Feedbackschleifen, deren Hemmung und daraus resultierende Aktivierung ihrer Zielsignalkaskaden, zum Beispiel PI3K/AKT und Raf/MEK/ERK, pro-proliferative Wirkung und Arzneimittelresistenz hervorrufen kann [71]. Um diese Feedbackschleifen nicht zu beeinträchtigen, werden alternativ die vorgeschalteten Signale als Angriffspunkte gewählt. So hat AKT in den letzten Jahren zunehmend mehr Aufmerksamkeit in der Krebstherapie erhalten. Die Inhibierung von AKT kann in zwei Mechanismen unterschieden werden. Allosterische Inhibitoren wie MK-2206, BAY1125976, ARQ-751 und Miransertib blockieren die PH-Domäne und verhindern so die Rekrutierung an

die Zellmembran, wodurch AKT nicht phosphoryliert und aktiviert werden kann. Daneben existieren ATP-kompetitive AKT-Inhibitoren wie Afuresertib, Capivasertib, GSK2141795 und Ipatasertib, die die ATP-abhängige Aktivierung der Kinasedomäne von AKT-Inhibieren. Viele dieser Inhibitoren befinden sich in klinischen Studien der Phase 1 und 2 und werden in Monotherapie oder in Kombination mit anderen Inhibitoren in verschiedenen Tumorerkrankungen getestet [64]. Auf die in der Arbeit verwendeten Inhibitoren wird im Folgenden genauer eingegangen. Es wurden Capivasertib und Ipatasertib als exemplarische Inhibitoren für die ATP-kompetitive Inhibierung von AKT gewählt, die allosterischen Inhibitoren Miransertib und MK-2206 sowie der kovalent allosterische Inhibitor Borussertib.

### 1.2.5 AKT-Inhibitoren

#### Borussertib

Borussertib ist ein kovalenter allosterischer Inhibitor von AKT. Er bildet einen irreversiblen Komplex mit AKT und stabilisiert so dessen inaktive Form. Borussertib bindet dabei zwischen der Kinasedomäne und der PH-Domäne von AKT. Die Bindung wird durch kovalente Bindung eines elektrophilen *Warheads* zu Cys296, Wasserstoffbrückenbildung zu verschiedenen Aminosäuren und  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen mit Trp80 von AKT stabilisiert. In zellfreien Assays inhibierte Borussertib AKT mit einem  $IC_{50}$  von 0,8 nM und hat damit eine viel höhere Effektivität als andere allosterische AKT-Inhibitoren [72,73]. Ebenso erwies sich Borussertibs antiproliferative Wirkung in verschiedenen Krebszelllinien als effektiver als andere aktuell in klinischen Studien befindliche AKT-Inhibitoren. Besonders in Brustkrebszelllinien zeigte Borussertib signifikant bessere Aktivität im Vergleich zu anderen AKT-Inhibitoren [73]. Da zu Borussertib noch keine klinischen Studien durchgeführt wurden, ist noch nichts über die Pharmakokinetik und die Nebenwirkungen, insbesondere zur Kardiotoxizität, im Menschen bekannt.

#### Capivasertib (AZD-5363)

Capivasertib ist ein hochselektiver, oral bioverfügbarer ATP-kompetitiver Inhibitor von AstraZeneca, der alle drei Isoformen von AKT (AKT1-3) mit ähnlicher Effizienz hemmen kann [74,75]. Es handelt sich um eine niedermolekulare Verbindung, die die Kinasefunktion von AKT hemmt, ohne die Phosphorylierung von AKT selbst zu unterbinden. In zellfreien Assays zur Kinasehemmung inhibierte Capivasertib AKT mit einem  $IC_{50}$  von 0,9 nM [73], allerdings

zeigte es auch eine inhibierende Wirkung von nahezu gleicher Ausprägung gegen PKA, P70S6K und verschiedene weitere Mitglieder der AGC Familie [74].

In Phase 1 Studien zur Pharmakokinetik von Capivasertib erreichte es bei einer Dosis von 480 mg eine maximale Serumkonzentration von 3,33  $\mu\text{M}$  und eine AUC von 7,95  $\mu\text{M}\cdot\text{h}/\text{ml}$  [76]. Capivasertib wird zurzeit in klinischen Phase 2 Verfahren in Kombination mit dem Zytoskelett-Inhibitor Paclitaxel oder dem Antiöstrogen Fulvestrant an Brustkrebspatienten getestet. In beiden Kombinationstherapien zeigte die Kombination mit Capivasertib gute Verträglichkeit und signifikant längeres progressionsfreies Überleben der Patienten. Es wurde keine akute Kardiotoxizität beobachtet, allerdings wurde diese auch nicht gesondert betrachtet [38,77–79].

#### Ipatasertib (GDC-0068)

Ipatasertib ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor von AKT1-3, entwickelt von Genetech. Dieser Inhibitor greift bevorzugt die aktive Form von AKT (pAKT) an und zeigte in zellfreien Inhibitionsassays einen  $\text{IC}_{50}$  von 3,5 nM und eine fast 100-fach höhere Selektivität als andere strukturähnliche Kinasen [73]. Die hohe Selektivität von Ipatasertib gegen AKT macht es zu einem vielversprechenden zukünftigen Therapeutikum. Klinische Phase 1 Studien zeigten, dass Ipatasertib im Menschen eine maximale Serumkonzentration von bis zu 1,83  $\mu\text{M}$  erreichen kann [60], allerdings eine gute Verträglichkeit besitzt und nur geringe Nebenwirkungen bei Patienten hervorruft. Die schwerwiegendsten Nebenwirkungen waren Bluthochdruck und Ausschlag, wobei diese im Vergleich zu anderen PI3K oder AKT-Inhibitoren gering waren [60]. Weiterführende klinische Phase 2 Studien von Ipatasertib in Kombination mit Paclitaxel bei Brustkrebspatienten oder in Kombination mit dem Steroid Abirateron bei Prostatakrebspatienten zeigten ebenfalls signifikant bessere Ergebnisse im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe. In keiner Studie wurden bisher kardiotoxische Nebenwirkungen, die über Bluthochdruck hinausgingen, beobachtet [80–82].

#### Miransertib (ARQ-092)

Miransertib ist ein oral verfügbarer, hochselektiver allosterischer AKT1-3 Inhibitor, der auch die Mutante AKT1<sup>E17K</sup> bindet. Miransertib verhindert die Translokation von inaktivem AKT zur Zellmembran, wo es phosphoryliert und somit aktiviert werden kann. Zusätzlich verstärkt es die Dephosphorylierung von aktivem AKT, was die Aktivität von AKT in der Zelle stark reduziert [83,84]. Es inhibierte die Aktivität von AKT in zellfreien Assays mit einem  $\text{IC}_{50}$

von 1,4 nM [73] und zeigte in verschiedenen Krebszelllinien gute antiproliferatorische Wirkung, insbesondere in Zellen mit einer Mutation in der katalytischen Untereinheit A von PI3K [84]. In klinischen Phase 1 Studien in Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren erreichte Miransertib eine maximale Serumkonzentration von 1,5 µM [85]. Miransertib wird neben seiner Tumorsuppression aktuell auf seine therapeutische Wirkung in Sichelzellenanämie und dem vermutlich durch AKT1-Mutation verursachten Proteussyndrom untersucht [83,86–89].

#### MK-2206

MK-2206 ist ein oral verabreichter, allosterischer AKT-Inhibitor, der PH-Domänen abhängig an AKT bindet. MK-2206 bindet in der regulatorischen PH-Domäne und der katalytisch aktiven Kinasedomäne und stabilisiert so die inaktive Konformation von AKT. Es inhibiert AKT mit einem IC<sub>50</sub> von 10 nM in zellfreien Assays [90]. In präklinischen Studien wurde MK-2206 in Kombination mit verschiedenen Krebstherapeutika gegen unterschiedliche Krebszelllinien untersucht. Diese Kombinationen zeigten in *in vitro* Studien vielversprechende synergistische Wirkungen [91]. In klinischen Phase 1 Studien zeigte sich für MK-2206 ein c<sub>max</sub> von 571 nM bei einer Dosis von 200 mg, was für einen Kinaseinhibitor vergleichsweise niedrig ist [92]. Obwohl Phase 1 Studien von MK-2206 in Kombination mit verschiedenen Wirkstoffen eine gute Toleranz und tendenziell bessere antiproliferatorische Wirkung zeigten als die Einzeltherapien [92–96], konnten diese Ergebnisse in Phase 2 Studien nicht bestätigt werden und es wurde keine Verbesserung der Effektivität durch Kombination mit MK-2206 beobachtet [97–99]. In den verschiedenen Studien traten Nebenwirkungen wie Ausschlag, Müdigkeit und Diarrhö am häufigsten auf. Eine Auswirkung auf Herzparameter konnte nur in Kombination mit Lapatinib beobachtet werden, kann aber nicht auf MK-2206 alleine zurückgeführt werden [92–99].

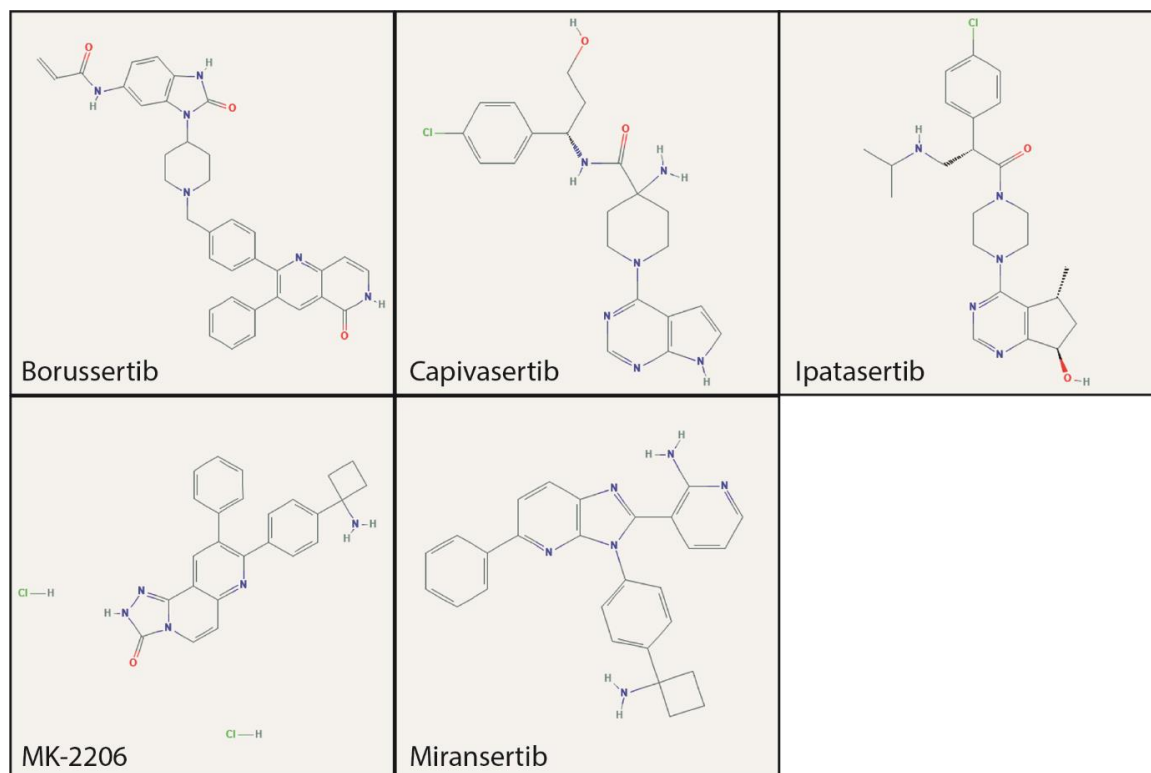


Abbildung 4 Strukturen der verschiedenen AKT-Inhibitoren.

### 1.3 Die MAP-Kinase Signalkaskade

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) sind eine Klasse von Kinasen, die spezifisch die Aminosäuren Serin und Threonin phosphorylieren. Sie stehen am Ende des MAPK Signalwegs, der aus einer Kinase-Kaskade besteht, in der sich die Kinasen sequenziell phosphorylieren. Es existieren verschiedene MAPK-Signalkaskaden, welche sich in ihrer Struktur sehr ähneln, allerdings unterschiedliche zelluläre Prozesse regulieren, wie Proliferation, Zellteilung und -differenzierung, Apoptose, Zellzyklus, und Entzündungsregulation. Die verschiedenen MAPK-Signalwege bestehen aus jeweils drei Komponenten, den MAPK-Kinase-Kinasen (MAP3K), den MAPK-Kinasen (MAP2K) und schließlich den MAPK. Den Anfang der Signalkaskade bilden somit die MAP3K, hierzu gehören zum Beispiel A/B/C-Raf, MEKK1-4 und ASK1/2. Die Aktivierung der MAP3K kann durch eine Reihe von Signalen erfolgen, u.a. GPCRs, RTKs sowie oxidativen- oder physiologischen Stress. Nach der Aktivierung der MAP3K phosphorylieren diese die ihnen nachgeschalteten MAP2K (u.a. MAPK/ERK Kinase 1/2 (MEK1/2), MKK3-7) und diese schließlich die MAPKs. Die am besten untersuchten MAPKs in eukaryotischen Zellen sind

ERK1/2, JNK und p38. Nach Aktivierung der MAPKs können diese verschiedene Zielproteine im Zytosol sowie im Zellkern phosphorylieren und so zahlreiche Zellprozesse beeinflussen [100,101].

### 1.3.1 Raf/MEK/ERK Signalweg

Die Raf/MEK/ERK Kaskade ist eine MAPK-Signaltransduktionskaskade, die in eukaryotischen Zellen zelluläre Prozesse wie zum Beispiel Proliferation und Zelldifferenzierung regulieren kann. Werden RTKs durch Substrate wie den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) aktiviert, führt das zur Phosphorylierung des Rezeptors und zur Rekrutierung des Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenen Proteins 2 (GRB2) und schließlich zur Bindung des *son of sevenless* (SOS) (Abb. 5). SOS ist ein Guanosintriphosphat (GTP-) Austauschfaktor, der Guanosindiphosphat (GDP) von einem Ras Protein löst, das nun durch Bindung von GTP wieder aktiviert wird [102].

Aktives Ras aktiviert die Kinase Raf, die als MAP3K MEK phosphorylieren kann und so diesen MAPK-Signalweg startet. Raf Proteine sind Serin/Threonin Kinasen. Aus der Raf Familie sind drei strukturell ähnliche Isoformen bekannt: C-Raf (auch Raf-1), B-Raf und A-Raf. A-Raf zeigt hierbei die geringste Kinaseaktivität im MAPK-Signalweg und besitzt vermutlich andere Funktionen, die allerdings weitgehend unbekannt sind. Die anderen Isoformen zeigen hohe Aktivität in der ATP-abhängigen Phosphorylierung von MEK1/2 an den Stellen Ser218/S222 und S222/S226. MEK1/2 sind bisher die einzigen bekannten Substrate von Raf [100,102–104].

MEK1/2 sind hochspezifische Kinasen, deren einzige Zielproteine ERK1/2 sind [101]. MEK1/2 sind dual-spezifische Kinasen aus der Familie der Protein-Serin/Threonin Kinasen. MEK1 und MEK2 haben Molekülgrößen von 45kDa und 46kDa, respektive, besitzen über 85 % Homologie zueinander und werden ubiquitär exprimiert [101]. Beide Proteine besitzen eine regulatorische N-terminale Domäne, die eine nukleäre-Exportsequenz (NES) und eine ERK-bindende Region beinhaltet, eine katalytische Kinasedomäne und eine kurze C-terminale Region [100]. Sie binden ERK1/2 und phosphorylieren dieses am TEY-Motiv (Thr183 und Tyr185 in murinem ERK2, Thr202/187 und Tyr204/187 in humanem ERK1/2) [100].

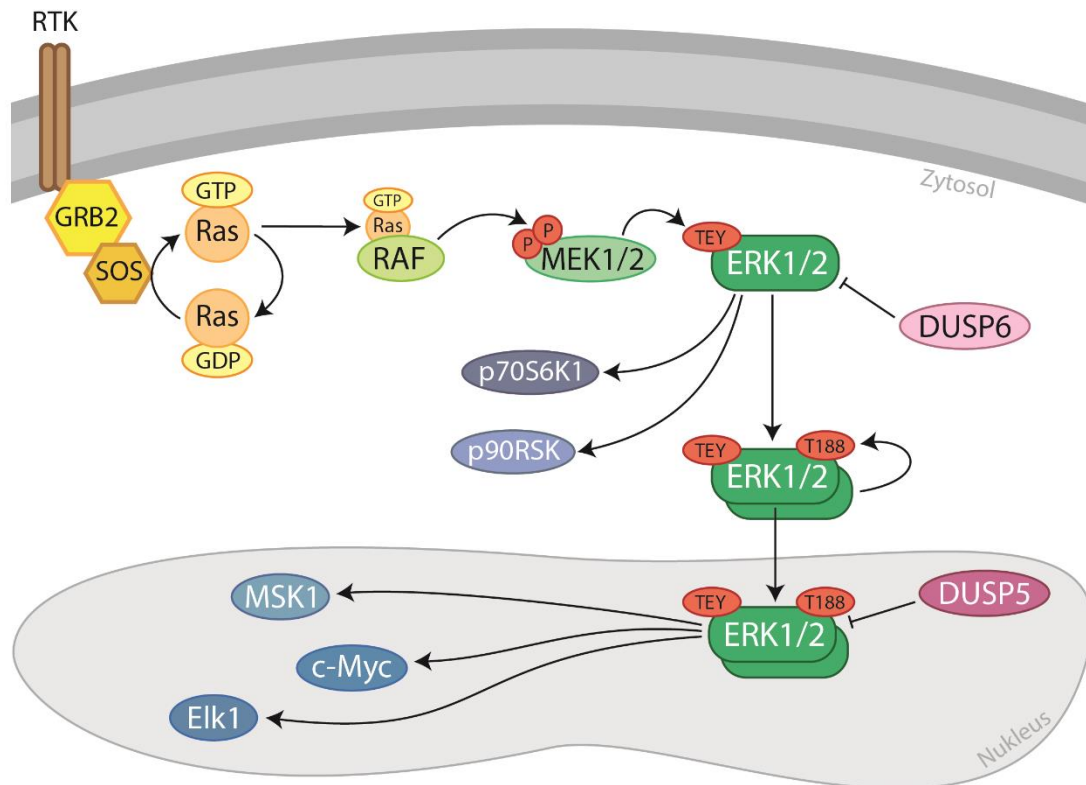
ERK1/2 besitzen im Gegensatz zu Raf und MEK1/2 viele verschiedene Zielproteinen im Zytosol und im Nukleus [102–104]. Die Substratwahl von ERK1/2 wird vermutlich durch die Art des aktivierenden Stimulus beeinflusst. Lorenz et al. zeigten, dass die Aktivierung der



Raf/MEK/ERK Kaskade entweder durch einen hypertrophen oder nicht-hypertrophen Stimulus erfolgen kann. Nicht-hypertrophe Stimuli führen zur Phosphorylierung des TEY-Motives von ERK1/2 durch MEK1/2 und ermöglichen die Phosphorylierung von Substraten im Zytosol wie p90RSK und P70S6K1. P90RSK unterstützt Zellüberleben, Zellwachstum und Proliferation, wohingegen p70S6K1 an der Proteinbiosynthese beteiligt ist [105]. Ein hypertropher Stimulus führt neben der Phosphorylierung am TEY-Motiv auch zur Autophosphorylierung von ERK1/2 an der Stelle Thr208/Thr188 [106]. Dreifach phosphoryliertes ERK1/2 kann in den Zellkern translozieren, wo es verschiedene Zielproteine wie c-Myc, ETS-like Protein (ELK1) und die Mitogen- und Stressaktivierte Kinase 1 (MSK1) phosphorylieren kann [106,107]. c-Myc ist ein proto-Onkogen, welches die Expression von etwa 15 % aller menschlichen Gene reguliert. ELK1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription verschiedener Proteine beeinflusst, den Calcium-Haushalt beeinflusst und das Zellwachstum unterstützt. MSK1 ist eine Kinase der RSK Familie und reguliert Genexpression durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und Chromatin-assoziierten Proteinen [105,108].

Zur genauen Regulation dieses vielfältigen Signalweges dienen neben der sehr spezifischen Aktivierung von ERK1/2, eine Vielzahl von Phosphatasen, die auf die Aktivität der MAPK Einfluss nehmen können (Abb. 5). Die wichtigste Gruppe bilden hier die MAPK-Phosphatasen (MKPs), eine Untergruppe der dualspezifischen Phosphatasen (DUSPs), die sowohl im Zytosol (DUSP6/MKP-3, DUSP7, DUSP9/MKP-4) als auch im Zellkern (DUSP1/MKP-1, DUSP2, DUSP4/MKP-2, DUSP5) vertreten sind und ERK1/2 am TEY Motiv dephosphorylieren können [109–111]. Die strukturell sehr ähnlichen MKPs weisen ein Kinase-Interaktionsmotiv (KIM) im N-terminalen Bereich auf, das die Stärke und Spezifität der Bindung zu den verschiedenen MAPKs bestimmt. Die vorwiegend positiv geladenen Aminosäuren in der KIM von DUSP6/MKP-3 ermöglichen eine spezifische Bindung an ERK1/2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. DUSP6/MKP-3 besitzt zusätzlich eine nukleare Exportsequenz, die die Aktivität von DUSP6/MKP-3 ausschließlich auf das Zytosol beschränkt. DUSP5 besitzt eine ähnlich hohe Spezifität für ERK1/2, beinhaltet allerdings eine nukleare Lokalisationssequenz, die die Phosphatase im Zellkern lokalisiert [110,112,113]. Neben den MKPs gibt es eine Vielzahl verschiedener Phosphatasen, die das TEY Motiv von ERK1/2 dephosphorylieren können. Die Protein-Phosphatase 1 (PP1) und PP2A greifen an verschiedenen Stellen der MAPK-Kaskade ein und regulieren so die Intensität des Signalwegs [109]. Welche Phosphatasen ERK1/2 an der Stelle T188 dephosphorylieren, ist bisher nicht bekannt. Durch die große Anzahl an sowohl spezifischen als auch unspezifischen Phosphatasen, die mit ERK1/2 interagieren können, wird

eine sehr komplexe Regulation der Stimulus-abhängigen, zeitlichen und lokalen Aktivität dieses Signalwegs und der MAPK erreicht.



**Abbildung 5** Die RAF/MEK/ERK Signalkaskade wird durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert. Die Aktivierung von RTKs führt zur Rekrutierung des Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenen Protein 2 (GRB2), welches wiederum *son of sevenless* (SOS) bindet. Dieses löst Guanosindiphosphat (GDP) von Ras, das nun in der Lage ist, ein Guanosintriphosphat (GTP) zu binden. So aktiviertes Ras bindet und aktiviert die Raf Kinase, die wiederum die MAPK/ERK Kinasen 1 und 2 (MEK1/2) an den Stellen Ser218/222 und Ser222/226 phosphoryliert. MEK1/2 phosphorylieren die extrazellulärsignal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) am TEY-Motiv (Thr183 und Tyr185 in murinem ERK2, Thr202/187 und Tyr204/187 in humanem ERK1/2) und ermöglichen die Phosphorylierung weiterer Substrate im Zytosol. Durch Dimerisierung sind ERK1/2 in der Lage, sich an der Stelle Thr208/188 zu autophosphorylieren und in den Zellkern zu translozieren, wo es weitere Substrate phosphoryliert. Die Dephosphorylierung der TEY-Motive erfolgt durch die Dual-spezifischen Phosphatasen 5 und 6 (DUSP5/6) im Nucleus bzw. Zytosol.

### 1.3.2 Die Rolle von Ras/Raf/MEK/ERK in Tumorerkrankungen

Die Ras/Raf/MEK/ERK Kaskade ist eine evolutionär hochkonservierte Signalkaskade, die extrazelluläre Signale ins Zytosol und in den Zellkern weiterleitet und neben unzähligen anderen Prozessen Einfluss auf Zellüberleben, Zellwachstum und Proliferation nimmt. Die Signalweiterleitung ist unter physiologischen Bedingungen durch selektive Signalweiterleitung und mehrere Feedbackmechanismen streng reguliert. Wenig verwunderlich ist es daher, dass Mutationen in dieser Signalkaskade häufig in Tumoren zu finden sind. So liegt in ca. einem Drittel aller Tumore eine Form von konstitutiv aktivem Ras und ungefähr in 8 % von Tumoren eine mutierte Form von B-Raf vor [114]. Mutationen in MEK sind selten und wurden ebenfalls mit verschiedenen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht, wohingegen Mutationen in den Kinasen ERK1/2 nicht kanzerogen zu sein scheinen. Da die Raf/MEK/ERK Kaskade hochspezifisch ist und eine Dysregulation der Signalweiterleitung nur über ERK auf die wichtigen Zellfunktionen weitergetragen werden kann, ist es unklar, wieso durch ERK-Mutationen ausgelöste Tumorerkrankungen bisher nicht beobachtet wurden [115].

Die häufigen Mutationen in diesem Signalweg und deren meist kanzerogenen Folgen machen diese Kaskade zu einem aussichtsreichen Ziel in der Chemotherapie. Der gängigste Weg, diesen MAPK Signalweg anzugreifen, liegt aktuell in der Entwicklung von Inhibitoren gegen die verschiedenen Komponenten der Raf/MEK/ERK Kaskade [116]. Obwohl die Überaktivität von Ras die häufigste Ursache für die Entwicklung von Tumoren ist, ist es bisher nicht gelungen, das Protein selbst mit einem Wirkstoff zu adressieren. Durch die hohe Spezifität der Kaskade ist es jedoch möglich, sich zur Entwicklung geeigneter Arzneimittel auf die nachgeschalteten Kinasen zu konzentrieren. So befinden sich zurzeit eine Reihe von Raf, MEK und ERK-Inhibitoren mit vielversprechender Antitumorwirkung in der Entwicklung [116]. Einige Inhibitoren wurden bereits von der FDA zur Verwendung in bestimmten Geweben zugelassen, wie zum Beispiel die Inhibitoren Vemurafenib, Encorafenib und Dabrafenib, welche die häufig auftretende B-Raf Mutante B-Raf<sup>V600E</sup> inhibieren. Weitere zugelassene Inhibitoren, die an späterer Stelle im Signalweg angreifen, sind die MEK Inhibitoren Selumetinib, Trametinib, Cobimetinib und Binimetinib (fda.gov 2020). Bislang wurden noch keine ERK-Inhibitoren durch die FDA zur Anwendung in Patienten zugelassen, allerdings sind einige ERK-Inhibitoren in klinischen Studien in Anwendung, um ihre Verträglichkeit und Effektivität als Krebstherapeutika in Patienten zu belegen [117–119]. Viele weitere Raf, MEK und ERK-Inhibitoren befinden sich zudem aktuell in Entwicklung und werden in präklinischen *in vivo* und *in vitro* Studien auf ihre Effektivität, Selektivität und Verträglichkeit untersucht.

### 1.3.3 MEK Inhibitoren

#### Trametinib (GSK-1120212)

Trametinib ist ein reversibler allosterischer MEK1/2 Inhibitor, der als erster spezifischer MEK Inhibitor von der FDA als Wirkstoff gegen Melanome zugelassen wurde (2013) [120,121]. Indem es die Phosphorylierung von MEK1/2 an S218/222 durch Raf hemmt, verhindert es so die Aktivierung und Signalweiterleitung dieser Kinase. Es inhibiert MEK1/2 in zellfreien Assays mit einem IC<sub>50</sub> von 1,8/0,92 nM. Durch die so erreichte Deaktivierung von ERK1/2 wird die Zellproliferation gehemmt. Dies findet insbesondere in Tumoren mit aktivierender B-Raf oder K-Ras Mutation Anwendung [122]. Seit der klinischen Zulassung von Trametinib, findet dieser MEK-Inhibitor insbesondere in Kombinationstherapien viel Aufmerksamkeit. In verschiedenen Phase 1 Studien von Trametinib sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen, wurde Trametinib mit einer Dosis von 1-2 mg/d eingesetzt und erzielte so eine maximale Serumkonzentration von bis zu 36 nM, was im Vergleich zu anderen niedermolekularen Kinaseinhibitoren sehr niedrig ist [123–125]. In klinischer Anwendung wird es häufig in Kombination mit dem B-Raf-Inhibitor Dabrafenib verwendet [13]. Obwohl Trametinib in den meisten Bereichen gut verträglich ist, kann es kardiovaskuläre Nebenwirkungen wie Bluthochdruck, Kardiomyopathie, Reduktion des linksventrikulären Auswurfvolumen und systolisches Herzversagen verursachen [123,126]. Eine Studie zur Untersuchung des QT-Intervalls nach Behandlung mit Trametinib zeigte, dass Trametinib keine QT-Prolongation verursacht [127].

#### Selumetinib (AZD-6244)

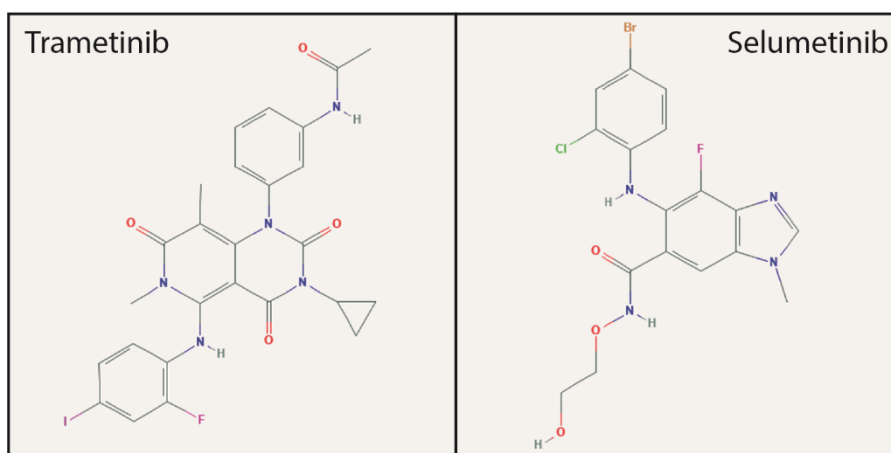
Selumetinib ist ein oral verabreichter Inhibitor von MEK1/2, der von AstraZeneca zur Behandlung von Neurofibromatose und anderen Krebserkrankungen entwickelt wurde. Nachdem er 2018 einen Orphan-Arzneimittel-Status sowohl in den USA als auch der EU erhalten hat, wurde es im April 2020 zur Behandlung von Patienten mit symptomatischer, nicht operierbarer plexiformen Neurofibromatose Typ1 in den USA durch die FDA zugelassen. Eine Zulassung in der EU steht noch aus [128,129].

Selumetinib ist ein selektiver und hochpotenter nicht-ATP kompetitiver Inhibitor von MEK1/2. Die Bindung an eine MEK1/2 spezifische allosterische Bindetasche ermöglicht eine hohe Selektivität und vermeidet *off-target* Effekte. Hierbei bleibt die Phosphorylierung von MEK1/2 durch Raf unverändert und nur die enzymatische Aktivität der Kinase wird inhibiert, wodurch eine Phosphorylierung von ERK1/2 unterbunden wird [130]. Selumetinib inhibierte

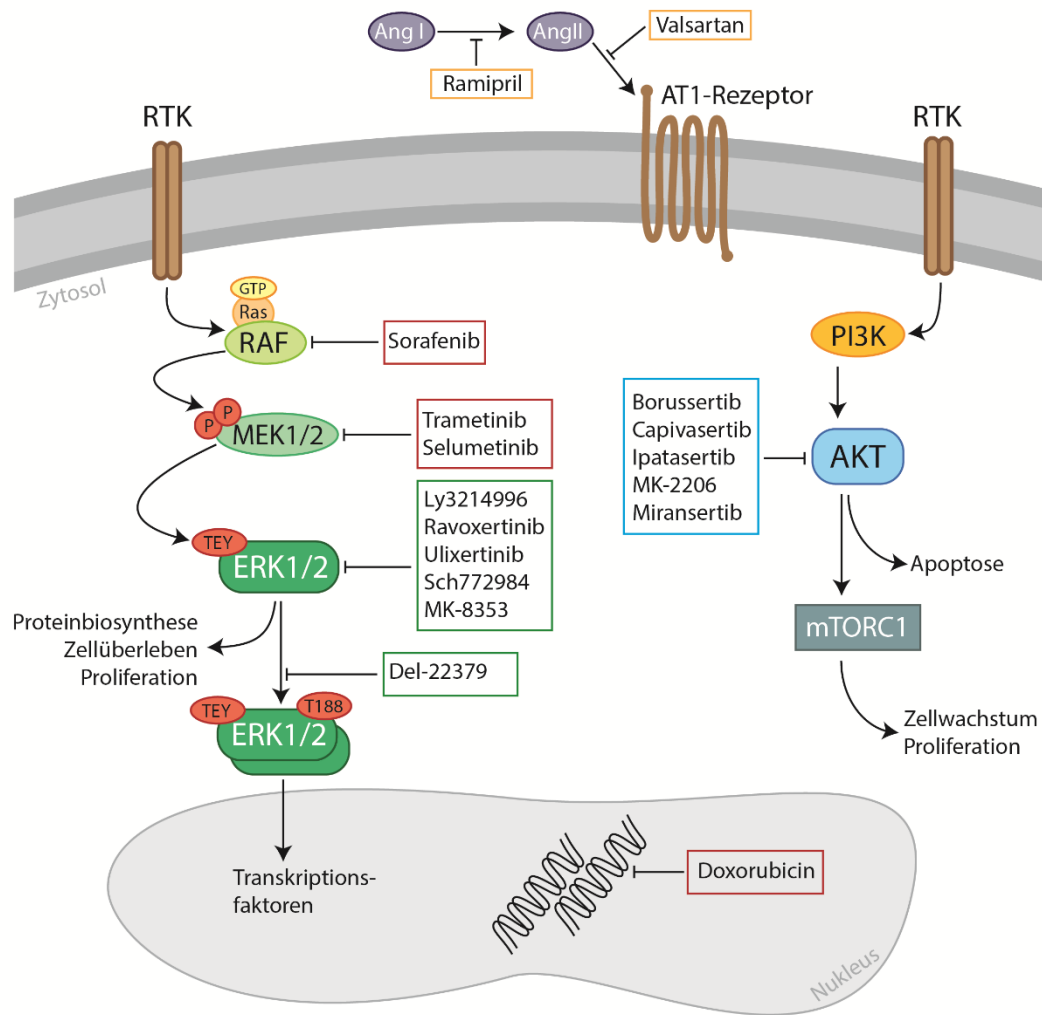
aufgereinigtes MEK mit einem  $IC_{50}$  von 12 nM [131].

Weitere Phase I-III Studien werden zurzeit durchgeführt, um die Wirkung von Selumetinib auf verschiedene andere Krebserkrankungen zu testen; darunter Neurofibromatose Typ2, niedergradige Gliome und akute lymphatische Leukämie. Zusätzlich soll Selumetinib in Kombination mit anderen Krebstherapeutika verwendet werden, um eine additive Wirkung zu erhalten. Für viele dieser Studien werden aktuell Teilnehmer rekrutiert [128,132–135].

Die Verabreichung von Selumetinib hat bei über 1 % der Patienten zu einer Reduktion in LVEF oder Sinustachykardie geführt. Obwohl die meisten dieser Nebenwirkungen nur zu asymptomatischen bis leichten Beschwerden geführt haben, wird zu einer Überprüfung der Herzfunktionen vor und während der Behandlung geraten [136].



**Abbildung 6** Strukturen der verschiedenen MEK-Inhibitoren.



**Abbildung 7** Schematische Darstellung der Lokalisation der verschiedenen Wirkstoffe in der Raf/MEK/ERK-Kaskade und der PI3K/AKT/mTORC1-Kaskade. Die von der FDA zugelassenen klinischen Wirkstoffe mit nachgewiesener Kardiotoxizität sind in Rot dargestellt; die von der FDA zugelassenen Wirkstoffe zur Behandlung von Bluthochdruck ohne kardiotoxischen Nebenwirkungen sind in Gelb dargestellt; die ERK-Inhibitoren sind in Grün dargestellt; und die AKT-Inhibitoren sind in Blau dargestellt.

### 1.3.4 ERK-Inhibitoren

#### DEL-22379

Das wasserlösliche, niedermolekulare 3-Arylidin-2-Oxindol Derivat DEL-22379 wurde erstmals 2015 von Herrero et al. beschrieben und ist potenter Dimerisierungs-Inhibitor von ERK2 [137]. DEL-22379 bindet in einer strukturellen Einkerbung im Dimerisierungs-Interface

von ERK2, wo es durch Ladungsabstoßung die Dimerisierung des Proteins verhindert, die Phosphorylierung und die Kinaseaktivität des Monomers jedoch nicht beeinflusst. Die Inhibierung erfolgte mit einem  $IC_{50}$  von 0,5  $\mu$ M in HEK293 Zellen [137,138].

Der mechanistische Nutzen der Dimerisierung von ERK2 ist nach wie vor umstritten [139–142]. Lorenz et al. zeigten, dass eine Dimerisierung von ERK2 zur Translokation in den Zellkern führt und eine Inhibierung der Dimerisierung durch den von ihnen entwickelten ERK-Dimerisierungs-Inhibitor (EDI) durch die Hemmung der Thr188-Autophosphorylierung eine Translokation verhindert [106,142]. Herrero et al. hingegen beobachteten nach Verwendung von DEL-22379 eine Reduktion von ERK1/2 Aktivität im Zytosol und eine Erhöhung seiner nuklearen Aktivität [137]. In beiden Fällen wurde jedoch beobachtet, dass die Inhibierung der Dimerisierung signifikante Eingriffe in die Tumorgenese ermöglichte und Apoptose induzierte. DEL-22379 zeigte signifikante Suppression von Tumorzellen sowohl in Tumorzelllinien als auch in Xenograftmodellen in Mäusen. Eine milde Toxizität konnte vorwiegend in Darmepithelien beobachtet werden [137]. Da noch keine klinischen Studien zu diesem Inhibitor durchgeführt wurden, konnte noch nichts über die Verträglichkeit von DEL-22379 im Menschen bestimmt werden.

#### Ly-3214996

Ly-3214996 ist ein ERK1/2 Inhibitor, der 2016 von Eli Lilly and Company entwickelt wurde und inzwischen in ersten klinischen Studien getestet wird. Ly-3214996 ist ein hochselektiver, ATP-kompetitiver ERK1/2 Inhibitor, der seine Antitumorwirkung durch Zellzyklushemmung und Apoptose vermittelt. Er inhibiert ERK1/2 in zellfreien Assays mit einem  $IC_{50}$  von je 5 nM.

In verschiedenen Krebszelllinien mit Modifizierungen im Raf/MEK/ERK-Signalweg, die gegen B-Raf-Inhibierung resistent waren, zeigte Ly-3214996 vielversprechende antiproliferatorische Wirkung. In Xenograftmodellen mit Tumoren, die Mutationen im MAPK-Signalweg aufwiesen, zeigte Ly-3214996 ebenfalls eine antiproliferatorische Wirkung [143,144]. Aktuell wird eine klinische Phase 1 Studie zu Ly-3214996 durchgeführt, die voraussichtlich Mitte bis Ende 2021 abgeschlossen wird (NCT2857270). Zuvor wurden keine Versuche in Menschen durchgeführt und es existieren keine Daten zur Verträglichkeit und der Pharmakokinetik von Ly-3214996 im Menschen.

### Ravoxertinib (GDC-0994)

Ravoxertinib ist ein Aminopyrimidin-Derivat, das 2016 von Genentech/Array BioPharma als ERK-Inhibitor zur Anwendung gegen Krebserkrankungen entwickelt und optimiert wurde. Es hatte gegenüber einer Reihe strukturähnlicher Derivate die beste Potenz und Selektivität und inhibierte ERK1/2 ATP-kompetitiv mit einem  $IC_{50}$  von 6,1 nM (ERK1) bzw. 3,1 nM (ERK2) [145]. In weiteren präklinischen Studien zeigte sich eine Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 Substraten und signifikant reduziertes Tumorwachstum [118]. Eine Phase 1 klinische Studie zur Dosisevaluierung von Ravoxertinib als Monotherapie in Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren zeigte eine gute Verträglichkeit in den Patienten und signifikante Effekte auf das Tumorwachstum. Die im Patienten beobachteten Serumkonzentrationen nahmen dosisabhängig zu und erreichten bei einer Dosis von 800 mg eine Konzentration von bis zu 10  $\mu$ M. Die in weiteren Studien verwendeten Dosen von 200 und 400 mg erreichten eine Dosis von 3,7 bzw. 5,2  $\mu$ M [117]. In einer Kombinationsstudie von Ravoxertinib mit dem MEK Inhibitor Cobimetinib wurden allerdings hohe Toxizität an den Patienten beobachtet und die Studie musste vor dem zeitlichen Abschluss abgebrochen werden. Die schwerwiegendsten Nebenwirkungen waren Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen; kardiotoxische Effekte wurden via Elektrokardiogramm überwacht, es wurden jedoch keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet [146].

### Sch772984

Sch772984 ist ein hochsensitiver ERK1/2 Inhibitor, der 2013 von Merck entwickelt und getestet wurde. Sch772984 wirkt ATP-kompetitiv und bindet dual-spezifisch sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes ERK. Obwohl es auch die Phosphorylierung von ERK zu verhindern scheint, konnte keine Wirkung auf MEK1 nachgewiesen werden. Es inhibiert ERK1/2 mit einem  $IC_{50}$  von 4 nM (ERK1) bzw. 1 nM (ERK2), MEK1 hingegen erst mit über 10  $\mu$ M [147]. Sch772984 zeigte in verschiedenen *in vitro* und Xenograftmodellen bei unterschiedlichen Krebsarten vielversprechende Effekte, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Inhibitoren [148–150]. Sch772984 wurde noch nicht in klinischen Studien an Patienten untersucht und Daten zur Pharmakokinetik und Verträglichkeit existieren daher noch nicht.

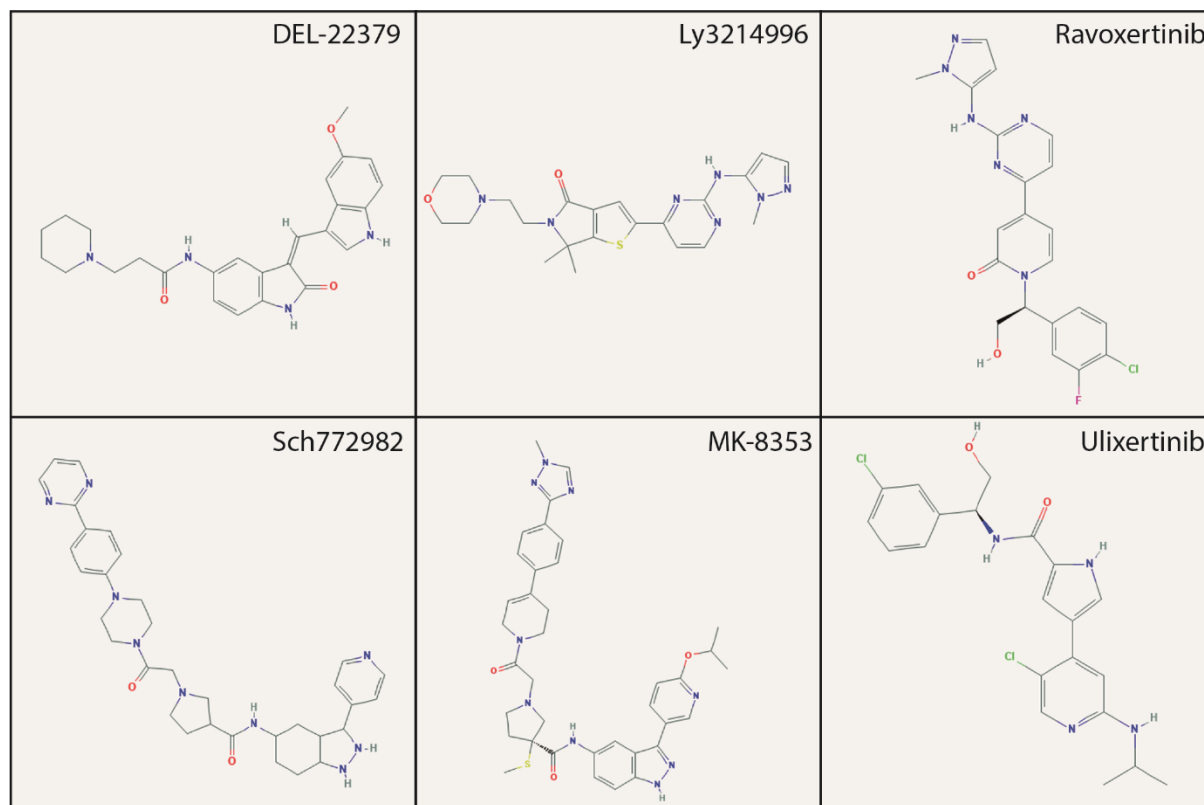


## MK-8353

Nachdem Sch772984 vielversprechende Ergebnisse gezeigt hat, entwickelte Merck 2018 den von SCH772984 strukturell abgeleiteten dual-spezifischen ERK-Inhibitor MK-8353. Durch die Addition einer 3(S)-Thiomethylpyrrolidin-Gruppe an einer metabolisch relevanten Stelle in der Struktur von SCH772984 konnte die Bioverfügbarkeit und die Verträglichkeit verbessert werden. Die *in vitro* Kinasehemmung von ERK1/2 gelang mit einem IC<sub>50</sub> von 20 nM (ERK1) bzw. 7 nM (ERK2) [151]. Der neuentwickelte Inhibitor wurde in präklinischen Studien auf seine Aktivität, Pharmakodynamik und optimale Dosierung untersucht und schließlich auch in klinischen Phase 1 Studien getestet. Klinische Studien zeigte eine mit Sch772984 vergleichbare Potenz in verschiedenen Krebsmodellen. Die vielversprechendste Wirkung zeigte MK-8353 gegen BRAF<sup>V600</sup>-mutierte Melanome. Die maximale Serumkonzentration nahm in Patienten proportional mit der Dosis zu. Bei einer Dosis von 400 mg wurden nach wiederholter Einnahme an Tag 15 eine maximale Serumkonzentration von 10 µM beobachtet. Die am stärker auftretenden Nebenwirkungen durch eine Verabreichung von MK-8353 bezogen sich auf den Magen-Darm-Trakt. Es wurden bisher keine kardiotoxischen Effekte beobachtet [152].

## Ulixertinib (BVD-523)

Ulixertinib ist ein Pyridin-Pyrol Derivat, das aktuell in klinischen Studien auf seine Effektivität gegen verschiedene Tumore getestet wird. Ulixertinib ist ein kompetenter ATP-kompetitiver ERK1/2 Inhibitor. Ulixertinib führt zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung von phosphoryliertem ERK1/2, inhibiert jedoch die Kinaseaktivität und verhindert so die Phosphorylierung der nachfolgenden Zielproteine. In zellfreien Assays zur Kinasehemmung inhibierte Ulixertinib ERK2 mit einem sehr niedrigen IC<sub>50</sub> von 0,3 nM [153,154]. Erste klinische Studien wurden zur Dosisoptimierung in verschiedenen festen Tumoren durchgeführt. Ulixertinib zeigte hier gute antiproliferatorische Wirkung in NRAS, BRAF<sup>600</sup> und non-BRAF<sup>600</sup> Tumoren. Die höchste in Patienten beobachtete stabile Serumkonzentration des Wirkstoffes lag bei etwa 5 µM bei einer Dosis von 600-900 mg zweimal täglich [119]. Die häufigsten Nebenwirkungen der Behandlung waren Ausschlag, Übelkeit und Diarrhö; kardiovaskuläre Nebenwirkungen wurden in der Studie nicht beobachtet [118,119].



**Abbildung 8** Strukturen der verschiedenen ERK-Inhibitoren.

## 1.4 PI3K/AKT und Raf/MEK/ERK im Herzen

Die PI3K/AKT- und die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade werden im Körper ubiquitär exprimiert und spielen auch im Herzen eine wichtige Rolle. Beide Signalwege werden abhängig von ihren Stimuli und der Art und Dauer ihrer Aktivierung sowohl mit kardioprotektiven Effekten als auch mit pathologischer Hypertrophie in Zusammenhang gebracht [155,156]. So zeigt die kurzzeitige Aktivierung von AKT im Herzen protektive Wirkung und unterstützt das physiologische Herzwachstum und die kontraktile Funktion. AKT Aktivierung soll die Angiogenese und den Glucosemetabolismus im Myokard unterstützen und durch die Unterdrückung von Apoptose und Autophagie vor Myokardschädigung schützen. Zusätzlich scheint AKT durch seine indirekte Aktivierung der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (Serca2a) das Calcium-Cycling und somit die kontraktile Funktion des Herzens positiv regulieren zu können [155–159]. Allerdings scheint die PI3K/AKT-Kaskade bei langanhaltendem Stimulus eine herzscheidende Wirkung zu zeigen, die sich in hypertrophem Wachstum und kardialer Dysfunktion äußert. Eine dauerhafte Aktivierung von AKT wandelt die ursprünglich protektiven Mechanismen in pathologische

Effekte um. Es wird postuliert, dass die Angiogenese mit dem hypertrophen Wachstum des Herzens nicht mithalten könne und zu pathologischen Effekten im Herzen führe. Die Aktivierung von bestimmten Genen durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die subsequente Schädigung der Mitochondrien trage zusätzlich zur Pathologie bei [160,161].

Die Raf/MEK/ERK Kaskade ist durch ihre Einflussnahme auf Zellwachstum und Proliferation ein wichtiger Faktor in der Entwicklung des Herzens. Zusätzlich ist die Aktivierung dieser Kaskade am adaptiven und pathologischen Herzwachstum maßgeblich beteiligt. Zum Ausgleich einer erhöhten Belastung des Herzens wird durch die RAF/MEK/ERK Kaskade das hypertrophe Herzwachstum vermittelt. Die Art, Dauer und Lokalisation des initialen Stimulus kann diesen zunächst adaptiven Prozess zu einer pathologischen Remodellierung des Herzens umwandeln, die durch Fibrose, Apoptose und linksventrikuläre Funktionsstörung zu Herzversagen führen kann [162].

Die Dimerisierung von ERK1/2 zu Homo- oder Heterodimeren ermöglicht die Vermittlung dieses Stimulus über eine Autophosphorylierung an der Stelle Thr208/Thr188. Dies bedingt die Translokation von ERK1/2 in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und zu kardialer Hypertrophie beitragen können [107,162,163]. Eine Inhibierung dieser Dimerisierung und der darauffolgenden Translokation zeigte kardiale Protektion gegen pathologische Hypertrophie [142].

## 1.5 Präklinische *in vitro* Testverfahren für Kardiotoxizität

Die aktuell in der Klinik verwendeten Krebstherapeutika besitzen trotz langwieriger Entwicklung ein breites Spektrum an Kardiotoxizitäten. Auch neue Substanzen, die sich aktuell in der Entwicklung befinden, greifen oft Signalwege an, die wichtige Prozesse im Herzen regulieren. Wirksame Krebstherapeutika zu finden, die eine möglichst geringe kardiotoxische Wirkung haben, war seit jeher ein relevantes Problem. Ein großer Mangel in der aktuellen Entwicklung dieser Substanzen liegt oft im Fehlen von guten *in vitro* Testverfahren zur Früherkennung von kardiotoxischen Effekten. Das Ziel von präklinischen *in vitro* Testverfahren von Wirkstoffen ist eine möglichst frühe und effiziente Erkennung von potenziell toxischen Substanzen zur Vermeidung von Risiken für Patienten in späteren klinischen Studien sowie Einsparung von Entwicklungszeit und –kosten [11]. Dies wurde in der Vergangenheit mit verschiedenen Verfahren versucht anzugehen (ICH Richtlinie, CiPA-Initiative), die sich allerdings aufgrund ihrer unzureichenden Vorhersagegenauigkeit nicht haben durchsetzen

können. Diese Testverfahren beschränkten sich häufig auf sehr spezifische Mechanismen, Signalwege oder Ionenkanäle, die mit kardiotoxischer Dysregulation in Verbindung gebracht werden konnten [5,6,11]. Solche hochselektiven Verfahren können jedoch durch falsch-positive Ergebnisse schnell zu einer voreiligen Ablehnung von vielversprechenden Substanzen und durch falsch-negative Ergebnisse aufgrund ihrer hohen Spezifität zu einem hohen Risiko für Patienten führen [164].

In der Vergangenheit wurden mehrfach Versuche unternommen, rechtlich einheitliche Verfahren zu entwickeln und zu etablieren. Die *International Council for Harmonisation* (ICH), ein Zusammenschluss der EU, Japan, USA, Kanada und der Schweiz zur Erschaffung von einheitlichen technischen Standards zur Erleichterung der gegenseitigen Anerkennung und Zulassung von Substanzen, erstellte 2005 die ersten einheitlichen Richtlinien zur *in vitro* Identifizierung von kardiotoxischen Substanzen. Die aktuelle von der ICH festgelegte Richtlinie zur Früherkennung von Kardiotoxizität (Topic S7B, E14) legt den Fokus auf die Vermeidung einer spezifischen Form von medikamenteninduzierter Arrhythmie, i.e. *torsades de points* (TdP), durch die spezifische Überwachung der Funktion des hERG-Kanals [165]. Diese Arrhythmie zeigt sich als Verlängerung des QT Intervalls im Schlagrhythmus des Herzens und bedingt eine Verzögerung der Repolarisation des Herzmuskels. Diese Form der ventrikulären Arrhythmie kann schwerwiegende bis tödliche Folgen in Patienten haben. Ein relevanter Mechanismus, der zu dieser verzögerten Repolarisation führen kann, ist die Blockade des hERG-Kanals, ein spannungsgesteuerter Kalium-Kanal (auch  $K_v11.1$  Kanal genannt). Die frühe Erkennung einer medikamenteninduzierten Blockade dieses Kanals zeigte eine hohe Übereinstimmung mit klinischer QT Intervall Verlängerung in Patienten. Der Abbruch der Entwicklung so identifizierter Substanzen führte zu einer Reduktion von TdP in Patienten Studien. Allerdings zeigte sich vermehrt, dass eine Blockade der hERG Kanals nicht zwangsläufig kausal zu einer Arrhythmie führt und falsch positive Ergebnisse zum Abbruch von Substanzen geführt haben, die andernfalls vielversprechende Ergebnisse hätten liefern können [6,165].

Eine weitere Initiative zur besseren Erkennung vom pro-arrhythmischen Potential der Substanzen bildet seit 2013 das *Comprehensive in vitro Pro-arrhythmia Assay* (CiPA) [166]. Die CiPA Initiative ist ein Zusammenschluss verschiedener Kollaborateure wie der FDA, der EMA, Health Canada und PMDA Japan. Ihr Ziel ist es, die ICH Richtlinien zu optimieren und eine bessere Risikoevaluierung der pro-arrhythmischen Wirkung neuer Wirkstoffe zu etablieren. Das von der CiPA etablierte Vorgehen basiert auf drei unterschiedlichen

präklinischen Studienansätzen. Zunächst eine *in vitro* Evaluation des Substanzeinflusses auf verschiedene humane kardiale Ionenkanäle. Die hieraus gewonnenen Informationen werden in einer *in silico* Rekonstruktion der humanen ventrikulären Elektrophysiologie getestet und letztlich in aus humanen Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten verifiziert [6,166]. Die CiPA Initiative sieht abschließend eine Bestätigung dieser Ergebnisse und eine Untersuchung von bis dahin unerwarteten Nebenwirkungen in klinischen Studien vor.

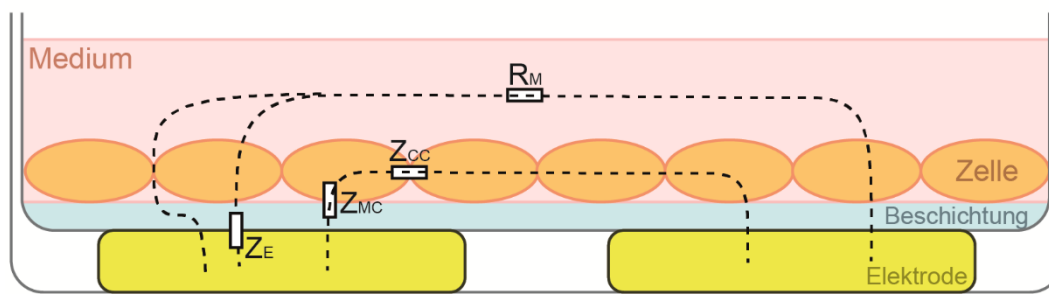
Unabhängig von internationalen Vereinigungen wie der ICH und der CiPA, gab es viele individuelle Ansätze *in vitro* Verfahren zur Untersuchung von Kardiotoxizität mit hohem Durchsatz zu entwerfen und zu optimieren. Verschiedene Ansätze bildeten hier das Multi-Elektroden Array (MEA), verschiedene Patch-Clamp Methoden, Untersuchungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und Impedanzmessungen [165,167]. Sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Systemen gibt es Zusammenhänge zwischen Arzneimittel-induzierter Kardiotoxizität und Veränderungen des zellulären und organismischen Metabolismus. Verschiedene *in vivo* Studien in Mäusen und Ratten zeigten Zusammenhänge von metabolischen Veränderungen und kardiotoxischen Nebenwirkungen [168–171]. Die Evaluierung von Veränderungen im Metabolismus von Zellen als Vorzeichen von Kardiotoxizität wurde untersucht, um einen Ansatzpunkt zu finden, der besseren Aufschluss über spätere Nebeneffekte von Wirkstoffen geben kann, bevor man *in vivo* Studien beginnt [12]. Die *in vitro* Studien in Zellkultur zeigten dosisabhängige metabolische Veränderungen, was bei einer Früherkennung von Kardiotoxizität helfen kann, aber nicht ausreichend viele Parameter abdeckt, um ein hinreichend genaues Bild zu liefern [12]. Schnelle Verfahren mit einem hohen Durchsatz sind notwendig, um schnell eine große Zahl verschiedener Wirkstoffe zu charakterisieren und nur die vielversprechendsten für weitere zeit- und kostenintensive Entwicklung zu verwenden.

### 1.5.1 Impedanz-Messverfahren als *in vitro* Früherkennung für Kardiotoxizität

Die Impedanzmessung von Zellen ermöglicht die zeitaufgelöste Analyse von verschiedenen Zellcharakteristika zur Darstellung der zellulären Reaktion auf diverse Stimuli. Zelluläre Impedanzsysteme verwenden Goldfilm-Elektroden am Boden der Vertiefungen von Multi-Well Zellkulturplatten. Die Impedanzmessung basiert auf einem schwachen Wechselstrom, der zwischen der Messelektrode und der Referenzelektrode angelegt wird. In diesem System dienen die Zellen und das Zellkulturmedium als Elektrolyt und der Widerstand, der sich so ausbildet, ist abhängig von der Dichte der Zellmonoschicht und der Zellmorphologie. Die vom Gerät

ausgegebene Impedanz ( $Z$ ) ergibt sich aus Ohms Gesetz basierend auf der angelegten Stromstärke ( $I$ ) und der gemessenen Spannung ( $V$ ) des Wechselstroms ( $Z=V/I$ ). Zur Messung von verlässlichen Impedanzwerten reicht eine Stromstärke im Mikroampere-Bereich und eine daraus resultierende niedrige Spannung aus, was einen Einfluss der Messung auf die Morphologie, die Elektrophysiologie oder die Gesundheit der Zellen ausschließt. Ebenso zeigte sich kein Einfluss der zelleigenen Elektrophysiologie auf die externe Impedanzmessung [172–174].

Die Impedanz des Stromflusses ergibt sich aus den verschiedenen Wegen, den der Strom zwischen den Elektroden nehmen kann, i.e. transzellulär, parazellulär und subzellulär. Hier wirken sich verschiedene Aspekte wie Morphologie, Zell-Zell-Verbindungen und Adhäsion auf die Impedanz aus (Abb. 9). Verschiedene Frequenzen des Wechselstroms werden unterschiedlich stark durch die einzelnen Parameter beeinflusst und ermöglichen es, den Fokus der Messung auf verschiedene Bereiche zu legen. Niedrige Frequenzen bevorzugen den extrazellulären Weg durch das Medium, während höhere Frequenzen den Weg durch die Zellmembranen nehmen. Die Frequenz des Stroms auf verschiedene Ziele anzupassen, ermöglicht es, bestimmte Aspekte der kultivierten Zellen, wie zum Beispiel Morphologie oder Adhäsion, präzise zu beobachten und Veränderungen zu evaluieren. Verschiedene Impedanzsysteme können so durch geschicktes kombinieren verschiedener Frequenzen Aufschluss geben über z.B. GPCR Signalweiterleitung, dosisabhängiges Zellsterben, Veränderungen in *tight-junctions* oder Adhärenz. Messungen über nur eine Frequenz ermöglichen eine schnelle Datenaufzeichnung zur Bestimmung der morphologischen Veränderung von spontan schlagenden Kardiomyozyten. Diese Methode der Datenaufzeichnung wird von den Cardio-Impedanzsystemen xCelligence (ACEA) und dem in dieser Arbeit verwendeten CardioExcite96 (Nanon) zur Messung von Kardiomyozyten verwendet [172,173,175–180].



**Abbildung 9** Schematische Darstellung der Impedanzmessung in einer voll ausgebildeten Zellmonoschicht. Die Zellen adhären auf dem beschichteten Boden der Kulturplatte. Ein Wechselstrom fließt zwischen der Referenz- und der Messelektrode. Der Strom fließt dabei durch das Medium sowie die Zellen und ist somit abhängig von der Dichte und Morphologie der Zellmonoschicht. Der Weg, den der Strom nimmt, hängt zusätzlich von der Frequenz des Wechselstroms ab. Der angegebene Parameter  $R_M$  beschreibt den Widerstand des Zellkulturmediums, die Modellparameter  $Z_{CC}$ ,  $Z_{MC}$  und  $Z_E$  stellen die Transferimpedanz zwischen den Zellen, Zellen und Medium sowie der Elektrode und dem Medium, dar (nach Doerr et al., 2015).

Die Vorteile der Impedanzmessung liegen jedoch nicht nur im breiten Anwendungsspektrum und den vielfältigen Ergebnissen, die es liefert. Da die Messung ausschließlich auf den geringen Wechselströmen und den daraus resultierenden Impedanzwerten beruht, kommt die Methode gänzlich ohne die Notwendigkeit von Labeln wie Radioaktivität, Detektionsfärbungen oder enzymatischen Reaktionen aus. Da die Methode auch die Gesundheit oder Funktion der zu messenden Zellen nicht beeinflusst, ermöglicht sie eine kontinuierliche Langzeitmessung der funktionellen Zellparameter. Je nach verwendeten Zellen können so Messungen über mehrere Tage bis zu wenigen Wochen durchgeführt werden, was viele der alternativen Methoden mit einer Messzeit von nur wenigen Stunden weit übertrifft [5,172]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die hohe Auflösung der Messungen. So ist es möglich via Impedanzmessung morphologische Veränderungen mit bis zu einem Nanometer Auflösung zu bestimmen [181], was herkömmliche Lichtmikroskopie um nahezu das 200-fache übertrifft [173].

Nachdem Impedanzsysteme bereits zur Messung von zellulärem Überleben und Adhäsion verwendet wurden, um allgemeine zelluläre Toxizität zu bestimmen, wurden diese weiterentwickelt, um auch die morphologischen Veränderungen von schlagenden Zellen wiederzugeben. In den letzten Jahren hat sich die zelluläre Impedanzmessung zur *untargeted* Untersuchung von Wirkstoff-induzierten kardiotoxischen Effekten von Medikamenten durchgesetzt. Impedanz-basierte Assays liefern eine Reihe an Messwerten zur funktionalen

Integrität der Zellen zur Evaluierung toxischer Effekte und ermöglichen mit ihrem Multi-Well Format einen schnellen Durchsatz von Messungen zur schnellen und verlässlichen Evaluierung der Wirkung von Substanzen auf Kardiomyozyten [5,172]. Zur Messung von spontan schlagenden Zellen wie Kardiomyozyten und ihrer Funktion sind die wichtigsten Parameter die *Baseline* der Impedanz zur Darstellung des Zellüberlebens und der Anhaftung an den Elektroden sowie die Oszillation der Impedanz, abhängig von der Veränderung der Zellmorphologie während der Schläge. Die Base-Impedanz gibt an, wie dicht die Zellen in der Monoschicht vorliegen und wie ausgeprägt die Zell-Zell-Verbindungen sind. Wenn die Zellschicht vollständig ausgebaut ist, erreicht die Base-Impedanz einen Wert, der um das 100-fache größer ist als die Oszillation der Impedanz, ausgelöst durch die Schläge. Eine signifikante Abnahme der Impedanz in dieser Größenordnung spiegelt die Ablösung der Zellen von der Elektrode wider. Dies kann durch Absterben oder Verlust der Adhärenz der Zellen zur der Elektrode bedingt sein. Eine Unterscheidung der Ursachen ist nur durch Impedanzmessung nicht möglich und es empfiehlt sich eine Ergänzung der Messung um die Analyse weiterer Parameter wie z.B. ein ATP-Assay. Die Oszillation der Impedanz abzüglich der Base-Impedanz in Abhängigkeit ist ein Maß der Zellbewegung während der Schläge und gibt Aufschluss über die Schlagfrequenz (*beats per minute*), die Amplitude der Schlagstärke und die Gleichmäßigkeit der Kontraktionen [172,173,175,180].



## 1.6 Zielsetzung

Die stetig steigende Lebenserwartung der Bevölkerung führt zu immer höherer Inzidenz von Tumorerkrankungen. Die zugrundeliegenden unterschiedlichen Mechanismen dieser Krankheiten und die vielen Aspekte, die die Behandlung beeinflussen können, erfordern eine stetige Weiterentwicklung der Behandlungsmöglichkeiten. Insbesondere kardiotoxische Nebenwirkungen rücken immer mehr in den Vordergrund. Viele der aktuell wirksamsten Krebstherapien verursachen schwerwiegende Schäden am Herzen, werden aber in Ermangelung guter Alternativen weiterhin eingesetzt. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe gestaltet sich im Hinblick auf kardiotoxische Effekte zusätzlich als schwierig, da es wenige zuverlässig Methoden gibt, um die Kardiotoxizität präklinisch zu untersuchen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mithilfe eines Impedanzmesssystems einen methodischen Ablauf zu entwerfen und zu evaluieren, der für die schnelle und standardisierte Charakterisierung von Kardiotoxizität in neuen Chemotherapeutika geeignet ist. Hierzu wird in dieser Arbeit das Impedanzmesssystem CardioExcite96 von Nanion verwendet. Neonatale Mauskardiomyozyten, die in der Lage sind, spontan zu kontrahieren, wurden als primäre Herzmuskelzellen eingesetzt. Zunächst wird die Vorhersagegenauigkeit dieses Assays mithilfe von Wirkstoffen aus der Klinik, die bereits auf ihre Kardiotoxizität charakterisiert wurden, untersucht. Hierzu dienen vier kardiotoxische Krebstherapeutika und zwei nicht-kardiotoxische Substanzen, die zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt werden. Ein Vergleich des Impedanzassays mit weiteren *in vitro* Assays soll zusätzlich Auskunft über die Aussagekraft der Impedanzmessung geben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll das Impedanzassay auf verschiedene Kinaseinhibitoren angewendet werden, die sich momentan in der Entwicklung für die Krebstherapie befinden. Die Impedanzmessung und der Vergleich zu den Ergebnissen der bekannten Wirkstoffe dient zur Charakterisierung der Kardiotoxizität dieser Substanzen.

Die erfolgreiche Entwicklung eines zuverlässigen, kosteneffizienten Assays mit hohem Durchsatz würde der Entwicklung neuer Therapeutika zugutekommen. Eine standardisierte Methode würde zusätzlich die Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Quellen verbessern und eine Entwicklung so beschleunigen.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Chem Solute
Alexa Fluor© 488 Phalloidin	Invitrogen
Ammoniumpersulfat	Roth
$\beta$ -Nikotinamid Adenin Dinukleotid (NAD)	Sigma-Aldrich
Benzamidin	Applichem
Bovines Rinderserum (BSA)	Applichem
Bromphenolblau	Applichem
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat Dihydrat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem
Essigsäure, Glacial	Sigma-Aldrich
Ethanol	Sigma-Aldrich
Fluoromount	SouthernBiotech
Glycerin (85 %)	Roth
Glycin	Carl Rot
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Iodnitrotetrazoliumchlorid (INT)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
L-Lactic Dehydrogenase (LDH)	Sigma-Aldrich
Lithium L-Laktat	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Applichem
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth
Methanol $\geq 99,9$ %	Roth
Methoxyphenazin Methosulfat (MPMS)	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Serva
Natriumchlorid	TH Greyer
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Natriumhydrogencarbonat	ChemSolute
Natriumhydrogenphosphat	Roth

Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Natrium-Laktat	Sigma-Aldrich
NP-40	Applichem
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Phenazin-Methodulfat (PMS)	Sigma-Aldrich
Phenylephrin	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lsg. 30 %	Roth
Salzsäure 37 %	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Applichem
Thiazolylblau Tetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	Alfa Aesar
Triethanolamine	Sigma-Aldrich
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Applichem
TRIS Base	VWR
Triton X	Chem Solute
Trypsin-Inhibitor aus der Sojabohne	Sigma-Aldrich
Tryptan Blau Lösung	Sigma-Aldrich
Tween 20	Chem Solute
Vitamin B12	Sigma
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid	Sigma-Aldrich

---

## 2.2 Inhibitoren

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Borussertib	Arbeitsgruppe von Prof. Rauh (TU Dortmund)
Capivasertib	Selleck chemicals
Del-22379	Merck
Doxorubicin	Sigma-Aldrich
Ipatasertib	Selleck Chemicals
Ly3214996	Selleck Chemicals
Miransertib	Selleck Chemicals

---

MK-2206	Selleck Chemicals
Ravoxertinib	Selleck Chemicals
SCH772984	Biomol
Selumetinib	Cayman
Sorafenib	Absource Diagnostics GMBH
Trametinib	Biomol
Ulixertinib	Selleck Chemicals

---

### 2.3 Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
CellTiter-Glo Lumineszenz Cell Viability Kit	Promega
Neonatal Heart Dissociation Kit mouse/rat	Miltenyi Biotec

---

### 2.4 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser, 18 mm	Marienfeld
Goldelektrodenplatte NSP96 – 2.0mm	Nanion
Lumineszenzplatte	Brand
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	Biorad
Superfrost Objectträger	Thermo Scientific
Zellkulturplatten, 6/12/24/96-Well	Sarstedt
Zellkulturschalen, 10/15 cm	Sarstedt

---

## 2.5 Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Bromodesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, /Ca u. Mg	Gibco
Dulbecco's modified eagle medium, 4,5 g/l Glucose	PAN Biotech GmbH
Fetales Kalbsserum (FCS)	Merck
Fibronektin bovine Serum	Sigma-Aldrich
L/D Glutamin	PAN Biotech GmbH
Penicillin (10 kU/ml) / Streptomycin (10 kU/ml)	PAN Biotech GmbH
Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin in 0,02 % EDTA-Na)	PAN Biotech GmbH

## 2.6 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Vertreiber	Katalog Nr.
G $\beta$	Kaninchen	1:5000	Santa Cruz	Sc-378
ERK1/2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9102
Phospho-AKT S473	Kaninchen	1:5000	Abcam	ab81283
Phospho-ERK1/2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9101
Phospho-P90RSK S380	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9341
Phospho-PRAS40 T246	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2997
Peroxidase-konj. 2 <sup>nd</sup> AK	Goat-anti-Rabbit	1:10 000	Dianova	111-035-144

## 2.7 Biologisches Material

### 2.7.1 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
H9c2	Myoblastische Zellen aus Ratten	Sigma-Aldrich
NMCM	Neonatale Mauskardiomyozyten	Eigene Präparation (s 3.1.1)

### 2.7.2 Tiere

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
FVB/N Mäuse	Janvier

### 2.8 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Amersham Imager	GE Healthcare
Synergy neo 2	BioTek
CardioExcyte96 Impedanzmessgerät	Nanion
Gelelektrophoresekammer	Biorad
GentleMACS Octo Dissociator	Miltenyi Biotec
Leica SP8 konfokales Fluoreszenzmikroskop	Leica
Platereader Spark 20M	Tecan

### 2.9 Programme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Illustrator CC 2018	Adobe
ImageQuant TL	GE Healthcare
Image J (Fiji)	Wayne Rasband (NIH)
LasX	Leica
Photoshop CC 2018	Adobe
Prism 8/9	Graphpad
Office 2016	Microsoft

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Präparation von neonatalen Mauskardiomyozyten

Die Präparation von neonatalen Mauskardiomyozyten (NMCM) erfolgte aus 1-3 Tage alten FVB/N Mäusen und wurde den Herstellerangaben von Miltenyi Biotec entsprechend durchgeführt.

Die Mausherzen wurden entnommen, in DPBS gewaschen, die Vorhöfe entfernt und die Herzen mit einer Schere zerkleinert. Die Herzen wurden in die vorgesehenen Gefäße überführt, der Enzym-Mix nach Herstellerangaben hinzugefügt, die Gefäße in dem gentleMACS Octo Dissociator platziert und eine Stunde bei 37 °C dissoziiert. Das Zellpellet wurde anschließend in DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) resuspendiert und filtriert (70 µm Maschenweite). Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 600 g zentrifugiert und das Pellet anschließend in MEM (ohne BrdU u. FCS) resuspendiert und in eine 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Nachdem die Zellen eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurden, wurde das Medium samt den Zellen in ein Becherglas übertragen, die Platte einmal mit Medium gespült und anschließend 50 µl der Zellsuspension 1:1 mit 0,4 % Tryptan-Blau-Lösung versetzt und in einer Neubauerzählkammer gezählt [182]. Abschließend wurden die Zellen mit MEM (5 % FCS) verdünnt und in entsprechender Zellzahl auf die verschiedenen Platten ausplattiert und bei 37 °C und 1 % CO<sub>2</sub> bis zum Versuch gelagert.

#### MEM-Medium

MEM	10,5 g/L
Natriumhydrogencarbonat	350 mg/L
Vitamin B12	1 ml/L
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
BrdU	29 mg/L
FCS	5 % / 0 % (v/v)
In H <sub>2</sub> O, pH 7,3	

### 3.1.2 Kultivierung von H9c2 Zellen

Bei H9c2-Zellen handelt es sich um aus Ratten gewonnenen Myoblasten, die häufig an Stelle von myokardialen Primärzellen verwendet werden.

Zum Erhalt der Zelllinie wurden die Zellen bei Erreichen von ca. 75 % Konfluenz regelmäßig aufgeteilt und in neues Medium überführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA versetzt und solange bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (ca. 3-5 min), bis sie sich von der Zellkulturschale abgelöst haben. Die gelösten Zellen wurden in Vollmedium aufgenommen und in geeigneter Verdünnung neu ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten.

Vollmedium	
FCS	10 % (v/v)
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
In DMEM (4,5 g/L Glukose)	

### 3.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von H9c2 Zellen

Zur längeren Lagerung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Hierzu wurden Zellen in eine große Zellkulturschale mit 80 % Konfluenz zunächst mit DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst. Die gelösten Zellen wurden in 10 ml Vollmedium aufgenommen und 5 min bei 200 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und auf Kryoröhrchen aufgeteilt (à 1 ml). Zum vorsichtigen Einfrieren der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einem Nalgene® Mr. Frosty Cryo Freezing Behälter, gefüllt mit Isopropanol, platziert und für 6 h bei -80 °C gefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen anschließend in einem Kryotank verstaut.



## Einfriermedium

FCS	20 % (v/v)
DMSO	5 % (v/v)
DMEM	75 % (v/v)

### 3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Auszählung der Zellen in einer Zellsuspension wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Hierzu wurden zunächst 50 µl der Zellsuspension 1:1 mit 0,4 % Trypan-Blau-Lösung versetzt [182] und anschließend 10 µl dieser Mischung in die Neubauer Zählkammer gegeben. Unter einem Mikroskop wurden 4x16 Kästchen ausgezählt und anschließend der Durchschnitt ( $Z_d$ ) mit Formel 1 auf die Gesamtkonzentration ( $c_1$ ) zurückgerechnet.

$$(1) \quad c_1 \left[ \frac{z}{\text{ml}} \right] = Z_d * 2 * 10000$$

Anschließend wurde Formel 2 verwendet, um das zu verwendende Volumen ( $V_1$ ) für verschiedene Zellkonzentrationen ( $c_2$ ) oder absolute Zellzahlen ( $Z_{ab}$ ) zu berechnen. Hierbei gilt  $c_1 > c_2$  und  $V_{\text{end}} \leq V_1$ .

$$(2) \quad V_1 [\text{ml}] = \frac{c_2 \left[ \frac{z}{\text{ml}} \right] * V_{\text{end}} [\text{ml}]}{c_1 \left[ \frac{z}{\text{ml}} \right]} = \frac{Z_{ab}[z]}{c_1 \left[ \frac{z}{\text{ml}} \right]}$$

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Herstellung von Zellysaten aus NMCM

Die Zellen (s. 3.1.1) wurden auf eine mit Polylysin beschichtete 12-Well Platte ausgesät (500k Zellen pro Well) und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Vormittag wurde das Medium zu 1 % FCS MEM gewechselt und die Zellen einen weiteren Tag inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren auf Eis überführt und das Medium abgesaugt. Pro Well wurden 100 µl gekühlter Lysispuffer zugegeben. Die lysierten Zellen wurde anschließend aus den Kulturschalen abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Sonifizieren der Zellen (1x 1 s, 50 %) wurden die Lysate 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Untersuchung in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

## Lysispuffer

2x TSE	20 ml
10x IBX	4 ml
Triton X	0,4 ml
H <sub>2</sub> O	Ad 40 ml
PI (kurz vor Verwendung hinzufügen)	1 % (v/v)
PMSF (kurz vor Verwendung hinzufügen)	1 % (v/v)

## 2x TSE Puffer

TRIS	100 mM
NaCl	600 mM
EDTA	10 mM
NaN <sub>3</sub>	0,02 % (w/v)
In H <sub>2</sub> O, pH 7,4	

## 10x IBX

NaF	500 mM
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	50 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) (10 %)	0,02 % (v/v)
In H <sub>2</sub> O	

## 100x PI

Trypsin-Inhibitor aus der Sojabohne	2 g/L
Benzamidin	6 g/L
In TRIS 50 mM, pH 7,4	

## PMSF

PMSF	100 mM
In Ethanol	

### 3.2.2 SDS-PAGE

Zur Analyse spezifischer Proteine wurden diese über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Diese Methode ermöglicht eine gute Trennung über Molekülgrößen von 5 bis 250 kDa. Hierfür wurden Gele bestehend aus zwei Dichten verwendet. Das Gel besteht aus einem Sammelgel mit 4 % Acrylamid am oberen Ende und einem Trenngel mit 12,5 % Acrylamid im Rest. Der Anteil an Acrylamid im Gel bestimmt den Grad der Verkettung innerhalb des Gels und damit die Porengröße, welche die Proteine durchwandern müssen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt so über die größenabhängige Durchlaufzeit durch das poröse Gel. Zur Auftrennung der Proteine im Gel werden diese mithilfe des Tensids SDS negativ geladen und denaturiert. Die Proteinlysate wurden 1:3 mit 4x Lämmli Puffer versetzt und je 10 µl in die Taschen des Acrylamidgels gefüllt. Als Kontrolle der Molekülgröße wurde ein Proteinstandard der Firma Biorad (Dual Color Precision Plus) verwendet. Der Lauf der Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V für ca. 1 h in 1x SDS-Laufpuffer.

#### Sammelgel, 4 % Acrylamid

H <sub>2</sub> O	7,5 ml
Sammelgelpuffer (4x)	3 ml
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis Lösung 30 %	1,5 ml
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	12 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (100 g/L)	120 µl

#### Trenngel, 12,5 % Acrylamid

H <sub>2</sub> O	10 ml
Trenngelpuffer (4x)	7,5 ml
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis Lösung 30 %	12,5 ml
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	15 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (100 g/L)	195 µl

#### 4x Sammelgelpuffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Base	60,56 g/L
In H <sub>2</sub> O, pH 6,8	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	4 g/L

## 4x Trenngelpuffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Base	181,72 g/L
In H <sub>2</sub> O, pH 8,8	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	4 g/L

## 10x SDS Laufpuffer

TRIS-HCl	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1 % (m/v)

## 4x Lämmli Puffer

SDS	200 g/L
Glycerin (85 %)	40 % (v/v)
Bromphenolblau	50 % (m/v)
TRIS 1M, pH 6,8	20 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	20 % (v/v)
In H <sub>2</sub> O	

### 3.2.3 Western Blot

Zur weiteren Analyse der Proteine wurden die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen, um sie für weitere Analysen zu immobilisieren [183]. Hierzu wurde eine Nass-Blot Apparatur verwendet. Die zuvor in MeOH aktivierte Membran wurde in Kathodenrichtung auf das Gel gelegt und zwischen je einem Filterpapier und Schwamm auf jeder Seite in die Halterung eingespannt. Der Zusammenbau wurde in Transferpuffer durchgeführt um ein Austrocknen des Gels und der Membran zu vermeiden. Die Kassette wurde neben einem Kühlakku in die Transferkammer gespannt und der Transfer bei 100 V über 1 h durchgeführt.

## Transferpuffer

TRIS	2,4 g/L
Glycin	11,24 g/L
Methanol	200 ml/L
In H <sub>2</sub> O	

### 3.2.4 Proteindetektion mit Chemilumineszenz

Zur Visualisierung der Proteine auf der Membran können Antikörper spezifisch an Proteine binden und eine Immunodetektion ermöglichen [183]. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgt hochspezifisch an ein Epitop in dem zu untersuchenden Protein. Eine Visualisierung dieser Bindung ist über einen Zweitantikörper möglich, der speziesabhängig an den IgG-Bereich des Erstantikörpers bindet und eine Form der Detektion ermöglicht, z.B. Fluoreszenz, Chemilumineszenz oder katalytische Umsetzung von Farbstoffen.

Nachdem die Proteine via Western Blot auf die PVDF Membran übertragen wurden, erfolgte die Inkubation der Membran entweder in Blockmilch oder 5 % BSA Blocklösung für 1 h, um nicht-spezifische Epitope in den Proteinen zu maskieren. Nach gründlichem Waschen der Membran in BSA-Waschpuffer wurde der Primärantikörper, verdünnt in BSA-Waschpuffer, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran erneut gründlich mit BSA-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für min. 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran mit dem Pierce® ECL plus Western Blotting Substrate nach Herstellerangaben entwickelt und die Chemilumineszenz in dem Amersham Imager von GE-Healthcare ausgelesen.

## BSA-Waschpuffer

TRIS 1M, pH 7,6	5 % (v/v)
NaCl-Lösung 2M	7,5 % (v/v)
BSA	2,5 g/L
NP-40	2 ml/L
In H <sub>2</sub> O	

**BSA-Blocklösung**

BSA	5 % (w/v)
In BSA-Waschpuffer	

**Blockmilch**

TRIS 1M, pH 7,6	10 ml/L
NaCl	5,83 g/L
Magermilchpulver	50 g/L
Tween 20	1 ml/L
In H <sub>2</sub> O	

**3.2.5 Erneute Analyse membrangebundener Proteine**

Um die Membran erneut mit einem anderen Antikörper zu behandeln, wurden zunächst die an die Proteine gebundenen Antikörper von der Membran gelöst. Hierzu wurde die bereits entwickelte Membran erneut in Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und für 2 h in einem Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran wie zuvor beschrieben erneut geblockt und mit Antikörpern behandelt [184].

**Stripping Puffer**

Glycin	100 mM
In H <sub>2</sub> O lösen, pH 2,5	
SDS	0,1 % (m/v)

**3.3 Weitere Methoden****3.3.1 Phalloidin Assay**

Phalloidin wird verwendet, um die Struktur des Zytoskeletts in Zellen sichtbar zu machen, da es hochselektiv an F-Aktin bindet [185]. Durch die Konjugation des fluoreszierenden Farbstoffes Alexa Fluor® 488 an F-Aktin ist es möglich, die Bindung an einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Färbung des Zytoskeletts ermöglichte es hier, die Querschnittsfläche der NMCM zu visualisieren und quantitativ auszuwerten, um das

Zellwachstum (Hypertrophie) nach Substanzeinwirkung analysieren zu können.

Frisch präparierte NMCM (s. 3.1.1) wurden hierzu auf mit Polylysin beschichtete 18 mm Deckgläsern in einer 12-Well Platte ausplattiert (100.000 Zellen pro Well) [186]. Am folgenden Tag wurde das Medium auf 1 % FCS in MEM gewechselt und die Zellen einen weiteren Tag bei 37 °C und 1 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde Medium auf 0 % FCS in MEM gewechselt und wie zuvor einen Tag inkubiert. Am 4. Tag wurden verschiedene Inhibitoren auf die Zellen gegeben und zunächst 1 h inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit entweder Phenylephrin (4 µM) oder Insulin like Growth Faktor (IGF) (30 pM) stimuliert. Alle Zellen wurden für weitere 24 h bei 37 °C und 1 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurden diese zunächst mit DPBS gewaschen und danach für 10 min mit 4 % PFA in H<sub>2</sub>O versetzt. PFA ist ein Quervernetzer von Proteinen, der die zelluläre Struktur erhält ohne dabei Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine zu nehmen [187]. Nach erneutem Waschen mit DPBS wurden die Zellen zunächst 2 min mit -20 °C kaltem Methanol-Aceton (1:1) behandelt und dann für 30 min mit 2 % (w/v) BSA in DPBS geblockt. Anschließend wurden die Zellen 20 min in Phalloidin-Lösung (3,33 U/ml in DPBS) im Dunkeln inkubiert, danach gewaschen und dann erneut im Dunkeln mit Hoechst-Lösung (2 µl/ml in DPBS) für 15 min behandelt. Abschließend wurden die Deckgläser mit den Zellen nach gründlichem Waschen mit DPBS mit Fluoromount® auf Objektträgern fixiert und über Nacht bei 4 °C ausgehärtet.

Die Aufnahme der Zellen erfolgte an einem SP5 konfokalen Fluoreszenz Mikroskop von Leica. Die Anregung der Fluorophore erfolgte bei 405 nm für Hoechst und 488 nm für Phalloidin. Die Aufnahmezeit und Laserintensität wurde hier an die jeweilige Probe angepasst um optimale Belichtung zu erreichen. Die Querschnittfläche der Zellen wurde schließlich mit Image J (Fiji) bestimmt.

### 3.3.2 MTT-Assay

Das MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)-Assay ermöglicht über die kolorimetrische Umsetzung von Tetrazoliumbromid in den Zellen zu dem unlöslichen lila Farbstoff Formazan (Abb. 10) eine photometrisch quantifizierbare Evaluierung des Zellüberlebens [188].

H9c2 Zellen wurden in einer 24-Well Platte ausgesät und bei ausreichender Konfluenz mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Die behandelten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> 72 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und 400 µl der





### 3.3.4 Laktat-Assay (In Zusammenarbeit mit Stefan Schraml und Julia Fender)

Nahezu alle eukaryotische Zellen produzieren Laktat in Folge von Glykolyse als Reaktion auf Stresssituationen. Glykolyse und die damit verbundene Laktatproduktion wird zum Beispiel von Stressoren wie Hypoxie, erhöhter Proliferationsrate, oxidativem Stress und mitochondriale Dysfunktion verstärkt. Die Bestimmung von Laktat kann quantitativ durch kolorimetrische Analyse des medialen Überstandes von Zellkulturen bestimmt werden [189].

Eine Standardverdünnungsreihe wurde mit 25 mM Laktat in Zellkulturmedium als höchste Konzentration und sechs weiteren jeweils halbierten Konzentrationen angesetzt. Zur Messung diente der Zellkulturüberstand von H9c2-Zellen, die mit 15.000 Zellen pro Well auf einer 96-Well Platte gezogen wurden. Die Laktatmessung erfolgte in einer klaren 96-Well Platte, in der 10 µl des Standards oder des Zellkultur-Überstandes in einem Well mit 90 µl Reagenzmix gemischt und für ca. 4 min im Dunkeln inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 M HCl gestoppt und der Farbumschlag bei 490 nm photometrisch bestimmt.

#### Reagenzmix

NAD	75 mg
In 25 ml TRAM Puffer lösen	
5x Farblösung	5 ml
LDH	8,2 µl

#### TRAM Puffer

Triethanolamin	107 mM
EDTA	10,7 mM
Magnesiumchlorid	41,8 mM
In H <sub>2</sub> O, pH 7,5, steril filtriert	

#### 5x Farblösung

PMS	1,63 mM
INT	3,95 mM
Ethanol	35 % (v/v)
In H <sub>2</sub> O im Ultraschallbad lösen	
Triton X	2 % (v/v)

### 3.3.5 Konfluenz-Assay (In Zusammenarbeit mit Stefan Schraml und Julia Fender)

Um das Überleben der Zellen nach Einwirkung von verschiedenen Wirkstoffen zu untersuchen, kann die Konfluenz der Zellen auf der Platte Aufschluss darüber geben, wie viele Zellen abgestorben sind. Zu diesem Zweck wurden H9c2 Zellen in einer 96-Well Platte zu je 15.000 Zellen ausplattiert und mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Nach 72 h wurde die Konfluenz der Zellen mikroskopisch mit einem Leica THUNDER Imager 3D Zellkultur Mikroskop bestimmt. Die Analyse und Auswertung der Konfluenz erfolgte automatisch über das Programm Image J Fiji mit dem Plugin „*Canny Edge Detector*“.

### 3.3.6 Impedanzmessung mit dem CardioExcyte96 von Nanion

Das CardioExcite96 von Nanion ermöglicht eine Quantifizierung verschiedener Zellparameter über die Messung von Widerständen in einem durch die Zellen laufenden elektrischen Impuls [175]. Die in 96-Well Platten eingelassenen Goldelektroden ermöglichen die Messung von allen adhärennten Zellkulturen sowie Primärzellen, die Zell-Zell-Kontakte ausbilden und sich so miteinander vernetzen.

Die frisch präparierten NMCM (s. 3.1.1) wurden auf eine mit Fibronectin (10 µg/ml in PBS; 1,5 h) beschichtete 96-Well Goldelektrodenplatte NSP96 - 2.0 mm von Nanion ausplattiert (70.000 Zellen/Well) und über Nacht bei 1 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium auf 1 % FCS in MEM gewechselt und die Messung im CardioExcyte96 gestartet. Die Messung fand alle 30 min mit einer Messdauer von 20 s statt. Die Inkubationkammer hielt die Parameter der Zellumgebung konstant bei 1 % CO<sub>2</sub> bei 11-14 L/h Luftwechsel (Ibidi System), Bodentemperatur bei 36,6 °C und Deckeltemperatur bei 38,5 °C. Sobald sich die Zellen equilibriert hatten und die Base Impedanz nicht weiter anstieg, wurde das Medium zu Hungermedium (0 % FCS in MEM) gewechselt und die Zellen für 12 h – 24 h weiter im Gerät inkubiert. Eine Stunde vor Zugabe der Inhibitoren wurde das Hungermedium mit der Hälfte des Volumens erneuert und die Inhibitoren in der anderen Hälfte des Volumens in Hungermedium angesetzt, um einen vollständigen Austausch des Medium bei Zugabe der Inhibitoren zu vermeiden. Eine wenn angegeben erfolgte Stimulation der Zellen zur Simulation von Stress erfolgte eine Stunde nach Zugabe der Inhibitoren mit (-)-Isoproterenol Hydrochlorid (Endkonzentration pro Well: 43 nM), ein β-adrenerger Rezeptoragonist. Die Zugabe erfolgt über je 5 µl/Well einer 0,86 mM Lösung in Hungermedium und die Reaktion der Zellen wurde für 20 min alle 2 min für je 20 s aufgenommen. Anschließend lief die Messung

weiterhin in 30 min Intervallen für die nächsten 24 h – 72 h.

Der Export der Daten erfolgte über das CardioExcyte96 eigene Kontrollprogramm. Wells, die bereits vor Inhibitorzugabe arrhythmische Schlagmuster aufwiesen, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Zeigte sich im Verlauf der Messung arrhythmisches Verhalten in den Kontrollwells, wurde die gesamte Messung nicht für die Auswertung herangezogen. Die gemessenen Impedanzwerte wurden auf einen Kontrolllauf vor Zugabe der Inhibitoren normalisiert, um Inhibitor-unabhängige Schwankungen zwischen einzelnen Wells in der Auswertung nicht mit einzubeziehen. Zusätzlich wurde auf die unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Messung normalisiert, um externe Einflüsse auf die Messung nicht in der Auswertung wiederzugeben.

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Julia Fender (Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

### **3.4 Statistik**

Alle statistischen Auswertungen und grafischen Aufarbeitungen dieser erfolgten über Graphpad Prism 8/9. Alle Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Analyse von nur zwei zu vergleichenden Gruppen erfolgte über einen gepaarten t-Test. Zur Analyse mehrerer Gruppen untereinander oder gegen nur eine Kontrolle wurde eine einfache Varianzanalyse (One-Way-Anova) mit anschließendem Tukey-Test verwendet. Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn sie innerhalb eines Konfidenzintervalls von 95 % lagen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Evaluierung des Impedanz-Assays zur Bestimmung von Kardiotoxizität

Da Screening-Methoden für kardiale Nebenwirkungen von Chemotherapeutika in der präklinischen Entwicklung kaum vorhanden sind, ist eine frühe Selektion der Wirkstoffe aufgrund ihrer Kardiotoxizität meist nicht möglich. Ein häufiger Abbruch der Entwicklung neuer Medikamente aufgrund ihrer kardiotoxischen Nebenwirkung in späteren klinischen Studien oder sogar Revidierung der Zulassung von Medikamenten ist die unerwünschte Folge. Die meisten präklinischen Richtlinien zur Untersuchung von Kardiotoxizität beschränken sich jedoch auf wenige, gezielte Untersuchungen zum Ausschluss bestimmter arrhythmogener Eigenschaften neuer Substanzen, die kein ausreichend umfassendes Bild liefern, um eine realistische Einschätzung der Wirkstoffe zu ermöglichen [5,6].

Zur besseren Evaluierung kardiotoxischer Effekte neuer Substanzen etablierten wir einen *in vitro* Assay zur Bestimmung des Einflusses von Substanzen auf Zellüberleben und Funktion: Zellschädigung, Funktion der Herzmuskelzellen und arrhythmogener Wirkung von Substanzen. So soll eine frühzeitige Erkennung von kardialen Nebenwirkungen ermöglicht werden. Dieser Assay basiert auf dem Messgerät CardioExcite96 von Nanion, das durch seine impedanzbasierte Messung von spontan schlagenden Zellen (neonatale Mauskardiomyozyten, NMCM) eine simultane Evaluierung der Zelldichte, des Schlagrhythmus und der Schlagfrequenz ermöglicht. Die parallele Messung verschiedener Substanzen in einer 96-Well Platte mit Goldelektroden ermöglicht zusätzlich einen hohen Messdurchsatz und die schnelle Gewinnung relevanter Messdaten [172,175,180].

#### 4.1.1 Auswahl der Referenzsubstanzen

Um die Impedanzmessung von NMCM auf dem CardioExcite96 als geeignete Methode zur Früherkennung von kardiotoxischen Substanzen zu evaluieren, wurden Wirkstoffe getestet, die bereits in der Klinik Anwendung finden und deren kardiotoxische Kurz- und Langzeitwirkungen auf den Menschen bekannt sind. Vier Wirkstoffe zur Behandlung von verschiedenen Krebsarten wurden als Referenzsubstanzen auf ihre kardiotoxischen Eigenschaften in neonatalen Mauskardiomyozyten untersucht, um die Eignung der Methode zu testen und Vergleichsdaten für die Beurteilung neuer Substanzen zu generieren. Hierbei handelt es sich um Doxorubicin und Sorafenib, die schon seit 47 bzw. 16 Jahren in klinischer

Verwendung sind sowie zwei neuere Kinaseinhibitoren, Trametinib und Selumetinib, die im letzten Jahrzehnt von der FDA zugelassen wurden [190]. Als Negativkontrollen dienen zwei Wirkstoffe zur Behandlung von Bluthochdruck und Herzinsuffizienz, der Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 (AT<sub>1</sub>) Antagonist Valsartan und der Inhibitor des *Angiotensin-Converting-Enzyms* (ACE) Ramipril [190]. Es sollten keine kardiotoxischen Effekte auftreten, da sie primär Einfluss auf Zielproteine in Gefäßzellen nehmen und mögliche kardiale Nebenwirkungen Sekundäreffekte der Vasodilatation sind. Der Einsatz dieser Substanzen bei Herzinsuffizienzpatienten schützt vor pathologischen Umbauprozessen im Herzmuskel und vermittelt so eine protektive Wirkung [191–193]. Ein toxischer Einfluss auf die isolierten Kardiomyozyten ist daher nicht zu erwarten (Tabelle 1).

Da die Übertragung von physiologisch relevanten Konzentrationen nicht eins zu eins auf *in vitro* Assays möglich ist, wählten wir für die eingesetzten Referenzsubstanzen je zwei Konzentrationen zur Untersuchung der kardiotoxischen Effekte. Je eine dieser Konzentrationen lag oberhalb und eine unterhalb der in Patienten beobachteten möglichen maximalen Wirkstoffkonzentration im Plasma ( $c_{\max}$ ). Eine Ausnahme bildet hier Trametinib, dessen  $c_{\max}$  in etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie die untere verwendete Konzentration, da Messungen in dieser Konzentration schon keine signifikanten Einflüsse mehr beobachten ließen. Anhand dieser Konzentrationen können wir vergleichen, ob eine Schädigung der Zellen schon bei niedrigeren oder erst bei höheren Konzentrationen der Substanzen detektierbar ist und vergleichbare Effekte zeigt, wie es im Menschen beobachtet wurde. Für die Negativkontrollen wurde jeweils eine Konzentration gewählt, die oberhalb ihrer im Menschen beobachteten  $c_{\max}$  Werte liegt, um zu bestätigen, dass die Wirkstoffe auch im Impedanzassay keine toxischen Einflüsse auf die Kardiomyozyten haben.

Eine erfolgreiche Wiedergabe des kardiotoxischen Potentials der Wirkstoffe durch den Assay ist erreicht, wenn die häufig auftretenden (Inzidenz bei mindestens einem von 100 Patienten:  $>1/100$ ) kardiotoxischen Effekte, die in der Klinik beobachtet wurden, auch im Assay zu signifikanten Veränderungen der NMCM führen. Nebenwirkungen, die in der Klinik selten ( $1/100-1/1.000$ ) und sehr selten ( $1/1.000-1/10.000$ ) auftreten, hängen oft von individuellen Risikofaktoren der Patienten ab und werden in diesem Assay, ohne Anpassung auf bestimmte Risiken, nicht repräsentativ erfasst. Die in Tabelle 2 aufgelisteten Nebenwirkungen für Valsartan und Ramipril beruhen auf den Sekundäreffekten der Vasodilatation, die vermehrt in vorgeschädigten Herzen zu Nebenwirkungen führen können. Direkte adverse Effekte auf die Kardiomyozyten sind nicht zu erwarten [191–196].

**Tabelle 1** Daten und eingesetzte Konzentrationen der Referenzsubstanzen

Substanz	FDA seit	c <sub>max</sub> (Mensch)	[c] niedrig	[c] hoch
<b>Doxorubicin</b>	1974	5,0 µM [21]	0,5 µM	10,0 µM
<b>Sorafenib</b>	2005	21,5 µM [31]	10,0 µM	30,0 µM
<b>Trametinib</b>	2013	0,04 µM [197]	0,1 µM	9,2 µM
<b>Selumetinib</b>	2020	7,5 µM [133]	1,0 µM	30,0 µM
<b>Valsartan</b>	1996	7,7 µM [198]	-	10,0 µM
<b>Ramipril</b>	1991	0,125 µM [199]	-	10,0 µM

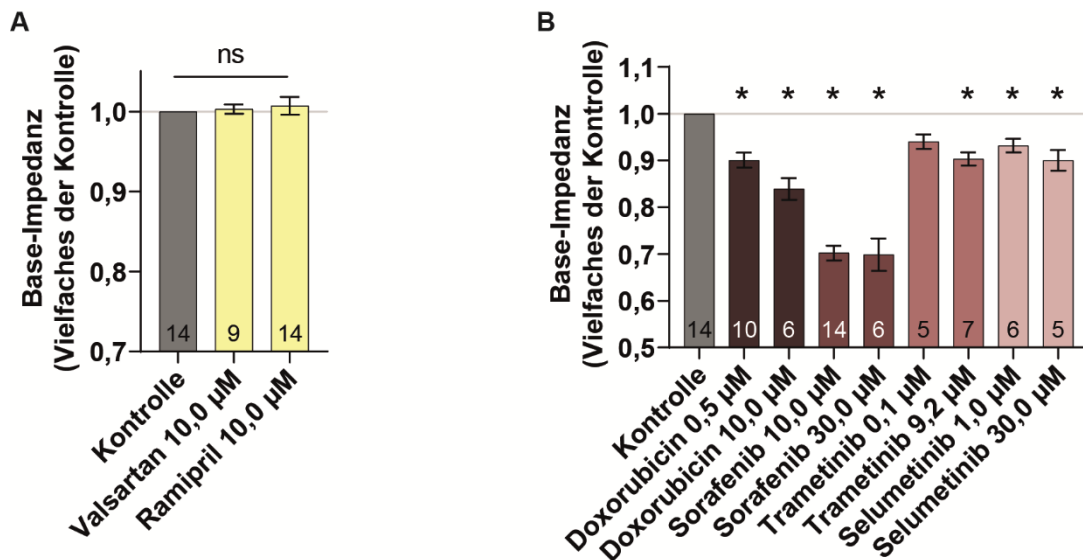
**Tabelle 2** Klinische kardiale Nebenwirkungen der Referenzsubstanzen entnommen aus der Zusammenfassung der Merkmale des jeweiligen Arzneimittels [33,125,136,200–202]

Substanz	Häufig (>1/100)	Selten (1/1.000-1/100)	Sehr selten (1/10.000-1/1.000)
<b>Doxorubicin</b>	Kardiomyopathie: verringerte LVEF; EKG Veränderung: Sinus Tachykardie, Bradykardie, Schenkelblock, Arrhythmien		
<b>Sorafenib</b>	Herzinsuffizienz, myokardiale Ischämie und Infarkt		QT-Prolongation
<b>Trametinib</b>	Linksventrikuläre systolische Dysfunktion (e.g., verringerte LVEF), Bradykardie,	Herzversagen	
<b>Selumetinib</b>	Kardiomyopathie, verringerte LVEF, Tachykardie		
<b>Valsartan</b>		(Herzversagen nach MI)	
<b>Ramipril</b>		(Myokardiale Ischämie und myokardialer Infarkt, Tachykardie, Arrhythmie, Palpitation)	

#### 4.1.2 Identifizierung kardiotoxischer Effekte der Referenzsubstanzen über die Base-Impedanz

Die herzscheidende Wirkung mancher Wirkstoffe beruht auf der direkten Schädigung der verschiedenen kardialen Zellen. Diese Art der Schädigung ist häufig irreversibel und somit über die Zeit kumulativ. Bei Medikamenten, die diese Art Schaden verursachen, führt das in der Regel zu einer starken Dosisbeschränkung. Eine frühzeitige Erkennung von myokardschädigenden Substanzen wäre daher ein großer Vorteil in der Entwicklung neuer Medikamente [12]. Um diesen destruktiven Effekt zu untersuchen, haben wir die Base-Impedanz der kultivierten Zellen auf dem CardioExcyte96 kontinuierlich über einen Behandlungszeitraum von einem Tag gemessen und die Ergebnisse der Referenzsubstanzen mit den klinischen Daten verglichen (Abb. 11).

Für diesen Versuch wurde eine konstante Zellzahl pro Well ausgesät. Um Schwankungen zwischen unabhängigen Versuchen zu vermeiden, wurde jeder Versuch auf seine jeweilige unbehandelte Kontrolle normalisiert. Die Negativkontrollen Valsartan und Ramipril zeigten keinen Unterschied der Base-Impedanz zur unbehandelten Kontrolle. Da sie auch in Patienten keine Myokardschädigung auslösen, bestätigen diese Ergebnisse die gute Verträglichkeit, die auch im Menschen beobachtet wurde (Abb. 11 A) [200,201]. Die Base-Impedanz der anderen Referenzsubstanzen (Positivkontrollen) zeigte eine signifikante Reduktion der Zelldichte nach 24-stündiger Behandlung mit nahezu allen kardiotoxischen Substanzen, mit Ausnahme von Trametinib in seiner niedrigen Konzentration (Abb. 11 B). Den größten Einfluss auf das Zellüberleben erwarteten wir von Doxorubicin und Sorafenib, da sie bereits in der Vergangenheit als stark zytotoxisch charakterisiert wurden. Insbesondere Anthrazykline wie Doxorubicin sind für ihre schwere myokardschädigende Wirkung bekannt, die zu schweren Kardiomyopathien und Herzversagen führen kann [195,203] Doxorubicin und Sorafenib verursachten eine signifikante und dosisabhängige Abnahme des Zellüberlebens auf ca. 89-84 % bzw. 71-67 %. Obwohl die genauen Ursachen für die Toxizität von Doxorubicin noch immer strittig sind, ist die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die wahrscheinlichste Ursache für die Zellschädigung [23,27]. Sorafenib wies ebenfalls in *in vitro* sowie in *in vivo* Studien starke kardiotoxische Effekte auf, wobei die genauen Ursachen weniger genau bestimmt sind. Eine zytotoxische Wirkung durch die Inhibierung von C-Raf ist eine der möglichen Ursachen für die erhöhte Schädigung der Kardiomyozyten und auch die erhöhte Produktion von ROS ist nicht ausgeschlossen. Der Einfluss von Sorafenib auf die zellulären und mitochondrialen Calciumlevel wurde ebenfalls zuvor beobachtet [26,27,34,35,204].



**Abbildung 11** Einfluss der Wirkstoffe auf die Base-Impedanz, ein Parameter, der mit Zellüberleben korreliert wird. Die Diagramme zeigen das relative Überleben der NMCM gegen die unbehandelte Kontrolle (DMSO) nach Behandlung für 24 h mit verschiedenen Referenzsubstanzen. (A) Die Base-Impedanz nach Behandlung der NMCM mit den Negativkontrollen gegen die Kontrolle (DMSO) (B) Die Base-Impedanz nach Behandlung der NMCM mit den Positivkontrollen in jeweils einer hohen und einer niedrigen Konzentration gegen die Kontrolle (DMSO). Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben; \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle; n.s., nicht signifikant; Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die MEK-Inhibitoren Trametinib und Selumetinib hingegen besaßen nur einen geringen Einfluss auf das Zellüberleben. Trametinib wies nur in seiner höheren Konzentration (9,2  $\mu$ M) eine leichte, aber signifikante Zellschädigung von ca. 10 % auf. Diese Konzentration liegt jedoch weit über dem  $c_{\max}$  von 36,1 nM in Patienten [197]. Die niedrigere Konzentration (0,1  $\mu$ M), die ebenfalls leicht über dem  $c_{\max}$  liegt, verursachte keine signifikante Veränderung. Selumetinib hingegen wies in beiden Konzentrationen eine leichte, aber signifikante Zellschädigung von 5-10 % auf, auch unterhalb des  $c_{\max}$ . Keiner der beiden MEK-Inhibitoren wurde bisher explizit auf seine Zytotoxizität gegen Kardiomyozyten hin untersucht. Dass eine Inhibierung des kardioprotektiven Raf/MEK/ERK Signalweges allerdings zu Einbußen im Zellüberleben führt ist nicht unwahrscheinlich [102]. Die im späteren Verlauf dieser Arbeit beobachtete dosisabhängige Zytotoxizität von ERK-Inhibitoren würde ebenfalls dafürsprechen, dass auch bei MEK-Inhibitoren eine Zellschädigung in Abhängigkeit von der Konzentration auftritt, die allerdings sehr viel geringer auszufallen scheint als bei ERK-Inhibierung (Vgl. 4.3.2).



Die hier erhobenen *in vitro* Ergebnisse über den Einfluss der Substanzen auf die Kardiomyozyten stimmten mit den klinischen Daten gut überein (Tabelle 2). Alle Substanzen, die Myokardschäden in Patienten hervorrufen, zeigten schon bei geringen Konzentrationen, unterhalb des im Menschen beobachteten  $c_{\max}$ , eine signifikante Schädigung der NMCM. Im Falle von Trametinib, das klinisch keine auffälligen Zellschäden verursacht, konnte auch im Impedanzassay ein Einfluss auf die Zellen nur in Konzentrationen beobachtet werden, die weit über der klinisch verwendeten Dosis lag.

#### 4.1.3 Vergleich der Base-Impedanz mit gängigen *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays

Zur weiteren Charakterisierung der Substanzen und zur besseren Einordnung der aus der Impedanzmessung gewonnenen Daten, wurden weitere Assays durchgeführt, um das Überleben und den Metabolismus der Zellen zu untersuchen. Da für diese Assays keine schlagenden Zellen benötigt werden, wurden anstelle der aus Mäusen gewonnenen NMCM die Zelllinie H9c2 verwendet. Um Unterschiede im Verhalten dieser Myoblasten-Zelllinie, die ursprünglich aus Rattenherzen gewonnenen wurde, im Gegensatz zu NMCM auszugleichen, wurde in diesen Assays eine längere Inkubationszeit von 72 h gewählt [205,206]. Zur Quantifizierung des Zellüberlebens verwendeten wir einen Konfluenz-Assay, einen ATP-Assay sowie einen MTT-Assay. Um einen Einblick in die Einflüsse auf den Metabolismus zu bekommen, führten wir zusätzlich einen Laktat-Assay durch. Die Negativkontrollen verursachten in keinem der Assays Ergebnisse, die von der Kontrolle abwichen (Abb. 13).

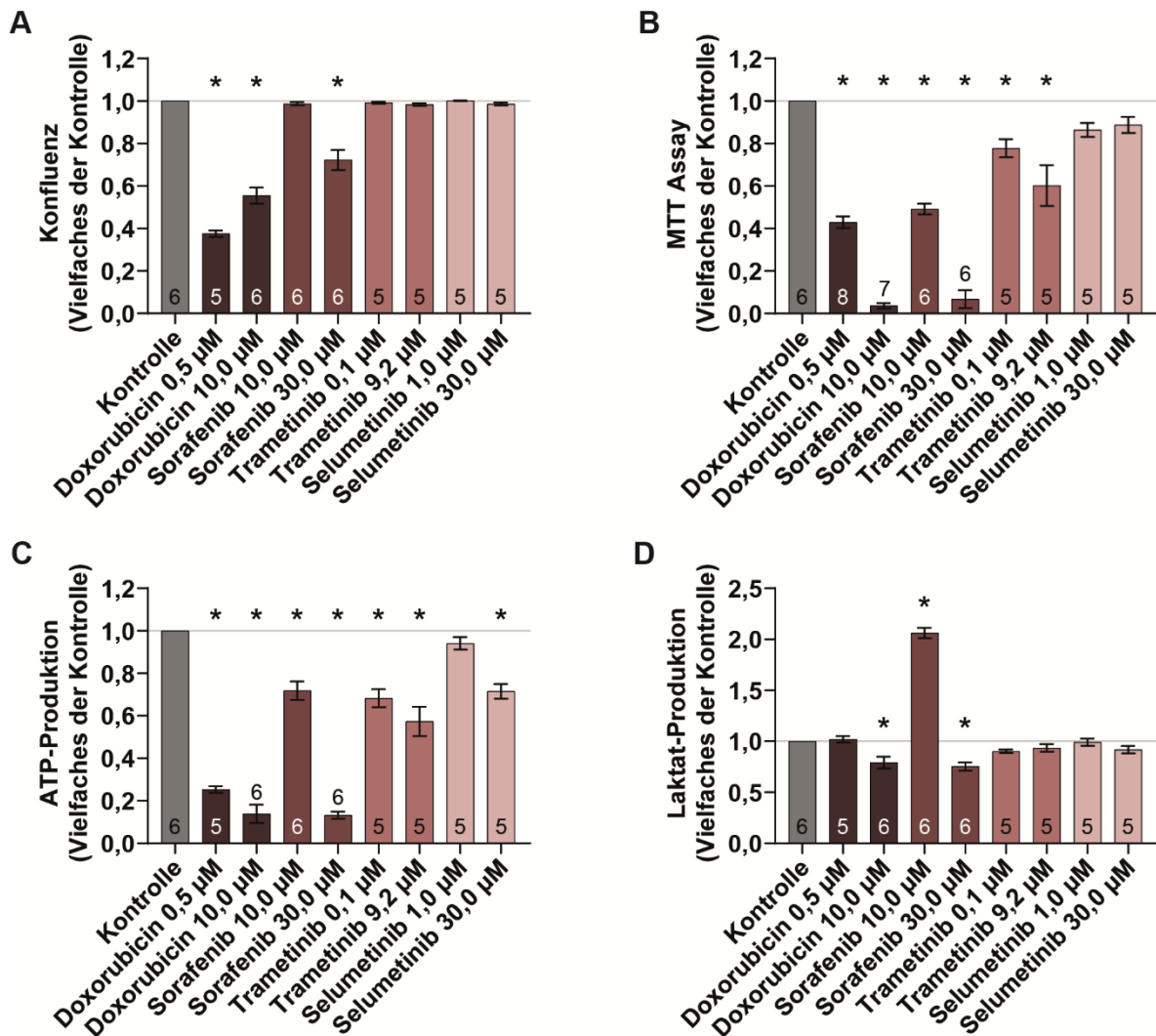
Der Konfluenz-Assay (Abb. 12 A) zeigte sehr viel weniger Einfluss der Referenzsubstanzen auf das Zellüberleben als die Base-Impedanz oder der MTT-Assay, der das Redoxpotential als Maß für das Zellüberleben quantifiziert. Doxorubicin verursachte eine signifikante Verringerung der Zelldichte, wohingegen Sorafenib nur bei hohen Konzentration eine Reduktion der Zelldichte verursachte. Trametinib und Selumetinib bewirkten keine Veränderung in der Konfluenz der Zellen.

Der MTT-Assay zeigte ähnliche Daten wie die Base-Impedanzmessung (Abb. 12 B). Das im MTT-Assay gemessene Zellüberleben war im Vergleich zur Base-Impedanz stärker beeinflusst durch die Wirkstoffe, zeigte aber grundsätzlich die gleichen Tendenzen. Doxorubicin und Sorafenib zeigten starke Einflüsse auf das Zellüberleben. Die hohen Konzentrationen töteten nahezu alle Zellen ab. Trametinib zeigte ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion des Zellüberlebens, allerdings in weitaus geringerem Maße als Doxorubicin und

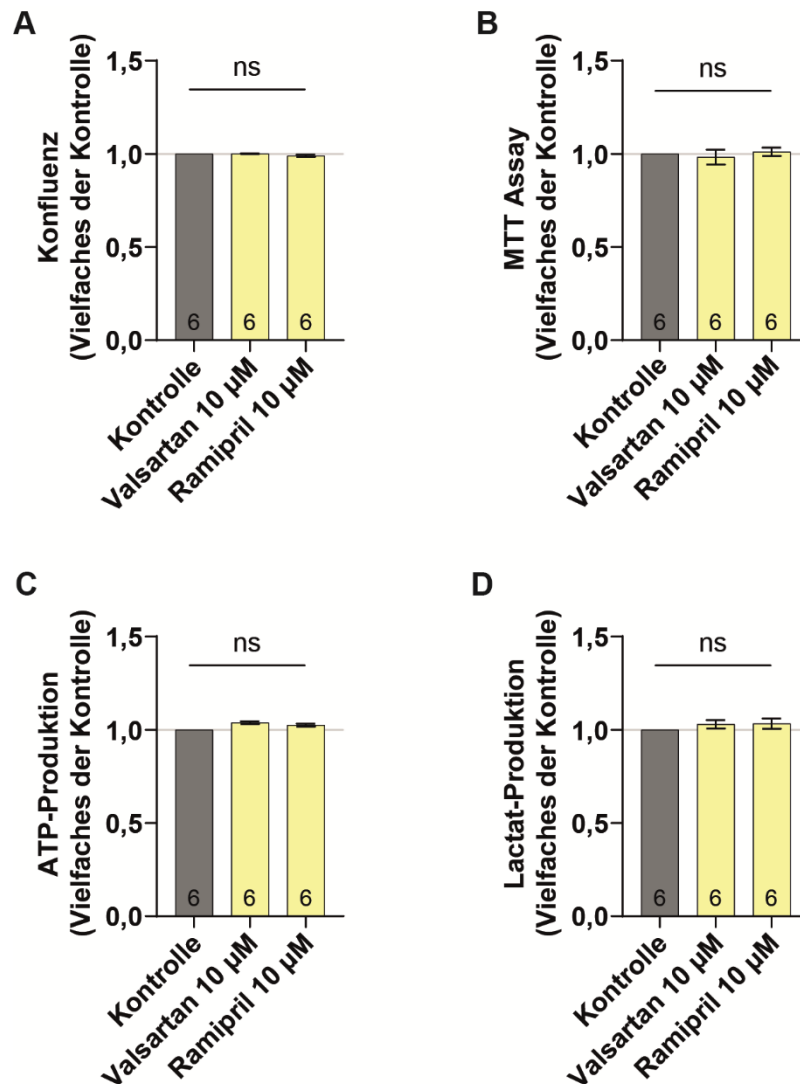
Sorafenib. Die von Selumetinib verursachte Zellschädigung erreicht im MTT-Assay keine Signifikanz.

Die Quantifizierung der ATP-Produktion nach Inkubation mit den Wirkstoffen gibt ebenfalls einen Einblick in die Veränderung des Zellüberlebens (Abb. 12 C). Ähnlich wie der MTT-Assay quantifiziert sie das Zellüberleben anhand von metabolischen Prozessen, i.e. der Produktion von ATP. Die nach Wirkstoffeinfluss beobachtete Reduktion in Zellüberleben im ATP-Assay ähnelt den Ergebnissen aus dem MTT-Assay und zeigte genau wie dieses stärkere Einflüsse auf die Zellen als die Base-Impedanz. Die Unterschiede zwischen dem MTT- und ATP-Assay zur Base-Impedanzmessung könnten von der Verwendung einer anderen Zelllinie und längerer Inkubationszeit herrühren. Die Quantifizierung des Zellüberlebens über metabolische Faktoren kann auch eine Veränderung des Metabolismus miteinbeziehen und die Ergebnisse so zusätzlich beeinflussen.

Der Laktat-Assay (Abb. 12 D), das über die Bestimmung des Laktatgehaltes die metabolische Funktion der Zellen quantifiziert, bestätigte die Vermutung, dass die Wirkstoffe teilweise einen Einfluss auf den Metabolismus nehmen. Dass die Zellen nach Wirkstoffeinwirkung trotz stark reduzierter Zellzahl noch immer eine stabile Laktatproduktion aufwiesen, lässt vermuten, dass die übrigen Zellen ihren Metabolismus intensivieren, um die Laktatwerte zu erhalten. Doxorubicin wurde in früheren Studien als mitochondrienschädigend befunden, was zu einer Reduktion der ATP-Level führt und die sehr niedrigen ATP-Werte in unseren Messungen bestätigen würde [207].



**Abbildung 12** Verschiedene *in vitro* Assays zur Bestimmung von Zellüberleben und Metabolismus in H9c2 Zellen nach 72 h Einwirkung der Referenzsubstanzen dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (DMSO). Zur Bestimmung des Zellüberlebens wurden der (A) Konfluenz-Assay, (B) der MTT-Assay und (C) der ATP-Assay durchgeführt. Zur Bestimmung des Zellmetabolismus wurde (D) ein Laktat-Assay durchgeführt. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM.



**Abbildung 13** Die Negativkontrollsubstanzen Valsartan und Ramipril in verschiedenen *in vitro* Assays. Die Assays wurden in H9c2 Zellen nach 72 h Inkubation mit den Inhibitoren durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellgesundheit wurden (A) der Konfluenz-Assay (B) der MTT-Assay und (C) der ATP-Assay durchgeführt. Zur Bestimmung der metabolischen Veränderung der Zellen wurde (D) der Laktat-Assay durchgeführt. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die Base-Impedanzmessung zur Bestimmung des Zellüberlebens scheint die klinischen Ergebnisse in vergleichbaren Konzentrationen gut widerzuspiegeln und stellt daher ein vielversprechendes Assay zur Bestimmung des Wirkstoffeinflusses auf das Zellüberleben dar. Auch im Vergleich zu anderen *in vitro* Assays zur Bestimmung von Zytotoxizität erwies es sich als verlässlich. Da in der Vergangenheit aber bereits zelluläre Impedanzassays verwendet wurden, um zytotoxische Effekte zu untersuchen [208,209], ist die Ergänzung der Parameter

um die Schlagfunktion und Arrhythmien der Zellen ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal dieses Assays, das im Folgenden untersucht wurde. Die Kardiotoxizität von Wirkstoffen wird nicht ausschließlich über die zytotoxische Wirkung vermittelt, sondern kann sich auch in der funktionellen Schädigung der Zellen und folglich der Dysregulation der Schlagfunktion äußern. Um diesen Aspekt der Kardiotoxizität zu analysieren, untersuchten wir zusätzlich die kontraktile Funktion der Zellen nach Inkubation mit den Referenzsubstanzen.

#### 4.1.4 Identifizierung der funktionellen Toxizität der Referenzsubstanzen

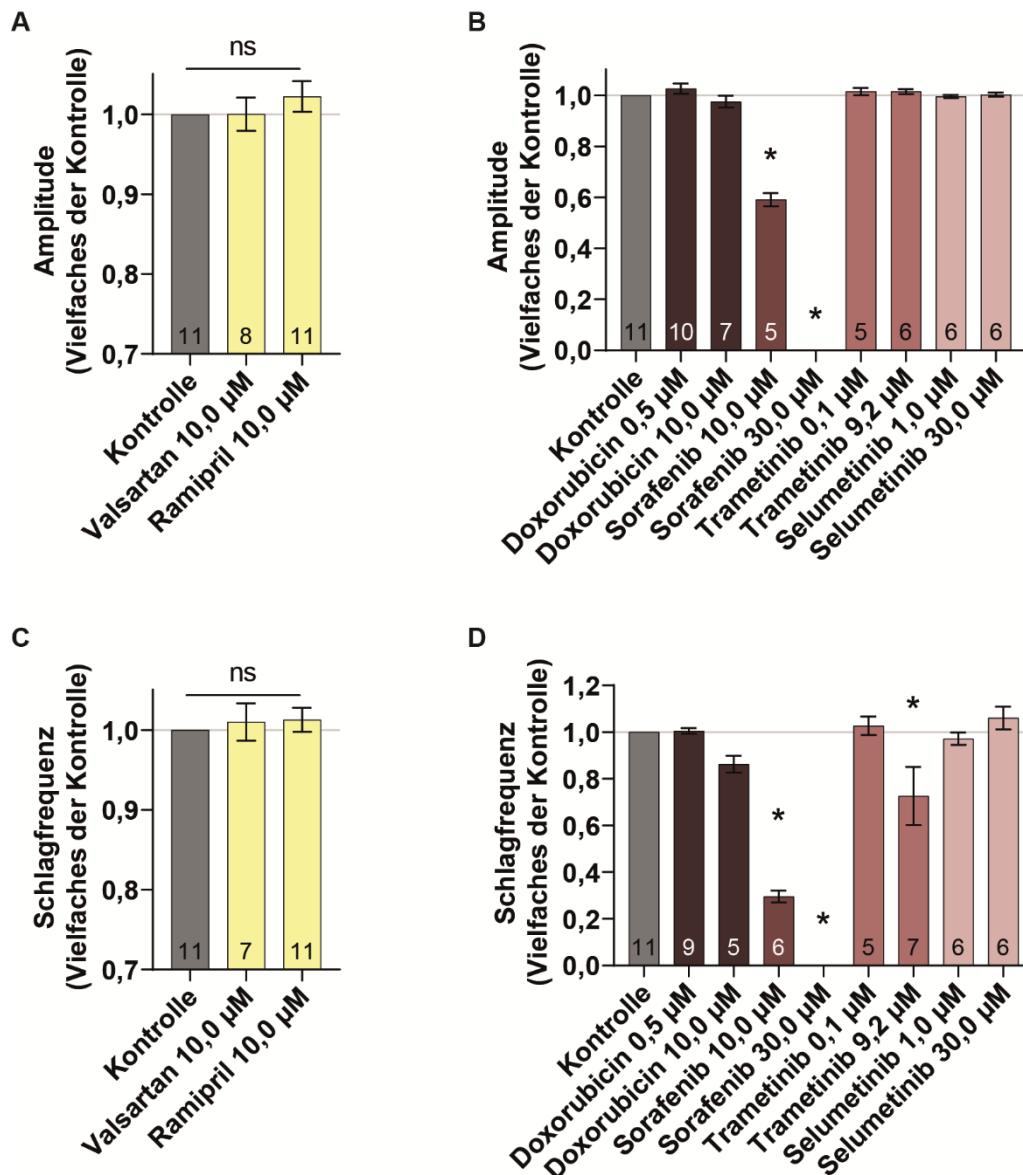
Neben Veränderungen des Zellüberlebens und der damit verbundenen strukturellen myokardschädigenden Wirkung der Substanzen führen klinisch verwendete Krebstherapeutika häufig zu akuten Veränderungen im Schlagmuster der Zellen. Eine Veränderung der Schlagfrequenz (Bradykardie, Tachykardie) oder eine Reduktion der Schlagkraft kann im Patienten schwere Nebenwirkungen auslösen. Für diese funktionellen Nebenwirkungen gibt es bisher keine *in vitro* Assays und eine Vorhersage möglicher Toxizitäten erfolgt häufig erst in späteren *in vivo* Versuchen [7,8]. Die hier vorgestellte Impedanzmessung ist in der Lage, die kontraktile Funktion der kultivierten Kardiomyozyten in Echtzeit zu verfolgen und mögliche Veränderungen zu detektieren.

Die Impedanzmessung der spontan schlagenden NMCM auf dem CardioExcite96 ermöglicht eine numerische Darstellung des Schlagverhaltens der Zellen unter Einfluss der verschiedenen Substanzen und ermöglicht eine Evaluierung der potentiellen Toxizität auf die Schlagfrequenz und –stärke (Amplitude). Die hier gemessenen Daten zeigen die Schlagamplitude (Abb. 14 A & B) und die Schlagfrequenz (Abb. 14 C & D) der Zellen nach Inkubation mit den entsprechenden Wirkstoffen. Da Veränderungen in der Funktion der Zellen in der Regel akute Nebenwirkungen sind, die kurze Zeit nach Behandlungsbeginn auftreten und meist nach Absetzen der Substanzen reversibel sind, messen wir hier die akute Wirkung der Substanzen auf die Zellen nach einer Stunde Inkubation [14,164].

Die Negativkontrollen zeigten keinen Einfluss auf die Amplitude oder Schlagrate der Zellen (Abb. 14 A & C). Doxorubicin und Selumetinib zeigten ebenfalls keine Wirkung auf die Funktion der Zellen, weder in niedriger noch in hoher Konzentration (Abb. 14 B & D). Obwohl in Patienten eine Verringerung des linksventrikulären Ejektionsvolumens nach Medikamenteneinnahme beobachtet wurde, konnte hier keine Veränderung des Schlagverhaltens beobachtet werden.

Sorafenib und Trametinib beeinflussten die Kontraktionsfähigkeit der NMCM hingegen signifikant. Sorafenib verursachte bereits bei einer niedrigen Konzentration eine starke Reduktion der kontraktilen Funktion und reduzierte die Amplitude auf 59 % und die Schlagrate auf 30 %. Bei höherer Konzentration verursachte Sorafenib eine vollständige Aussetzung der kontraktilen Funktion der Zellen. Diese Effekte werden vermutlich durch Sorafenibs Einfluss auf die Calciumspiegel in den Zellen sowie dessen Effekt in den Mitochondrien ausgelöst [35]. Ebenso kann die erhöhte Produktion von ROS einen additiven negativen Einfluss auf die kontraktile Funktion der Zellen haben [35,204]. Diese Effekte sind in den klinischen Daten nicht direkt widerspiegelt, können jedoch die Ursache oder ein Teil der Ursache der beobachteten Herzinsuffizienz sein.

Trametinib verursacht bei hoher Konzentration eine signifikante Reduktion der Schlagrate um ca. 27 %, wobei die Amplitude unverändert blieb. Diese beobachteten Effekte spiegeln die Bradykardie, die in Patienten beobachtet wurde, wider [125]. Dies zeigte sich im Assay allerdings erst bei sehr hohen Konzentrationen des Wirkstoffs. Dass die niedrige Konzentration keine Verringerung der Schlagfrequenz auslöste, spricht eher für eine geringere Sensitivität des Assays in Bezug auf die kontraktile Funktion der Zellen.



**Abbildung 14** Die Impedanzmessung gibt Aufschluss über das Schlagmuster der NMCM nach einstündiger Behandlung mit verschiedenen Referenzsubstanzen, dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (DMSO). **(A)** Die Amplitude nach Behandlung mit den Negativkontrollen. **(B)** Die Amplitude nach Behandlung mit den Positivkontrollen. **(C)** Die Schlagrate nach Behandlung mit den Negativkontrollen. **(D)** Die Schlagrate nach Behandlung mit den Positivkontrollen. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben; \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle; n.s., nicht signifikant; Mittelwert  $\pm$  SEM.

Anders als die Myokardschädigung scheint die Wirkung der Substanzen auf die kontraktile Funktion der Zellen nicht so genau vorhersagbar zu sein. Die kultivierten Zellen zeigen sehr viel weniger Veränderung in ihrer Kontraktion nach Substanzzugabe, als es durch die klinischen Daten zu erwarten gewesen wäre. Erst bei hohen Konzentrationen scheinen die

Substanzen die Kontraktionen zu beeinflussen. Zusätzlich scheint das wirkstoffbedingte Absterben der Zellen ebenfalls einen Effekt auf die Kontraktion der Zellen zu haben, was die Interpretation der Ergebnisse zusätzlich erschwert. Die funktionelle Reaktion der kultivierten NMCM scheint durch das Zusammenspiel verschiedener toxischer Einflüsse anders beeinflusst zu werden, als es Kardiomyozyten im Organismus tun und die Auswirkungen der schädigenden Einflüsse der Wirkstoffe sind daher nicht eindeutig den klinischen Symptomen zuzuordnen. Aufgrund der geringeren Sensitivität des Assays scheint sich auch der Einsatz höherer Konzentrationen zu empfehlen, um eine besserer Abbildung der klinischen Daten zu erreichen.

Obwohl die Datenlage nicht vergleichbar eindeutig ist, wie bei der Base-Impedanz, ermöglicht das Assay hier dennoch eine Interpretation der toxischen Einflüsse auf die Kontraktion der Zellen, die andere *in vitro* Assays nicht bieten konnten.

#### **4.1.5 Validierung des Impedanz-Assays für die Erkennung von pro-arrhythmischen Substanzen**

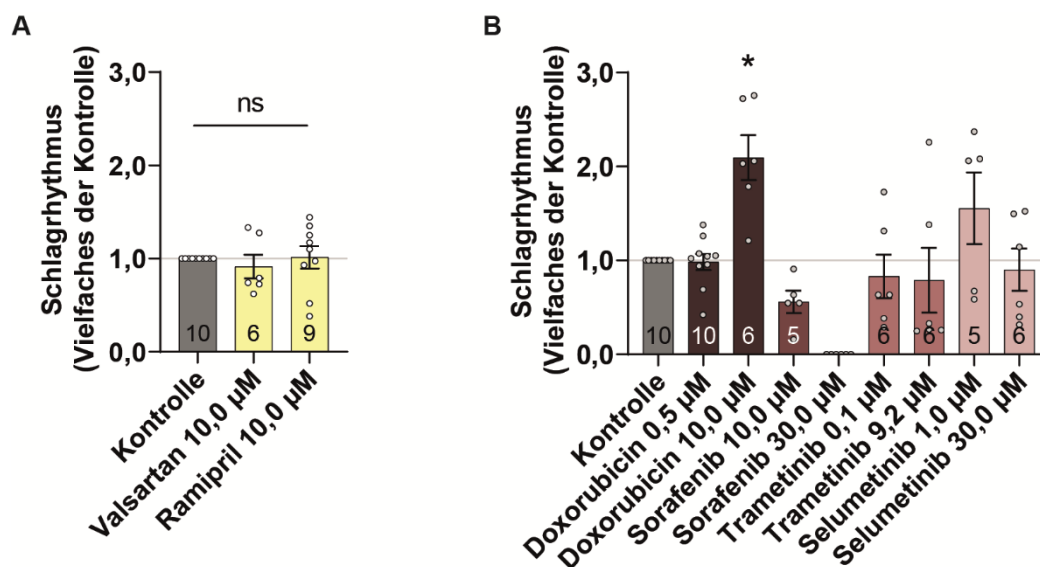
Einer der wichtigsten Aspekte der präklinischen Untersuchungen von Wirkstoffen in Hinblick auf ihre Kardiotoxizität ist ihr Potential Arrhythmien hervorzurufen. Bisher wurden verschiedene *targeted* Assays verwendet, um das Risiko von Arrhythmien so gering wie möglich zu halten [6,166]. Diese Methoden testeten jedoch nur einzelne mechanistische Risikofaktoren, wie die Dysregulation bestimmter Ionenkanäle, und können daher kein vollständiges Bild über die arrhythmogene Wirkung der Substanzen geben [5,6,11,174]. Der hier durchgeführte Assay ermöglicht die Aufzeichnung und Evaluierung des Schlagrhythmus der Zellen nach Substanzzugabe, um Arrhythmien unabhängig von ihrem mechanistischen Ursprung zu erkennen (Abb. 15).

Der durch die Impedanz gemessene Wert für die Gleichmäßigkeit des Schlagrhythmus der Zellen ist bei gleichbleibendem Rhythmus niedrig und nimmt mit stärkeren Arrhythmien zunehmend höhere Werte an. Da die Messungen in NMCM durchgeführt werden, welche spontan schlagen, erzeugt auch die unbehandelte Kontrolle kein perfektes Schlagmuster. So kann es vorkommen, dass die mit Substanzen behandelten Zellen mitunter Werte unter eins annehmen und damit vereinzelt rhythmischer schlagen als die Kontrolle. Als arrhythmisch gelten daher nur Werte, die signifikant höher sind als die Kontrolle.

Die einzige Substanz, die in unseren Messungen zu signifikanter Verschlechterung des Schlagrhythmus geführt hat, war Doxorubicin in hoher Konzentration, was den beobachteten



Nebenwirkungen aus der Klinik entspricht. Sorafenib, welches in anderen präklinischen Studien pro-arrhythmische Effekte gezeigt hatte [35], verursachte in niedriger Konzentration keine Arrhythmien. Da die höheren Konzentrationen jedoch zu einem Aussetzen der Kontraktion geführt hatten, kann hier keine Aussage über die pro-arrhythmische Wirkung getroffen werden.



**Abbildung 15** Einfluss der Substanzen auf den Schlagrhythmus der NMCM. Die Diagramme zeigen den Schlagrhythmus der Kontraktion gegen die Kontrolle (DMSO) nach einstündiger Behandlung mit verschiedenen Referenzsubstanzen. Ein hoher Wert im Vergleich zur Kontrolle bedeutet einen unregelmäßigen Rhythmus der Kontraktionen. (A) Der Schlagrhythmus der Negativkontrollen im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). (B) Der Schlagrhythmus der Positivkontrollen im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben; die einzelnen Versuche sind als Punkte in dem Diagramm dargestellt; \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle; n.s., nicht signifikant; Mittelwert  $\pm$  SEM.

Da allerdings ein geringes pro-arrhythmisches Potential nicht zwangsläufig in jeder Messung zu Arrhythmien führen muss, lohnt es sich hier, die einzelnen Messungen zu betrachten. Trametinib und Selumetinib zeigen sowohl Messungen mit sehr gleichmäßigem Schlagmuster, aber auch Messungen mit Arrhythmien. Obwohl der Mittelwert dadurch nicht signifikant verändert ist, sollte man ein pro-arrhythmisches Potential bei diesen Substanzen nicht gänzlich ausschließen. Das pro-arrhythmische Potential von Trametinib und Selumetinib ist in dieser Messung eher gering und tritt im Menschen vermutlich nur selten oder in

Kombination mit speziellen Risikofaktoren auf. In einer klinischen Studie zu Trametinib, konnte keine wirkstoffbedingte QT-Prolongation beobachtet werden [127]. Auch Selumetinib zeigte in einer Studie mit gesunden Individuen bei einer einmaligen Dosis von 75 mg keine QT-Prolongation [210]. Da eine QT-Prolongation jedoch nicht die einzige Ursache für Arrhythmien darstellt, sollten die beobachteten Effekte nicht gänzlich verworfen werden. Insbesondere bei Risikopatienten sollte eine entsprechende Kontrolle der Herzparameter während der Behandlung vorgenommen werden.

Ähnlich wie die Messung zur Frequenz und Amplitude der Kontraktion zeigte das Impedanzassay bei der Evaluierung von pro-arrhythmischen Effekten eine geringere Sensitivität auf die Wirkstoffe, als es im Menschen beobachtet wurde. Die Verwendung von höheren Konzentrationen zur verlässlichen Darstellung der kardiotoxischen Einflüsse ist hier zu empfehlen.

Da die Arrhythmien in diesem Assay nicht bei jeder Messung gleich ausfallen, wäre es eventuell sinnvoll, die Art der Quantifizierung hier zu optimieren, um diesen Aspekt der Kardiotoxizität besser wiederzugeben. Eine klare Abtrennung von pro-arrhythmischen Effekten und nur leichten Arrhythmien, der Empfindlichkeit der neonatalen Zellen geschuldet, sollte so möglich sein. Eine Quantifizierung zu finden und zu automatisieren, die sowohl die Inzidenz als auch die Ausprägung der Arrhythmien beachtet, ist jedoch nicht so einfach.

Durch den Vergleich der im Impedanzassay und weiteren *in vitro* Assays bestimmten Kardiotoxizität der Referenzsubstanzen mit den in der Klinik beobachteten Nebenwirkungen ließ sich evaluieren, ob sich der vorgestellte Assay als *in vitro* Verfahren zur Charakterisierung der Kardiotoxizitäten eignet. Nicht alle Bereiche der Impedanzmessung ergaben konzentrationsgenaue Ergebnisse, ermöglichten aber dennoch eine gute Einschätzung der kardiotoxischen Effekte. Insbesondere die über die Base-Impedanz bestimmte zellschädigende Wirkung der Substanzen konnte die im Menschen beobachteten Effekte verlässlich wiedergeben und zeigte auch im Vergleich mit gängigen *in vitro* Zytotoxizitäts-Assays vergleichbare Genauigkeit. Die Beeinflussung der Kontraktion durch die Substanzen war weniger sensitiv, gab aber in höheren Konzentrationen einen guten Eindruck über mögliche Effekte, die im Menschen erwartet werden können. Einer der wichtigsten Aspekte der Kardiotoxizität ist das Potential von Substanzen Arrhythmien hervorzurufen. Auch dieser Parameter konnte durch die Impedanzmessung beurteilt werden und identifizierte

pro-arrhythmische Substanzen mit der erhofften Genauigkeit.

Um dieses Assay nun auf noch nicht charakterisierten Substanzen anzuwenden, haben wir im weiteren Teil dieser Arbeit verschiedene niedermolekulare AKT- und ERK-Inhibitoren auf ihre Kardiotoxizität untersucht.

## 4.2 Charakterisierung der Kardiotoxizität niedermolekularer AKT-Inhibitoren

Zur frühzeitigen Evaluierung des kardiotoxischen Potentials von Substanzen sollte eine breite Reihe an Faktoren untersucht werden. Strukturelle wie auch funktionelle Schädigungen von Herzzellen sollten vor ersten zeit- und kostenintensiven Tierversuchen so gut es geht ausgeschlossen werden, um auch die Verwendung von schädlichen Substanzen an Tieren und Menschen so gering wie möglich zu halten. Das zuvor vorgestellte Impedanzsystem ermöglicht hier die Abdeckung einer Vielzahl von möglichen adversen Effekten.

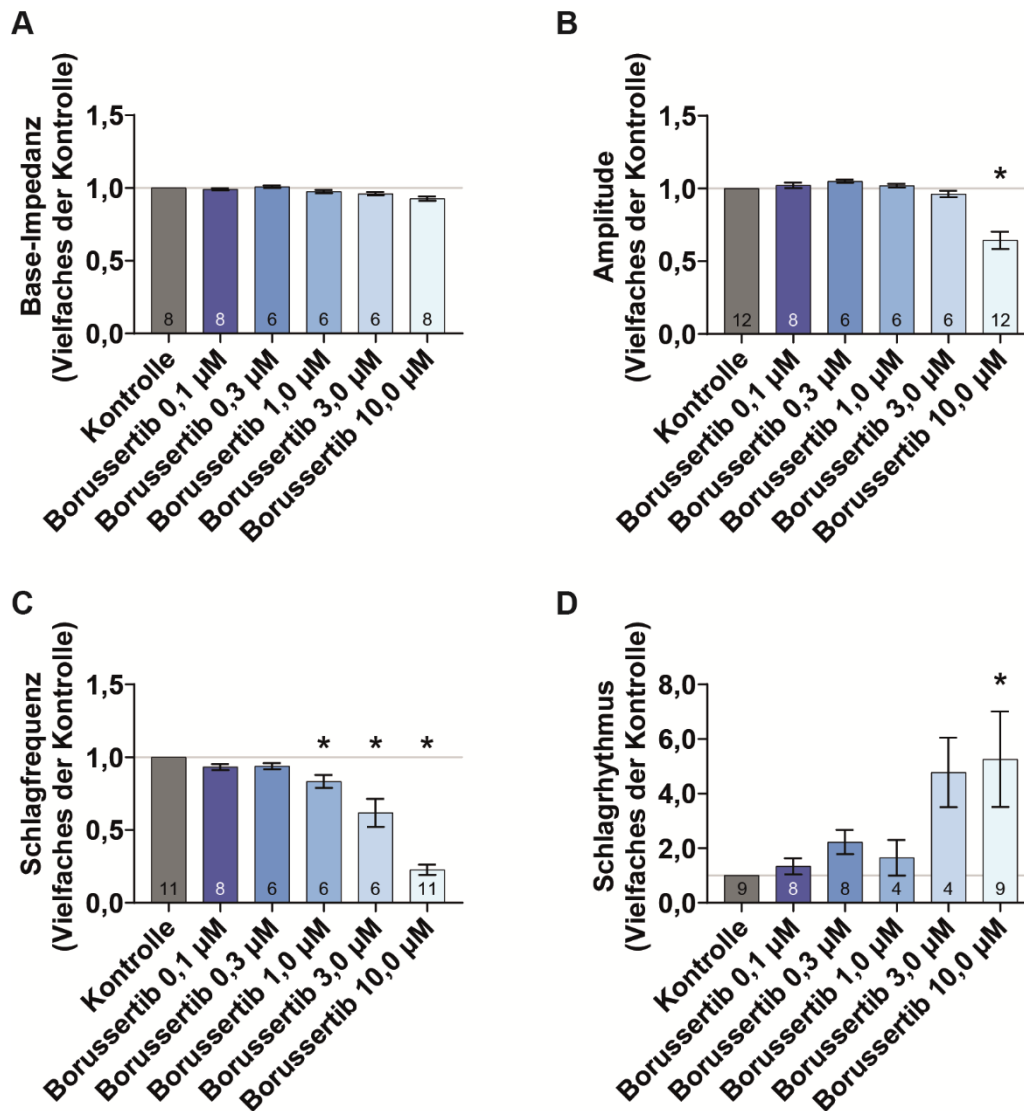
Nachdem die Evaluierung des Impedanz-Assays mit den Referenzsubstanzen eine hohe Übereinstimmung zwischen den *in vitro* Ergebnissen und den klinischen Daten gezeigt hat, soll der Assay nun in noch ungetesteten Substanzen eingesetzt werden. Hierzu werden zwei Klassen von Kinase-Inhibitoren, i.e. AKT-Inhibitoren und ERK-Inhibitoren, auf ihre kardiotoxische Wirkung getestet. Da die Dysregulation der Signalwege von AKT und ERK in Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle spielt, werden zunehmend mehr Inhibitoren dieser Kinasen zur Krebsbehandlung entwickelt [61,114]. Da diese Signalwege jedoch auch in vielen Aspekten der Zellregulation eine wichtige regulatorische Rolle spielen, ist es naheliegend, dass ein Eingriff in diese hochkonservierten Signalkaskaden zu Nebenwirkungen führen kann. Niedermolekulare Kinase-Inhibitoren in diesen Signalwegen sind daher häufig Ursache verschiedener *on-* und *off-Target* Nebenwirkungen, die wir zunächst mit dem Impedanz-Assay charakterisieren wollen. Weitere Aspekte wie hypertrophes Zellwachstum und die Adaption der Wirkstoffe auf einen  $\beta$ -AR Stimulus wurden ergänzend untersucht.

### 4.2.1 Ableitung der Test-Konzentrationen und Bestimmung der Inhibierungseffizienz der AKT-Inhibitoren in Kardiomyozyten

Zur Anwendung des Impedanzassays wurden zunächst eine Reihe von AKT-Inhibitoren gewählt, die sich in verschiedenen Stadien präklinischer und klinischer Studien befinden, und mit diesem und weiteren *in vitro* Assays auf ihre Kardiotoxizität hin untersucht. Hierzu gehört der kovalent-allosterische AKT-Inhibitor Borussertib, welcher bisher ausschließlich in präklinischen Studien untersucht wurde [72,73]; die zwei ATP-kompetitiven AKT-Inhibitoren Capivasertib und Ipatasertib, die sich aktuell in Phase 2 Studien befinden [60,74,77,82]; und die allosterischen AKT-Inhibitoren MK-2206 und Miransertib, die ebenfalls in Phase 2

untersucht werden [91,99,211]. Um eine bestmögliche Charakterisierung dieser Inhibitoren zu ermöglichen, wäre die Messung einer Konzentrationsreihe eine mögliche Option. Dies kann jedoch ohne vorherige Daten zur Effizienz und Wirkung der Substanzen in den Kardiomyozyten zu viele Konzentrationen umfassen, um noch praktikabel zu sein. Um dieses Problem zu umgehen, wurden für diesen Assay Konzentrationen gewählt, die aus den *in vitro* Daten abgeleitet wurden, die sich schon früh in der Entwicklung von neuen Wirkstoffen ermitteln lassen, um nicht von langwierigen *in vivo* Studien abhängig zu sein. Zunächst wurden die *in vitro* bestimmten IC<sub>50</sub> Werte der zellfreien Kinaseinhibierung als Basis verwendet. Um eine repräsentative Konzentration für Zellversuche zu erhalten, verwenden wir das Hundertfache des *in vitro* IC<sub>50</sub> Wertes (100x *in vitro* IC<sub>50</sub>). Da die Wirkstoffe in Menschen noch höhere Konzentrationen erforderlich machen können und um sicher zu stellen, dass auch höhere, evtl. kumulative Konzentrationen der Inhibitoren keine schwerwiegenden kardiotoxischen Effekte haben, wurde zusätzlich das Hundertfache der 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> Konzentration verwendet (10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub>). Eine weitere Konzentration ergibt sich aus den EC<sub>50</sub> Werten der Proliferationshemmung in Brustkrebszellen. Da die effektive Hemmung von Krebswachstum das Ziel der medikamentösen Verwendung der Inhibitoren sein wird, testeten wir zusätzlich die Hundertfache Konzentration dieses EC<sub>50</sub> Wertes (100x EC<sub>50</sub>). Die sich so ergebenden Konzentrationen sind in Tabelle 3 dargestellt. Die maximalen eingesetzten Konzentrationen waren 30 µM, da höhere Konzentrationen in den kultivierten Zellen keine relevanten Unterschiede mehr zeigten. Eine spätere Verwendung der Wirkstoffe in höheren Konzentrationen ist ebenfalls unwahrscheinlich. In den bisherigen klinischen Studien zu AKT-Inhibitoren zeigten sich maximale Serumkonzentrationen von unter 5 µM [60,76,85,92].

Zur Evaluierung dieser gewählten Konzentrationen haben wir eine Konzentrationsreihe von Borussertib in allen Bereichen des Assays gemessen, um die im Assay verwendeten Konzentrationen auf die Abdeckung der relevanten Effekte zu bewerten (Abb. 16). Borussertib verursacht in allen gemessenen Parametern eine konzentrationsabhängige Verschlechterung. Die für Borussertib gewählten Konzentrationen von 100x *in vitro* IC<sub>50</sub>: 0,08 µM; 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub>: 0,5 µM und 100x EC<sub>50</sub>: 8 µM umspannt die beobachteten dosisabhängigen Nebenwirkungen von Borussertib und würden auch ohne eine vollständige Konzentrationsreihe einen guten Überblick auf die Einflüsse von Borussertib auf die NMCM geben. Die vorgestellten Konzentrationen werden daher im weiteren Verlauf verwendet, um die verschiedenen Inhibitoren auf ihre Kardiotoxizität zu untersuchen.



**Abbildung 16** Konzentrationsreihe von Borussertib zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit der Kardiotoxizität. (A) Base-Impedanzmessung von verschiedenen Konzentrationen von Borussertib nach 24 h Inkubation auf NMCM. (B) Amplitude, (C) Schlagrate und (D) Schlagrhythmus nach einstündiger Inkubation von NMCM mit verschiedenen Konzentrationen von Borussertib. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (DMSO). Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Um eine Idee davon zu bekommen, wie effektiv die AKT-Inhibitoren ihre *on-Target* Wirkung in Herzmuskelzellen vermitteln können und wie wahrscheinlich eine Wirkung der Substanzen im Herzen ist, wurde zunächst die Kinasehemmung in den aus Rattenherzen gewonnenen Myoblasten (H9c2 Zellen) untersucht. Hierzu wurde mittels Westernblotanalyse die Phosphorylierung von AKT oder dessen nachgeschaltetem Zielprotein PRAS40 dargestellt

und der kardiale IC<sub>50</sub> Wert der Kinasehemmung bestimmt (Tabelle 4, durchgeführt von Stefan Schraml). Die allosterischen Inhibitoren MK-2206 und Miransertib zeigten hier einen sehr niedrigen IC<sub>50</sub> Wert von 8,8 nM bzw. 12 nM, nahe ihrem *in vitro* IC<sub>50</sub> und weit niedriger als ihr EC<sub>50</sub> in Krebszellen. Die ATP-kompetitiven Inhibitoren Capivasertib und Ipatasertib hemmen die Phosphorylierung von AKT nicht, unterdrücken jedoch seine katalytische Funktion. Um eine Vergleichbarkeit der IC<sub>50</sub> Werte zwischen den Inhibitoren zu ermöglichen, wurden die kardialen IC<sub>50</sub> Werte für pAKT für Capivasertib und Ipatasertib daher aus der Phosphorylierungshemmung von PRAS40 berechnet, mithilfe des aus anderen Messungen ermittelten Umrechnungsfaktors von 3,2. Sie weisen mit 937,5 nM bzw. 178,8 nM verhältnismäßig hohe kardiale IC<sub>50</sub> Werte in Herzzellen auf, weit höher als ihre *in vitro* IC<sub>50</sub> Werte und höher bzw. nahezu gleich ihrem EC<sub>50</sub> in Krebszellen. Der kovalent-allosterische Inhibitor Borussertib bewegt sich mit einem kardialen IC<sub>50</sub> von 36,4 nM zwischen den anderen Klassen und liegt mit seinem kardialen IC<sub>50</sub> signifikant über seinem *in vitro* IC<sub>50</sub> und seinem EC<sub>50</sub> in Krebszellen.

**Tabelle 3** Konzentrationen der AKT-Inhibitoren

Substanz	EC <sub>50</sub> [73]	<i>In vitro</i> IC <sub>50</sub> [73]	100x <i>in vitro</i> IC <sub>50</sub>	10.000x <i>in vitro</i> IC <sub>50</sub>	100x EC <sub>50</sub>
<b>Borussertib</b>	5 nM	0,8 nM	80 nM	8 µM	0,5 µM
<b>Capivasertib</b>	200 nM	0,9 nM	90 nM	9 µM	20 µM
<b>Ipatasertib</b>	200 nM	3,5 nM	350 nM	35 µM (30 µM)	20 µM
<b>MK-2206</b>	60 nM	10 nM	1000 nM	100 µM (30 µM)	6 µM
<b>Miransertib</b>	35 nM	1,4 nM	140 nM	14 µM	3,5 µM

**Tabelle 4** Kardiale IC<sub>50</sub> Werte der Phosphorylierungsinhibierung von AKT und PRAS40 durch die AKT-Inhibitoren in H9c2 Zellen (Durchgeführt von Stefan Schraml)

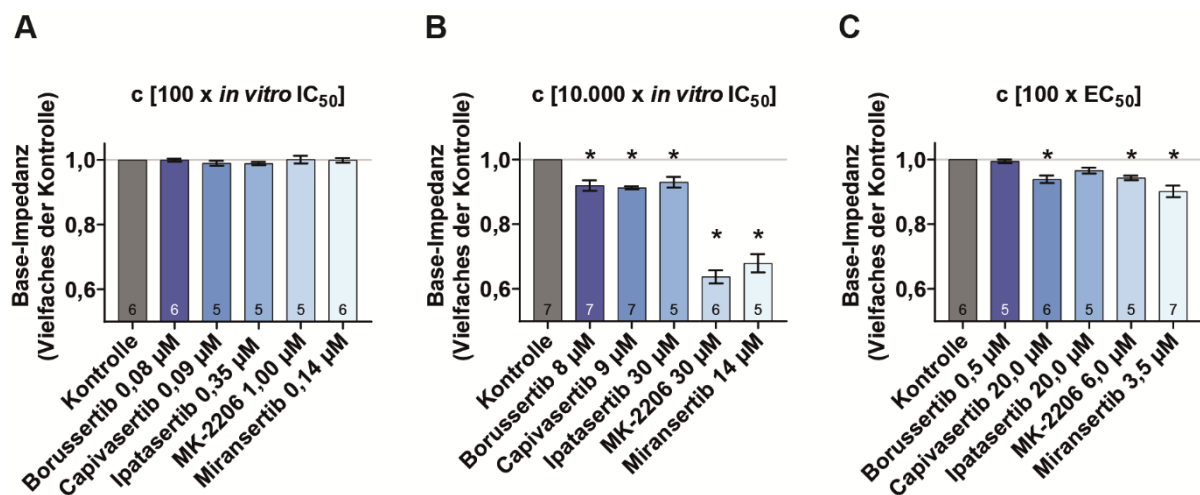
Substanz	IC <sub>50</sub> pAKT	IC <sub>50</sub> pPRAS40
<b>Borussertib</b>	36,4 nM	-
<b>Capivasertib</b>	937,5 nM <sup>a</sup>	3 µM
<b>Ipatasertib</b>	178,8 nM <sup>a</sup>	572,8 nM
<b>MK-2206</b>	8,8 nM	27,5 nM
<b>Miransertib</b>	12 nM	39,4 nM

<sup>a</sup> berechnet aus IC<sub>50</sub> pPRAS40 mit dem aus MK-2206 und Miransertib ermittelten Faktor 3,2

#### 4.2.2 Die allosterischen AKT-Inhibitoren verursachen starke Zellschädigung

In der Evaluierung des Impedanzassays konnte mithilfe der Referenzsubstanzen gezeigt werden, dass die Base-Impedanz nach 24-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren ein verlässliches Maß für die zytotoxische Wirkung auf Herzzellen ist. Die Base-Impedanz nach Einfluss der AKT-Inhibitoren in den verschiedenen Konzentrationen soll nun Auskunft über die zellschädigenden Effekte dieser Inhibitoren geben.

Obwohl wir bei den niedrigen Konzentrationen ( $100\times$  *in vitro*  $IC_{50}$ ) kaum einen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle erkennen konnten (Abb. 17 A), nahm das Zellüberleben bei hohen Konzentration der Inhibitoren ( $10.000\times$  *in vitro*  $IC_{50}$ ) signifikant ab (Abb. 17 B). Trotz des gleichen funktionellen Ziels der AKT-Inhibitoren scheint die Toxizität der Inhibitoren doch voneinander abzuweichen. Borussertib und die ATP-kompetitiven Inhibitoren Capivasertib und Ipatasertib zeigen eine Reduktion des Zellüberlebens um ca. 10 %, wohingegen die allosterischen Inhibitoren MK-2206 und Miransertib eine Reduktion um 32-37 % bedingen. In den anti-proliferatorischen  $EC_{50}$  Konzentrationen ( $100\times$   $EC_{50}$ ) zeigte sich Borussertib und Ipatasertib als sehr gut verträglich mit einem Zellüberleben gleich der unbehandelten Kontrolle (Abb. 17 C). Die anderen verwendeten AKT-Inhibitoren zeigen eine geringe, aber signifikante Abnahme in Zellüberleben zwischen 5 % und 10 %.



**Abbildung 17** Impedanzbasierte Messung des Zellüberlebens nach Inkubation mit den AKT-Inhibitoren. Die Diagramme zeigen das relative Überleben der NMCM gegen die unbehandelte Kontrolle (DMSO) nach 24 stündiger Behandlung mit verschiedenen AKT-Inhibitoren in den Konzentration  $100\times$  *in vitro*  $IC_{50}$  (A),  $10.000\times$  *in vitro*  $IC_{50}$  (B) und  $100\times$   $EC_{50}$  (C). Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM.



Die beobachteten zytotoxischen Effekte der AKT-Inhibitoren lassen vermuten, dass die beobachtete Zytotoxizität von der mechanistischen Wirkungsweise der Inhibitoren abhängt. So zeigen die allosterischen Inhibitoren MK-2206 und Miransertib eine starke Zellschädigung, die in den ATP-kompetitiven Inhibitoren Capiwasertib und Ipatasertib sehr viel geringer ausfällt. Der kovalent allosterische Inhibitor Borussertib verursachte ebenfalls nur sehr geringe Zellschädigung. Um eine genaue Aussage über die Kausalität treffen zu können, werden jedoch mehr Inhibitoren zum Vergleich benötigt.

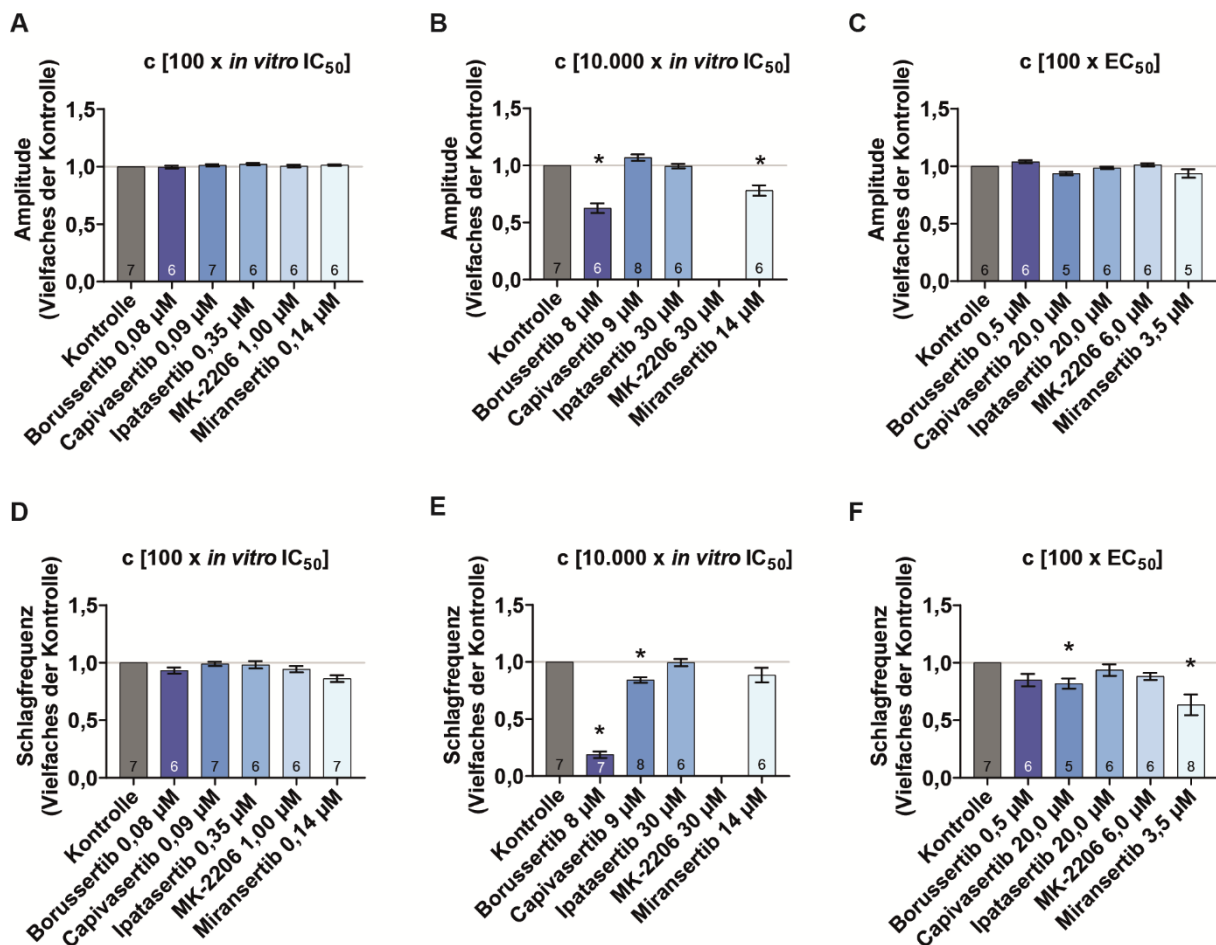
Nachdem die Charakterisierung der zellschädigenden Wirkung der AKT-inhibitoren in NMCM eine erste Idee über die Kardiotoxizität gegeben hat, werden im weiteren die kontraktilen Funktionen der Kardiomyozyten unter Inhibitor-Einfluss untersucht, um ein genaueres Bild der Inhibitorwirkung auf die Herzzellen zu bekommen.

#### **4.2.3 Identifizierung funktioneller Toxizität der AKT-Inhibitoren auf die kontraktile Funktion von NMCM**

Zur Bestimmung der toxischen Wirkung der Substanzen auf die mechanische Funktion der Kardiomyozyten wurde die Schlagfrequenz und die Amplitude der kontrahierenden Zellen nach einstündiger Behandlung mit den verschiedenen AKT-Inhibitoren gemessen. Bei geringer Konzentration (100x *in vitro* IC<sub>50</sub>) zeigte sich keine Veränderung der Amplitude oder der Schlagrate nach Inkubation mit den verschiedenen AKT-Inhibitoren (Abb. 18 A & D). Bei höheren Konzentrationen der Inhibitoren (10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub>) (Abb. 18 B & E) zeigte Borussertib eine starke Verringerung der Schlagfrequenz, die auch mit einer signifikanten Verringerung der Amplitude einherging. Capiwasertib zeigte ebenfalls eine Verringerung der Schlagrate, allerdings keine Reduktion der Amplitude. Miransertib hingegen wies eine verringerte Amplitude, aber eine gleichbleibende Schlagfrequenz auf. Die mit einer hohen Konzentration von MK-2206 behandelten Zellen verloren jegliche Kontraktion und es konnte keine Schlagrate oder Amplitude mehr gemessen werden. Mit Ipatasertib behandelte Zellen zeigten über alle Konzentrationen hinweg ein gleichbleibend stabiles Schlagmuster, das sich von der Kontrolle nicht unterschied. Bei den aus der Proliferationshemmung abgeleiteten Konzentrationen (100x EC<sub>50</sub>) zeigte sich bei keinem der AKT-Inhibitoren eine Veränderung der Amplitude. Die Schlagrate war nur bei Capiwasertib und Miransertib signifikant verringert (Abb. 18 C & F).

Wie zuvor in der zytotoxischen Wirkung der Inhibitoren beobachtet, verursachen die

ATP-kompetitiven Inhibitoren Capiwasertib und Ipatasertib im Vergleich zu den allosterischen Inhibitoren MK-2206 und Miransertib weniger Verschlechterung der Kontraktilität. Ein klarer Zusammenhang zwischen den beobachteten Effekten und der Art der AKT-Hemmung ist, anders als bei der Base-Impedanz, hier nicht klar erkennbar. Die beobachteten Effekte scheinen daher nicht ausschließlich durch die Art der AKT-Hemmung vermittelt und stattdessen durch weitere Parameter beeinflusst zu werden.



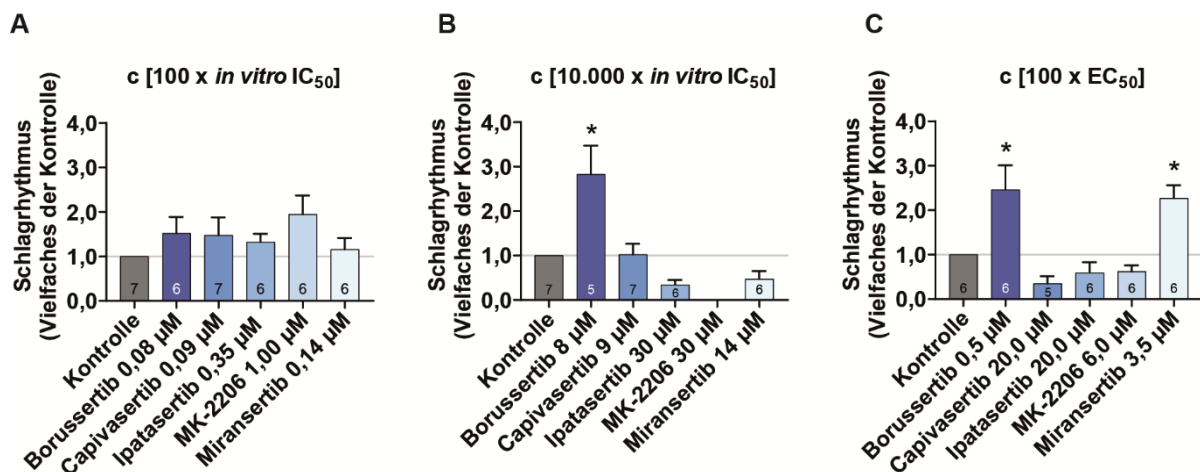
**Abbildung 18** Die Impedanzmessung zur Untersuchung des Schlagmusters der NMCM nach einstündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der AKT-Inhibitoren. Die Amplitude nach Behandlung mit den AKT-Inhibitoren in den Konzentrationen 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> (A), 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> (B) und 100x EC<sub>50</sub> (C) als Vielfaches der Kontrolle gemessen. Die Schlagrate nach Behandlung mit den AKT-Inhibitoren in den Konzentrationen 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> (D), 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> (E) und 100x EC<sub>50</sub> (F) als Vielfaches der Kontrolle (DMSO) gemessen. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*, P < 0,05 zur Kontrolle. Mittelwert ± SEM.

#### 4.2.4 Borussertib und Miransertib verursachen Arrhythmien in NMCM

Um die pro-arrhythmische Wirkung der Substanzen auf die Zellen zu untersuchen, wurde der Schlagrhythmus der Zellen nach einstündiger Inkubation mit den Inhibitoren untersucht. Ein Schlagrhythmus  $\leq 1$  zeigt einen ungestörten Schlagrhythmus gleich oder besser der unbehandelten Kontrolle. Mit zunehmender Arrhythmie der Zellen erhöht sich der numerische Wert des dargestellten Schlagrhythmus.

Die mit den ATP-kompetitiven Inhibitoren Capiwasertib und Ipatasertib behandelten Zellen wiesen in allen gemessenen Konzentrationen ein gleichbleibend rhythmisches Schlagmuster auf (Abb. 19 A-C). Zellen, die mit dem allosterischen Inhibitor MK-2206 behandelt wurden, zeigten bei höchsten Konzentrationen keine kontraktile Funktion mehr, hatten aber in den anderen, niedrigeren Konzentrationen keine Arrhythmien.

Borussertib und Miransertib zeigten signifikante pro-arrhythmische Effekte in den kultivierten Zellen. Borussertib verursachte nur in sehr geringer Konzentration keine Arrhythmien, bei mittlerer und hoher Konzentration nahm das Maß an Arrhythmien dosisabhängig zu. Miransertib hingegen zeigte nur bei einer Konzentration von 100x  $EC_{50}$  und nicht bei höheren Konzentrationen pro-arrhythmische Effekte.



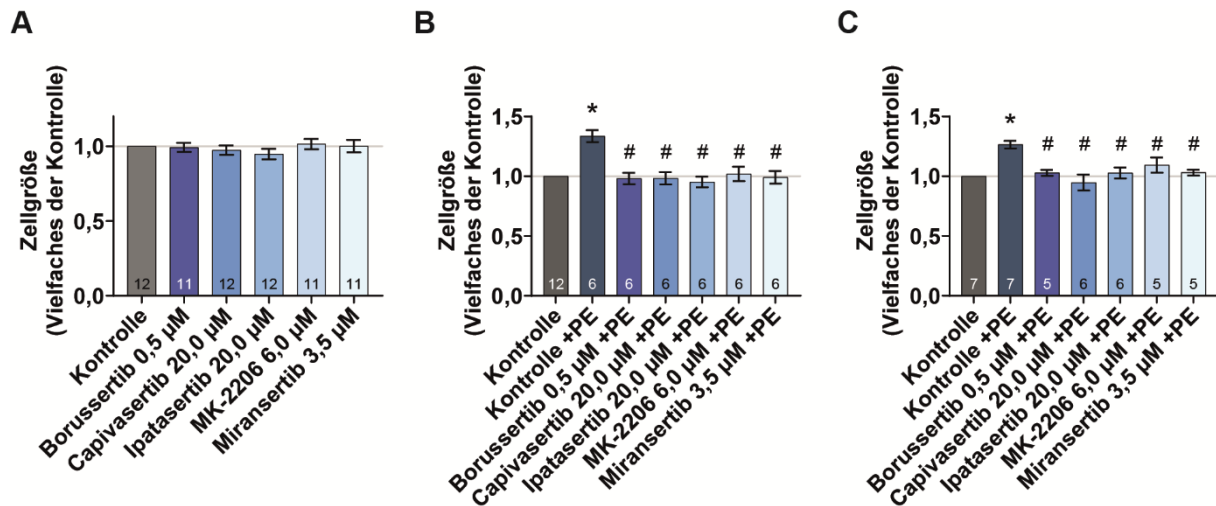
**Abbildung 19** Die Impedanzmessung gibt Aufschluss über den Schlagrhythmus und somit über das arrhythmische Potential der Substanzen in den NMCM nach 1h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der AKT-Inhibitoren. (A-C) Der Schlagrhythmus wurde nach Behandlung mit den AKT-Inhibitoren in den Konzentrationen 100x  $IC_{50}$  (A), 10.000x  $IC_{50}$  (B) und 100x  $EC_{50}$  (C) gemessen und als Vielfaches der Kontrolle (DMSO) angegeben. Ein hoher Wert im Vergleich zur Kontrolle zeigt ein zunehmend ungleichmäßigeres Schlagmuster. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Substanzen, die Arrhythmien auslösen können, sind ein schwerwiegendes Gesundheitsrisiko in der späteren Anwendung in Tieren oder Menschen und sollten näher untersucht werden. Da das Impedanzassay keine Informationen über die Ursachen der Arrhythmien liefert, ist eine nähere Untersuchung der auffälligen Substanzen zu empfehlen.

#### **4.2.5 AKT-Inhibitoren verhindern hypertrophes Zellwachstum**

Zur Charakterisierung weiterer kardiotoxischer Einflüsse, die mithilfe der zellulären Impedanzmessung nicht direkt erfasst werden können, untersuchten wir weitere Parameter nach der AKT-Inhibitoreinwirkung. Um den Einfluss der AKT-Inhibitoren auf das kardiale Zellwachstum zu untersuchen, wurde das Zytoskelett der NMCM nach Inkubation mit den verschiedenen Inhibitoren mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin angefärbt und die Querschnittsfläche der Zellen mikroskopisch bestimmt. Es ergab sich, dass die Behandlung der NMCM mit den Inhibitoren keinen direkten Einfluss auf die Zellgröße hatte und sich bei keinem der Inhibitoren von der unbehandelten Kontrolle unterschied (Abb. 20 A).

Um die Reaktion der Zellen nach Inkubation mit den Inhibitoren auf einen externen hypertrophen Stimulus zu untersuchen, wurden Phenylephrin (PE) oder insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF) verwendet, welche die physiologischen Signalwege ansprechen, die das hypertrophe Zellwachstum antreiben [212,213]. In den unbehandelten Kontrollzellen führte der Stimulus mit PE oder IGF zu einem signifikanten Zellwachstum um etwa 25 %. Allerdings schienen alle AKT-Inhibitoren ein Zellwachstum durch PE oder IGF zu unterdrücken und die Zellgröße blieb bei den behandelten Zellen auch nach den Stimuli gleich der unbehandelten Kontrolle (Abb. 20 B & C). Da der PI3K/AKT Signalweg für seine Beteiligung an hypertrophem Zellwachstum bekannt ist, ist eine Reduktion der hypertrophen Antwort auf die Stimuli nach AKT-Inhibierung nicht überraschend [155].

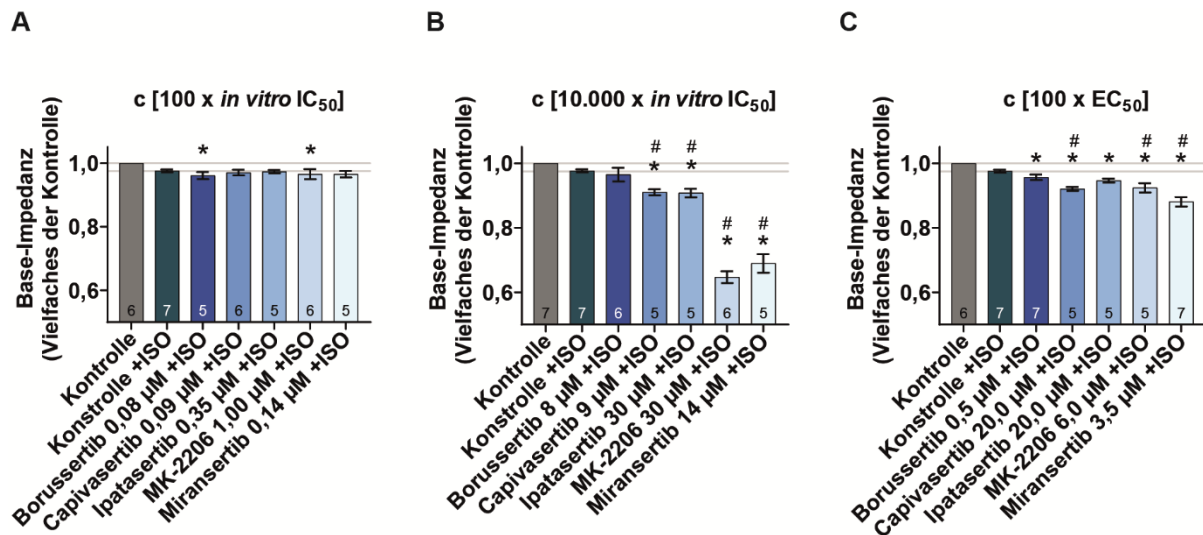


**Abbildung 20** Phalloidin Assay zur Untersuchung von Zellgrößen von NMCM nach Inkubation mit AKT-Inhibitoren für 24 h. (A) Die Zellgröße wird dargestellt als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle. (B) Zellgröße der NMCM nach Inkubation mit AKT-Inhibitoren und Stimulation der Zellen mit 4  $\mu$ M Phenylephrin (PE) für 24 h als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle. (C) Zellgröße der NMCM nach Inkubation mit AKT-Inhibitoren und Stimulation der Zellen mit 30 pM insulinähnlichem Wachstumsfaktor (IGF) für 24 h als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*,  $P < 0,05$  zur Kontrolle; #,  $P < 0,05$  zur stimulierten Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM.

#### 4.2.6 Der Einfluss von Isoproterenol auf die kardiotoxische Wirkung der AKT-Inhibitoren

Die zuvor gezeigten Versuche geben ein recht klares Bild über die kardiotoxische Wirkung der Substanzen in gesunden Kardiomyozyten. Allerdings ist es nicht selten, dass Patienten Komorbiditäten aufweisen und diese in der Auswahl und Verwendung von Medikamenten eine wichtige Rolle spielen. Häufig auftretende Komorbiditäten sind z.B. Übergewicht, erhöhtes Risiko für Herzkrankheiten oder zuvor aufgetretene Herzschädigungen. Um die Substanzen auch auf ihre Wirkung unter verschiedenen Risikofaktoren zu testen, ist es aufgrund des simplen Aufbaus des Assays möglich, dieses zu variieren und die Substanzen auf verschiedene Arten von stressinduzierten Nebenwirkungen zu testen. Zu diesem Zweck wurde der Stress durch die Zugabe von Isoproterenol induziert. Dieser  $\beta$ -adrenerge-Rezeptoragonist, der ähnlich wie Adrenalin die Schlagfrequenz von Kardiomyozyten steigert, simuliert eine Stressreaktion für die Zellen [214]. Eine nachfolgende Messung der zuvor beschriebenen Parameter zeigt die kardiotoxischen Effekte der Inhibitoren unter Stress.

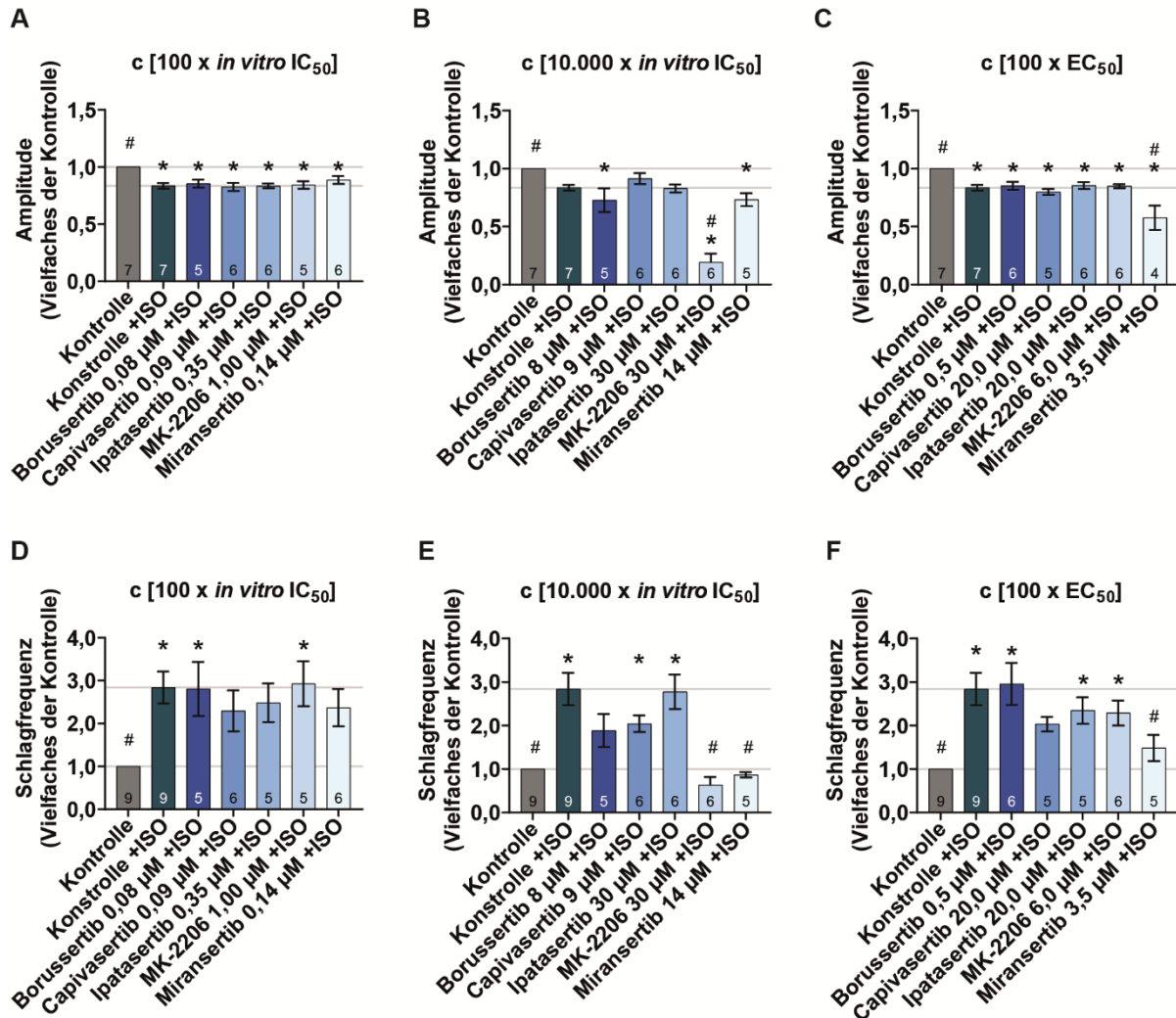
Die Stimulation der Zellen sorgte für eine generelle Reduktion des Zellüberlebens unabhängig von der Inhibitoreinwirkung. In den stimulierten Zellen zeigten sich die gleichen Einflüsse der Inhibitoren auf das Zellüberleben wie zuvor in den unstimulierten Zellen. Die Reduktion des Zellüberlebens durch den Stimulus und die Inhibitoren scheint rein additiv zu sein und sich nicht weiter gegenseitig zu beeinflussen (Abb. 21 A-C).



**Abbildung 21** Einfluss der AKT-Inhibitoren auf das Zellüberleben nach Stimulation mit Isoproterenol (ISO). Die Diagramme zeigen das relative Überleben der NMCM gegen die stimulierte Kontrolle (DMSO) nach 24 h Behandlung mit verschiedenen AKT-Inhibitoren in den Konzentration 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> (A), 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> (B) und 100x EC<sub>50</sub> (C). Die Stimulation mit 43 nM Isoproterenol erfolgte eine Stunde nach Zugabe der Substanzen. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*, P<0,05 zur Kontrolle; #, P<0,05 zur stimulierten Kontrolle. Mittelwert ± SEM.

Nach Stimulation mit Isoproterenol nimmt die Schlagfrequenz der Kontrollzellen signifikant zu, was eine gute Simulation der physiologischen Reaktion auf Stress ist, wohingegen die Amplitude abnimmt (Abb. 22). Die Abnahme der Amplitude hingegen ist ein Artefakt der Impedanzmessung in kultivierten NMCM und nimmt reziprok mit der Zunahme der Frequenz ab [175,215]. Die meisten der Inhibitoren zeigen auch in ihrem Einfluss auf die Schlagrate und die Amplitude jenseits der additiven Effekte von Stimulation und Inkubation keinen relevanten Unterschied zu den in unstimulierten Zellen gemessenen Ergebnissen. Die einzige Ausnahme bildet hier MK-2206, dessen Wirkung bei hoher Konzentration in unstimulierten Zellen zu

einem kompletten Verlust der Funktion führte, unter Stimulation jedoch eine stabile, wenn auch stark reduzierte Schlagfunktion der Zellen zuließ (Abb. 22).

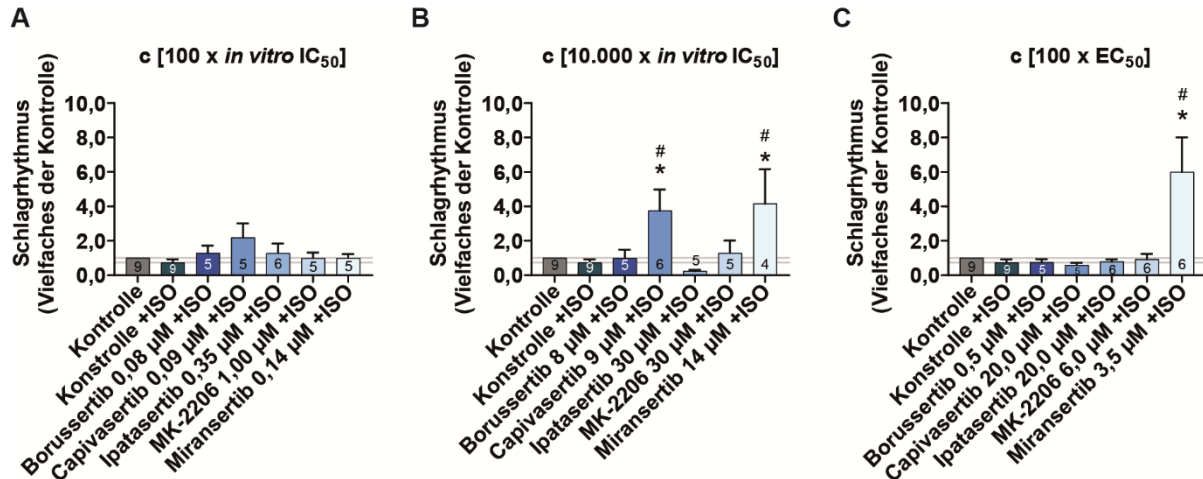


**Abbildung 22** Einfluss der AKT-Inhibitoren auf das Schlagverhalten der NMCM nach Inhibitorzugabe und Stimulation mit Isoproterenol (ISO). (A-C) Die Diagramme zeigen die Amplitude der Kontraktion gegen die stimulierte Kontrolle (DMSO) nach 1 h Behandlung mit verschiedenen AKT-Inhibitoren in den Konzentration 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> in vitro (A), 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> in vitro (B) und 100x EC<sub>50</sub> (C) und 2 min Stimulation mit 43 nM Isoproterenol. (D-F) Die Diagramme zeigen die Schlagrate der Kontraktion gegen die stimulierte Kontrolle (DMSO) nach 1h Behandlung mit verschiedenen AKT-Inhibitoren in den Konzentration 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> (D), 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> (E) und 100x EC<sub>50</sub> (F) und 2 min Stimulation mit 43 nM Isoproterenol. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*, P<0,05 zur Kontrolle; #, P<0,05 zur stimulierten Kontrolle. Mittelwert ± SEM.



Den größten Einfluss der Stimulation auf die Funktion der Zellen ließ sich im Schlagrhythmus der Zellen beobachten. Die Stimulation der Kontrollzellen führte hier zu keinen Veränderungen der Schlagrhythmik (Abb. 23). Bemerkenswert ist, dass die Stimulation mit Isoproterenol die arrhythmische Wirkung von Borussertib in den höheren Konzentrationen vollständig zu unterdrücken schien.

Capivasertib zeigte nach Stimulation eine signifikante arrhythmische Wirkung auf die Zellen, die nur in der mittleren Konzentration auftrat. Capivasertib verursachte vor der Stimulation keine Veränderungen im Schlagrhythmus und auch in sehr niedriger und sehr hoher Konzentration blieb es nach der Stimulation unauffällig. Die Schlagfunktion von MK-2206 in seiner höchsten Konzentration war nach der Stimulation der Zellen wiederhergestellt und verursachte in keiner Konzentration Arrhythmien. MK-2206 und Ipatasertib zeigten in stimulierten Zellen bei keiner Konzentration pro-arrhythmische Wirkung auf die Zellen. Die Wirkung von Miransertib auf die Rhythmik der Zellen schien durch die Stimulation mit Isoproterenol verstärkt zu werden und zeigt nur in der niedrigsten Konzentration keine Arrhythmien.



**Abbildung 23** Einfluss der AKT-Inhibitoren auf den Schlagrhythmus der NMCM nach Stimulation mit Isoproterenol (ISO). (A-C) Die Diagramme zeigen den Schlagrhythmus der Kontraktion gegen die stimulierte Kontrolle (DMSO) nach 1 h Behandlung mit verschiedenen AKT-Inhibitoren in den Konzentration 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> (A), 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> (B) und 100x EC<sub>50</sub> (C) und 2 min Stimulation mit 43 nM Isoproterenol. Ein hoher Wert im Vergleich zur Kontrolle bedeutet einen unregelmäßigen Rhythmus der Kontraktionen. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*, P<0,05 zur Kontrolle; #, P<0,05 zur stimulierten Kontrolle. Mittelwert ± SEM.



### 4.3 Charakterisierung der Kardiotoxizität niedermolekularer ERK-Inhibitoren

Zusätzlich zu den AKT-Inhibitoren wurden mit diesem Assay ERK-Inhibitoren auf ihre Kardiotoxizität untersucht. Der MAPK-Signalweg ist nicht nur ein sehr vielfältiger und wichtiger regulatorischer Mechanismus in nahezu allen Zellarten, sondern stellt auch einen der meistmutierten Signalwege in Krebserkrankungen dar [101,104,114]. ERK-Inhibitoren sind daher nicht nur ein vielversprechender Ansatz für neue Therapien, sondern weisen auch ein hohes Risiko für *on-Target* Nebenwirkungen in anderen Zelltypen auf. Obwohl einige ERK-Inhibitoren in der präklinischen Forschung schon seit einigen Jahren untersucht werden, gibt es nach wie vor keine für die Behandlung zugelassenen Wirkstoffe dieser Kategorie [190]. Die Datenlagen zu klinischen Nebenwirkung, insbesondere kardiotoxischen Effekte, ist schlecht und die Effekte größtenteils unbekannt.

#### 4.3.1 Ableitung der Test-Konzentrationen und Bestimmung der Inhibierungseffizienz der ERK-Inhibitoren in Kardiomyozyten

Die Konzentrationen, die für dieses *in vitro* Assay verwendet wurden, wurden aus den *in vitro* Daten der zellfreien Kinasehemmung abgeleitet. Wie zuvor bei den AKT-Inhibitoren, wurde ein Konfidenzabstand mit den Faktoren 100 bzw. 10.000 berechnet. Die maximal eingesetzte Konzentration sollte 30  $\mu\text{M}$  nicht überschreiten und wurde darauf festgelegt bei Werten, die darüber hinausgingen (Tabelle 5). Höhere Konzentrationen sind in der Verwendung bei Menschen nicht erwarten, da sich in verschiedenen Phase 1 Studien zu ERK-Inhibitoren gezeigt hat, dass mit einer maximalen Serumkonzentration zu rechnen ist, die 10  $\mu\text{M}$  nicht weit überschreitet [117,119,152]. Eine dritte Konzentration aus den  $\text{EC}_{50}$  Werten der Proliferationshemmung konnte hier noch nicht eingesetzt werden, da eine Bestimmung dieser  $\text{EC}_{50}$  Werte noch aussteht. Zur ersten Einstufung der kardiotoxischen Effekte der Inhibitoren wurde die Charakterisierung daher zunächst mit nur zwei Konzentrationen durchgeführt.

Um die Effizienz der Inhibitoren in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden mittels Westernblotanalyse Inhibierungsassays durchgeführt, um die Hemmung von ERK anhand von phosphoryliertem ERK oder seinen nachstehenden Zielproteinen zu bestimmen (Tabelle 6). Da DEL-22379 ein Dimerisierungshemmer von ERK ist [137], konnte mithilfe des verwendeten Assays keine Inhibierungseffizienz identifiziert werden, da nicht die Kinasefunktion von ERK-Inhibiert wird, sondern die Lokalisation verändert. Eine Bestimmung der

Dimerisierungshemmung in Kardiomyozyten steht noch aus. Die restlichen ERK-Inhibitoren wiesen  $IC_{50}$  Werte auf, die zwar höher waren als die  $IC_{50}$  Werte der zellfreien Assays, aber zueinander eine ähnliche Effizienz aufwiesen. Bemerkenswert ist jedoch Ulixertinib, welches in zellfreien Assays einen sehr niedrigen  $IC_{50}$  von nur 0,3 nM aufwies, in kardialen Zellen jedoch den höchsten  $IC_{50}$  mit 359,6 nM zeigte. Ein hoher  $IC_{50}$  Wert in kardialen Zellen lässt grundsätzlich vermuten, dass erst bei hohen Konzentrationen *on-Target* Effekte im Herzen auftreten. *Off-Target* Effekte durch den Inhibitor können allerdings nicht ausgeschlossen werden.

**Tabelle 5** Konzentrationen der ERK-Inhibitoren für die Impedanzmessung

Substanz	In vitro $IC_{50}$	100x in vitro $IC_{50}$	10.000x in vitro $IC_{50}$
<b>DEL-22379</b>	1 nM [137]	100 nM	10 $\mu$ M
<b>Sch772984</b>	1 nM [147]	100 nM	10 $\mu$ M
<b>MK-8353</b>	7 nM [151]	700 nM	70 $\mu$ M (30 $\mu$ M)
<b>Ravoxertinib</b>	3,1 nM [144]	310 nM	31 $\mu$ M (30 $\mu$ M)
<b>Ulixertinib</b>	0,3 nM [154]	30 nM	3 $\mu$ M
<b>Ly-3214996</b>	5 nM [216]	500 nM	50 $\mu$ M (30 $\mu$ M)

**Tabelle 6**  $IC_{50}$  Werte der Phosphorylierungshemmung von ERK und P90RSK durch die Erk-Inhibitoren in H9c2 Zellen (Durchgeführt von Stefan Schraml)

Substanz	$IC_{50}$ pERK	$IC_{50}$ pP90RSK
<b>DEL-22379<sup>a</sup></b>	-	-
<b>Sch772984</b>	-	23,9 nM
<b>MK-8353</b>	172,2 nM	-
<b>Ravoxertinib</b>	-	178,8 nM
<b>Ulixertinib</b>	-	359,6 nM
<b>Ly-3214996</b>	-	222,8 nM

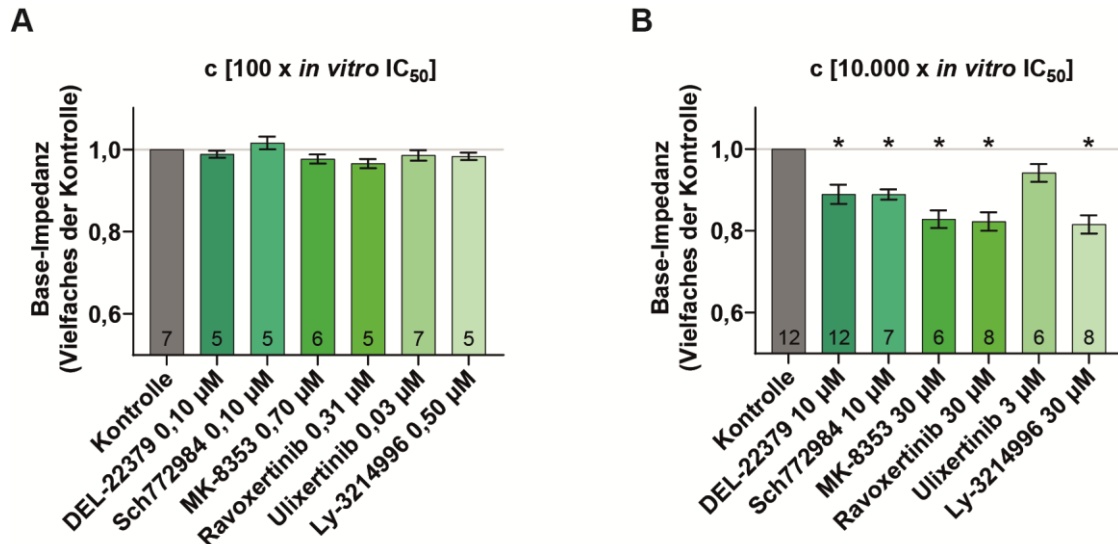
<sup>a</sup> Assay auf diesen Inhibitor nicht anwendbar

#### 4.3.2 ERK-Inhibitoren verursachen konzentrationsabhängige Zellschädigung in NMCM

Um die zellschädigenden Effekte der ERK-Inhibitoren zu untersuchen, wurde zunächst die Base-Impedanz als Maß für das Zellüberleben gemessen. Bei niedrigen Konzentrationen ließen sich bei keinem der Inhibitoren zytotoxische Einflüsse erkennen. In den hohen Konzentrationen

zeigten nahezu alle ERK-Inhibitoren zellschädigende Effekte zwischen 10 % und 18 % (Abb. 24). Die einzige Ausnahme bildet hier Ulixertinib, das zwar eine tendenzielle Abnahme des Zellüberlebens zu verursachen schien, aber keine signifikanten Effekte auslöste. Grundsätzlich schien die Zellschädigung der Substanzen mit der eingesetzten Konzentration zu korrelieren. Da Ulixertinib ERK sehr effektiv *in vitro* hemmen konnte, konnte es hier in sehr geringer Konzentration verwendet werden (3  $\mu\text{M}$ ), wohingegen DEL-22379 und SCH772984 mit einer sehr viel höheren Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt wurden und so eine signifikante Zellschädigung verursachten. MK-8353, Ravoxertinib und Ly-3214996 wurden mit der höchsten der verwendeten Konzentrationen eingesetzt (30  $\mu\text{M}$ ) und zeigten auch die stärkste Zellschädigung.

Da die Zellschädigung bei allen ERK-Inhibitoren in ähnlichem Maße konzentrationsabhängig zu sein schien, lässt sich vermuten, dass es sich unabhängig vom Mechanismus um *on-Target* Effekte der ERK-Inhibierung handelt. Sollte sich dieser toxische Effekt auch auf die kontraktile Funktion der Zellen ausweiten, würden sich ERK-Inhibitoren nicht zur sicheren Therapie in Menschen eignen.



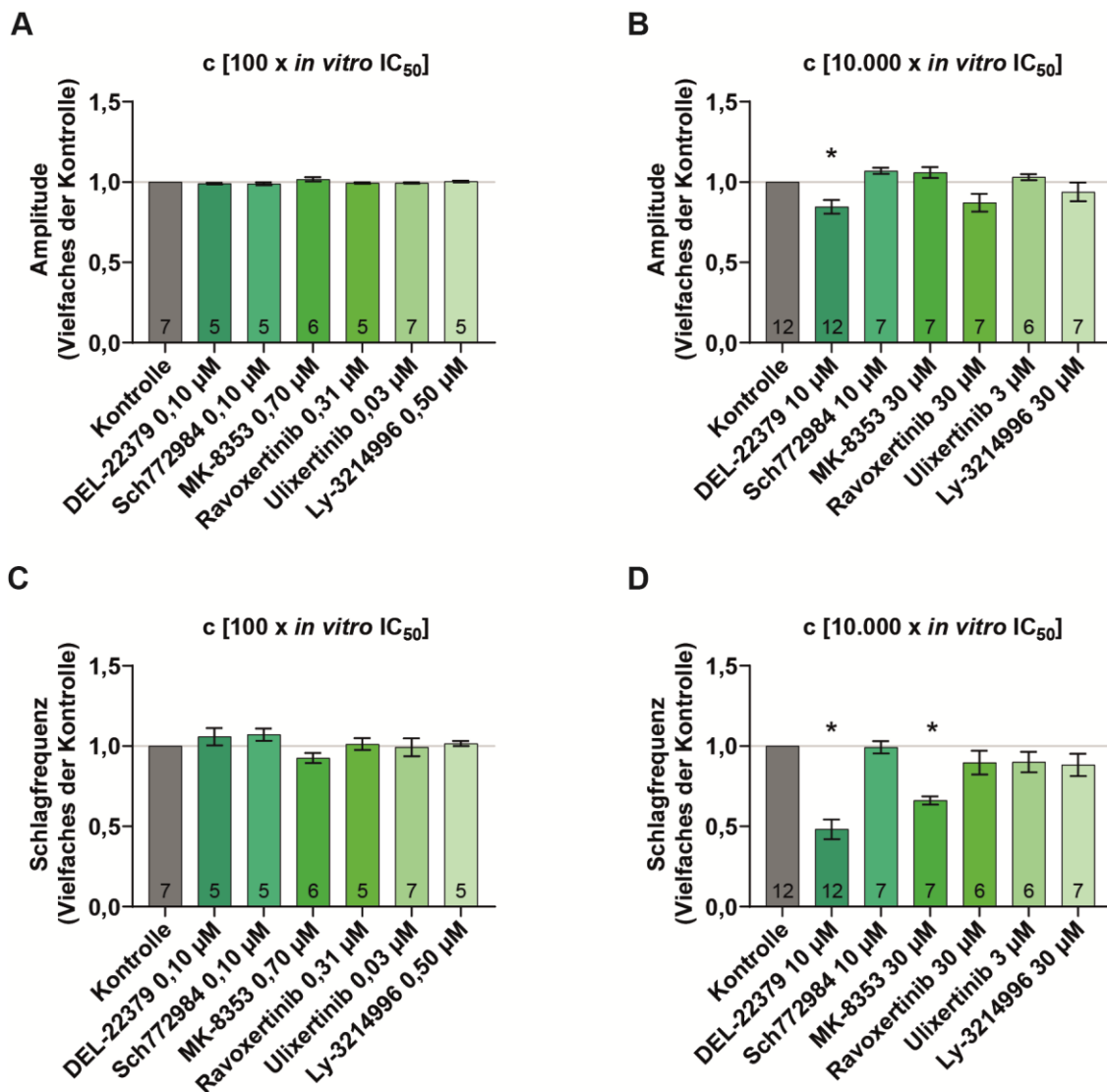
**Abbildung 24** Einfluss der ERK-Inhibitoren auf das Zellüberleben. Die Diagramme zeigen das relative Überleben der NMCM gegen die unbehandelte Kontrolle (DMSO) nach 24 h Behandlung mit verschiedenen ERK-Inhibitoren in den Konzentration 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> in vitro (A) und 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> in vitro (B). Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*, P<0,05 zur Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 4.3.3 DEL-22379 und MK-8353 beeinträchtigen die Kontraktion der Zellen

Zur Bestimmung der Inhibitorwirkung auf die kontraktile Funktion der NMCM wurde die Schlagfunktion der Zellen nach einstündiger Behandlung mit den Inhibitoren untersucht.

Sowohl in der Amplitude als auch der Schlagrate der kontrahierenden Zellen zeigten sich in den niedrigen Konzentrationen aller ERK-Inhibitoren keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (Abb. 25 A & C). MK-8353 verursachte eine tendenzielle Abnahme der Schlagrate schon bei geringer Konzentration, die jedoch keine Signifikanz erreichte. In den hohen Konzentrationen hingegen beeinflussten DEL-22379 und MK-8353 die Kontraktion der Zellen (Abb. 25 B & D). Während DEL-22379 sowohl die Amplitude um etwa 14 % und die Schlagrate um fast 55 % senkte, wurde von MK-8353 nur die Schlagrate um etwa 34 % verringert, während die Amplitude gleichblieb. Ravoxertinib zeigte bei hoher Konzentrationen eine Verringerung der Amplitude um ca. 12 %, die aufgrund der hohen Schwankungen der Messungen jedoch keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle hatte.

Die zuvor beobachtete konzentrationsabhängige Schädigung der Zellen durch die ERK-Inhibitoren spiegeln sich in den Messungen der kontraktilen Funktion nicht wider. Größtenteils scheint die Kontraktion der Zellen durch die Inhibierung von ERK nicht beeinträchtigt zu werden und nur einzelne Inhibitoren verursachen eine Verschlechterung der Kontraktion. Anders als die strukturelle Zellschädigung handelt es sich hierbei vermutlich nicht um *on-Target* Effekte. Aufgrund welcher Mechanismen DEL-22379 und MK-8353 kann mithilfe dieses Assays nicht bestimmt werden und weitere Untersuchungen zur Wirkung und Spezifität der Inhibitoren sind nötig, um die Ursachen besser zu charakterisieren.

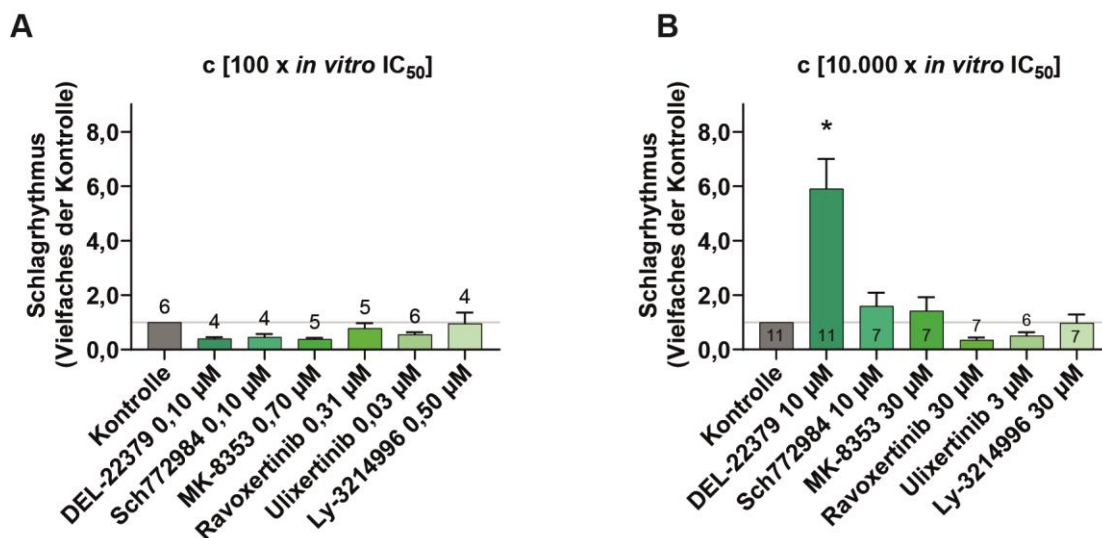


**Abbildung 25** Die Impedanzmessung gibt Aufschluss über das Schlagmuster der NMCM nach einstündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der ERK-Inhibitoren. (A-B) Die Amplitude nach Behandlung mit den Konzentrationen 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> (A) und 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> (B) als Vielfaches der Kontrolle (DMSO). (C-D) Die Schlagrate nach Behandlung mit den Konzentrationen 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> (C) und 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> (D) als Vielfaches der Kontrolle (DMSO). Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*, P<0,05 zur Kontrolle. Mittelwert ± SEM.

#### 4.3.4 DEL-22379 verursacht Arrhythmien bei hohen Konzentrationen

Die Rhythmik der Kontraktionen ist ein wichtiger Faktor in der Gesundheit der Kardiomyozyten. Die Fähigkeit von Wirkstoffen diese Rhythmik zu beeinflussen ist ein wichtiger Nebeneffekt, der früh identifiziert werden sollte.

In den niedrigen Konzentrationen verursachte keiner der ERK-Inhibitoren Arrhythmien in den NMCM und der Schlagrhythmus unterschied sich nicht von der Kontrolle (Abb. 26 A). In den höheren Konzentrationen hingegen konnte ein signifikanter Verlust des Schlagrhythmus nach Behandlung mit DEL-22379 beobachtet werden, während alle anderen Inhibitoren auch hier unauffällig waren (Abb. 26 B). Im Vergleich zu den bisher gemessenen Referenzsubstanzen und AKT-Inhibitoren verursacht DEL-22379 die bisher stärksten Arrhythmien.



**Abbildung 26** Die Impedanzmessung gibt Aufschluss über den Schlagrhythmus und somit über das arrhythmische Potential der Substanzen in den NMCM nach 1 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der ERK-Inhibitoren. Der Schlagrhythmus wurde nach Behandlung mit den ERK-Inhibitoren in den Konzentrationen 100x *in vitro* IC<sub>50</sub> (A) und 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub> (B) und als Vielfaches der Kontrolle (DMSO) angegeben. Ein hoher Wert im Vergleich zur Kontrolle zeigt ein zunehmend ungleichmäßigeres Schlagmuster. Die Anzahl der unabhängigen Versuche ist in den jeweiligen Balken angegeben. \*, P<0,05 zur Kontrolle. Mittelwert ± SEM.

## 5 Diskussion

### 5.1 Kardiotoxizität in der Krebstherapie

Die ständige Weiterentwicklung von Chemotherapeutika zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten zu einem Anstieg der Überlebensrate von Krebspatienten geführt. Dieser Gewinn an Lebenszeit nach überstandenen Tumorerkrankungen kommt allerdings nicht ohne Kehrseite. Die häufig verheerenden Langzeitnebenwirkungen von Krebstherapien stellen ein zunehmendes Problem dar. Viele der aktuell klinisch verwendeten Wirkstoffe haben kardiotoxische Nebenwirkungen, die sowohl strukturelle als auch funktionelle Schädigung am Herzen verursachen können [8,217]. Dies kann zu schwerer Myokardschädigung führen, die erst Jahre später pathologische Symptome in der Herzgesundheit zeigt. Gleichzeitig können die Wirkstoffe auch akute Schäden am Herzen und dessen Funktion verursachen. Eine hieraus notwendige Dosisreduktion oder gar ein Abbruch der Therapie aufgrund von Kardiotoxizität kann eine erfolgreiche Krebstherapie verhindern [7,12]. Zwar ist es möglich, die akut auftretenden Nebenwirkungen symptomatisch zu behandeln, um die Behandlung so lange wie möglich fortführen zu können, doch ist die Belastung für den Körper dabei sehr hoch und eine Behandlung von chronischen oder irreversiblen Schäden ist so nicht zu erreichen. Um dieses Problem zu umgehen, werden stetig neue Wirkstoffe entwickelt, um bei auftretenden Nebenwirkungen zu anderen Medikamenten wechseln zu können oder durch geschicktes Kombinieren von Wirkstoffen die Schäden so gering wie möglich zu halten.

Einer der Gründe für diese hohe Inzidenz an kardiotoxischen Nebenwirkungen von Chemotherapeutika ist ihre schlechte Vorhersehbarkeit in präklinischen Studien [16]. Frühere Versuche geeignete Testverfahren zu entwerfen, scheiterten an der Unzuverlässigkeit der entwickelten Methoden. Die vorhandenen Methoden suchten meist nach spezifischen wirkstoffbedingten Ursachen, die dafür bekannt sind, an der Entstehung von Nebenwirkungen beteiligt zu sein, schauten sich die tatsächlichen zellulären Auswirkungen aber nicht an. Viele falsch positive Ergebnisse waren die Folge [5,6,164]. Verschiedene Initiativen wie die CiPA-Initiative und die ICH Richtlinie S7B wurden ins Leben gerufen, um eine verlässliche und vereinheitlichte Methode zu entwerfen, mit der die Kardiotoxizität der Wirkstoffe früh identifiziert werden kann. Allerdings lieferten die oft aufwändigen und zu spezifischen Verfahren nicht die gewünschten Ergebnisse und konnten sich in der Wirkstoffentwicklung nicht durchsetzen [165,166].

Das Ziel dieser Arbeit ist es, ein Verfahren zu charakterisieren, das zeit- und ressourcenschonend neue Wirkstoffe auf ihre Kardiotoxizität hin untersuchen kann und eine verlässliche Auskunft über die Art der zu erwartenden Nebenwirkungen gibt. Zu diesem Zweck haben wir ein Assay entworfen, das über zelluläre Impedanzmessung Auskunft über den Einfluss von Wirkstoffen auf die Gesundheit und die Funktion von kultivierten neonatalen Mauskardiomyozyten gibt. Das zelluläre Impedanzmessgerät, das wir hierfür verwenden, ist das CardioExcyte96 von Nanion, das über Goldelektroden in einer 96-Well Platte die Gesundheit und Schlagfunktion der adhärennten Zellen in Echtzeit über einen Messzeitraum von mehreren Tagen aufzeichnen kann [175,176,179,180]. Dieses ungerichtete Verfahren gibt Auskunft über verschiedene Zellparameter wie Zellüberleben, kontraktile Funktion und Arrhythmien in kultivierten Zellen und kann so die schädliche Wirkung von Wirkstoffen auf die Kardiomyozyten darstellen, ohne auf bestimmte Signalwege oder Mechanismen beschränkt zu sein. Die Zellen werden von den niedrigen elektrischen Strömen der Messung nicht beeinflusst, was eine Langzeitmessung ermöglicht, die nur durch die Überlebensrate der Zellen selbst begrenzt wird und so die üblichen Methoden, die häufig nur Messungen über wenige Stunden zulassen, weit überbietet [172–174].

Um den hier vorgestellten Assay auf seine Vorhersagegenauigkeit zu testen, verwendeten wir zunächst in der Klinik befindliche Referenzsubstanzen, deren kardiotoxische Wirkungen *in vitro* und im Menschen bereits charakterisiert sind. Der Vergleich der klinischen Daten mit den Impedanzmessungen ermöglicht eine Evaluierung der Vorhersagegenauigkeit des Assays und dessen Sensitivität auf verschiedene Konzentrationen.

Anschließend an die Evaluierung des Assays verwendeten wir dieses, um verschiedene neue Substanzen zu charakterisieren, die sich zurzeit in verschiedenen Stadien der präklinischen und klinischen Studien befinden.

## **5.2 Evaluierung des Impedanzassays zur Vorhersage kardiotoxischer Effekte von Chemotherapeutika**

Um zu überprüfen, ob mit dem hier entwickelten Assay kardiotoxische Nebenwirkungen von Chemotherapeutika im Patienten vorhergesagt werden können, haben wir eine Reihe verschiedener Referenzsubstanzen vermessen, die bereits klinisch verwendet werden und deren Nebenwirkungen bereits charakterisiert sind (Tabelle 2). Die von uns verwendeten Wirkstoffe umfassten das Anthrazyklin Doxorubicin, das für seine irreversible myokardschädigende



Wirkung bekannt ist, Arrhythmien auslösen und die Kontraktion des Herzens beeinträchtigen kann [21,25,27]; den Multikinase-Inhibitor Sorafenib, der durch eine erhöhte ROS Produktion ebenfalls ein Absterben der Zellen bewirkt und durch die Beeinflussung intrazellulärer Calciumlevel die gleichmäßige Schlagfunktion der Zellen beeinträchtigen kann [16,28–30,32,33,35,204]; die beiden MEK-Inhibitoren Trametinib und Selumetinib, die vermehrt akute funktionelle Nebenwirkungen hervorrufen [121,122,126,128,129,132]. Trametinib führt häufig zu einer linksventrikulären Dysfunktion und Bradykardie. Selumetinib hingegen verursacht verringerte linksventrikuläre Funktion und Tachykardie. Diese Wirkstoffe wurden in jeweils zwei Konzentrationen eingesetzt, wovon eine unterhalb der im Menschen beobachteten maximalen Serumkonzentration ( $c_{\max}$ ) lag und einer darüber, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Assays mit den Patientendaten überprüfen zu können und die Sensitivität des Assays zu testen. Eine Ausnahme bildet hier Trametinib, dessen niedrige Konzentration ebenfalls leicht oberhalb des  $c_{\max}$  liegt, da Versuche in dieser Konzentration schon keine Effekte mehr auf die Zellen zeigten und deshalb keine weiteren Versuche in noch niedriger Konzentration durchgeführt wurden.

Als Negativkontrollen dienten die gegen Bluthochdruck eingesetzten Wirkstoffe Ramipril (ACE-Hemmer) und Valsartan ( $AT_1$ -Inhibitor), von denen wir aufgrund ihrer Wirkungsweise weder strukturelle noch funktionelle Kardiotoxizität in den NMCM erwarten [191,192,218–220]. Die Negativkontrollen wurden in einer Konzentration eingesetzt die oberhalb ihres in Menschen beobachteten  $c_{\max}$  lag, um auch bei eventuell niedriger Sensitivität des Assays zu bestätigen, dass keine falsch positiven Ergebnisse auftreten.

### **5.2.1 Evaluierung der Vorhersagegenauigkeit der klinischen Nebenwirkungen der Referenzsubstanzen durch das Impedanzassay**

Nach der Etablierung und Evaluierung des Impedanzassays mithilfe der Referenzsubstanzen, lässt sich von einer guten Vorhersagegenauigkeit sprechen. Die Base-Impedanzmessung mit dem CardioExcyte96, die primär von der Zelldichte auf der Goldelektrode abhängt, zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit den klinischen Daten hinsichtlich der myokardschädigenden Wirkung verschiedener Substanzen. Die in der Klinik beobachteten zytotoxischen Nebenwirkungen der Substanzen konnten durch das Assay qualitativ wiedergegeben werden. Die stark zytotoxischen Substanzen Doxorubicin und Sorafenib verursachten einen Rückgang der Base-Impedanz, was auf eine starke

Zellschädigung hindeutet, während die nur leicht toxischen Substanzen Selumetinib und Trametinib auch bei hohen Konzentrationen nur eine geringe zellschädigende Wirkung hatten. Eine gute Vorhersagegenauigkeit für zukünftige Wirkstoffe und deren zellschädigende Wirkung scheint durch dieses Assay möglich.

Die Übertragung der funktionellen Nebenwirkungen der Substanzen vom Patienten in die kultivierten Zellen war weniger eindeutig. Die klinischen Nebenwirkungen der Substanzen wurden nicht direkt durch den Impedanzassay widerspiegelt und zeigten sich häufig erst bei höheren Konzentrationen. So konnte die in der Klinik beobachtete von Trametinib verursachte Bradykardie erst bei hohen Konzentrationen als signifikante Verringerung der Schlagfrequenz gemessen werden. Trotz der geringeren Genauigkeit und der eingeschränkten Sensibilität ermöglichte das Impedanzassay eine Beurteilung der Einflüsse der Substanzen auf die Kontraktilität der Zellen, die bisher durch andere *in vitro* Assays nicht möglich war.

Die Identifizierung von pro-arrhythmischen Effekten von Wirkstoffen ist vermutlich einer der wichtigsten Aspekte in der Wirkstoffherstellung. Die Aufzeichnung des Schlagrhythmus durch die Impedanzmessung ermöglicht eine gute Voraussage der pro-arrhythmischen Wirkung von Substanzen. Zur schnelleren und intuitiveren Auswertung des Schlagrhythmus bedarf die Quantifizierung der einzelnen Messdaten jedoch noch einer Optimierung. Während stark pro-arrhythmische Substanzen wie Doxorubicin klar erkennbar sind [202], ist bei leicht pro-arrhythmischen Einflüssen nicht unbedingt eindeutig, ob es sich um einen Effekt des Wirkstoffes oder um spontan auftretende Arrhythmien aufgrund der empfindlichen Zellen handelt. So verursachten Trametinib und Selumetinib in einzelnen Messungen leichte Rhythmusstörungen, blieben in klinischen Studien aber bisher in diesem Bereich unauffällig [127,210]. Zusätzlich gibt die Impedanzmessung keine Aussage über die mechanistischen Ursachen der Arrhythmien. Bei auftretenden arrhythmischen Nebenwirkung in der Impedanzmessung würde sich daher eine Erweiterung der Substanzcharakterisierung um weitere Assays zur Bestimmung der mechanistischen Wirkung anbieten.

Obwohl die Impedanzmessung nicht alle klinischen Nebenwirkungen konzentrationsgenau abbilden konnte, ergab sich doch eine Charakterisierung der Wirkstoffe, die die wichtigsten Effekte der Substanzen auf das Herz darstellte. Die Zellschädigung durch die Substanzen gab die klinischen Nebenwirkungen recht präzise wieder. Während die Darstellung der Kontraktion nicht so sensitiv war, wie wir gehofft hatten, zeigte sie doch vielversprechende Ergebnisse, die bisherige Methoden, und den Mangel derer, weit übertraf. Auch die Identifizierung von pro-arrhythmischen Effekte erfüllte die Erwartungen an die Genauigkeit des Assays.

## 5.2.2 Vergleich weiterer Assays mit den Impedanz- und klinischen Daten.

Ein Vergleich des hier beschriebenen Impedanzassays mit herkömmlichen Assays zur Bestimmung des Zellüberlebens zeigte, dass durchaus Unterschiede in den Ergebnissen auffallen. Die hier zum Vergleich herangezogenen Assays sind der Konfluenz-Assay zur Bestimmung der Zelldichte, der MTT-Assay, der über das Redoxpotential der Zellen deren Gesundheit quantifiziert und der ATP-Assay, das die ATP-Menge in Abhängigkeit von der Zellzahl und des Metabolismus quantifiziert. Um den möglichen Einfluss der Substanzen auf den Metabolismus der Zellen zusätzlich zu untersuchen, wurde die Laktat-Produktion der Zellen analysiert. Die Vergleichsmessungen in diesen Assays wurden mit H9c2 Zellen durchgeführt, da keine kontrahierenden Zellen benötigt werden und so die Verwendung von tierischen Primärzellen stark reduziert werden konnte. H9c2 Zellen sind unsterbliche Kardiomyoblasten, die ursprünglich aus embryonischen Rattenventrikeln isoliert wurden und obwohl sie nicht schlagen, zeigen sie viele Gemeinsamkeiten mit Primärzellen [205]. H9c2 Zellen besitzen im Vergleich zu anderen ähnlichen Ziellinien hohe ATP-Level, Mitochondrienmasse und mitochondriale Respiration [206], was sie zu einer guten Wahl für die hier vorgestellten Assays machen, allerdings auch zu unterschiedlichen Ergebnissen im Vergleich zu den NMCM führen kann. Studien zur Vergleichbarkeit der metabolischen Reaktion von H9c2 Zellen und NMCM wurden bisher nicht hinreichend durchgeführt.

Das Konfluenz-Assay konnte im Vergleich zur Base-Impedanz, dem MTT-Assay und dem ATP-Assay die zytotoxische Wirkung der Substanzen nur sehr eingeschränkt wiedergeben (Abb. 12 A). Doxorubizin und Sorafenib wurden als zytotoxisch identifiziert, allerdings zeigte Doxorubicin keine Dosisabhängigkeit und Sorafenib war hier erst in hoher Konzentration toxisch. Die zellschädigende Wirkung von Trametinib und Selumetinib konnte das Konfluenz-Assay nicht darstellen. Da in diesem Assay mit H9c2 Zellen gearbeitet wurde, welche sich in Kultur weiter teilen können, ist die Darstellung geringer zytotoxischer Effekte anhand der Detektion der Zelldichte vermutlich nicht möglich. Es ist ebenfalls möglich, dass die H9c2 Zellen mit einer anderen Sensibilität auf die Wirkstoffe reagieren als die NMCM.

Der MTT-Assay detektierte insgesamt eine stärkere Zytotoxizität der Wirkstoffe als die Base-Impedanz, was allerdings an der längeren Inkubationszeit mit den Wirkstoffen und den Unterschieden zwischen H9c2 Zellen und NMCM liegen kann (Abb. 12 B). Da der MTT-Assay neben der Zellzahl auch dem Redoxpotential der Zellen unterliegt, was durch verschiedene Parameter beeinflusst werden kann, sind die Ergebnisse nicht ausschließlich ein Maß des Zellüberlebens und sollten daher anders gewichtet werden als die Base-Impedanzmessung.

Veränderungen in den metabolischen Prozessen der Zellen durch die Wirkstoffe können hier einen starken Einfluss haben und falsche Daten zur Zytotoxizität liefern [188,221].

Der ATP-Assay zeigte ähnliche Ergebnisse wie der MTT-Assay (Abb. 12 C). Ebenso wie der MTT-Assay stellt es die konzentrationsabhängigen Einflüsse von Doxorubicin und Sorafenib dar, zeigt aber auch für Trametinib und Selumetinib stärkere Einflüsse. Die beobachtete Abnahme der ATP-Produktion ist einerseits abhängig von der Zellzahl, andererseits kann sie aber auch metabolische Veränderungen widerspiegeln. So wurde durch Doxorubicin eine erhöhte ROS Produktion und eine subsequente Schädigung der Mitochondrien beobachtet, was die Produktion von ATP in den noch lebenden Zellen stark reduzierte [207]. Dementgegen kann die vergleichsweise geringe Abnahme der ATP-Produktion bei geringer Konzentration von Sorafenib so erklärt werden, dass durch einen Anstieg der metabolischen Funktion die geringere Zellzahl wieder ausgeglichen wird. Der starke Anstieg der Laktatproduktion bei gleicher Konzentration würde diese Vermutung unterstützen.

Die Untersuchung der Laktat-Produktion sollte Aufschluss geben über die metabolische Veränderung der Zellen und helfen, die Unterschiede zwischen den Assays besser einzuordnen (Abb. 12 D). Es ist zu erkennen, dass die Laktat-Produktion in den Zellen unabhängig von der im MTT- und ATP-Assay beobachteten reduzierten Zellzahl nahe der Kontrolle blieb, was entweder für eine unzureichende Genauigkeit des Assays sprechen würde oder für eine verstärkte Laktat-Produktion der noch lebenden Zellen. Es wäre nicht ungewöhnlich, wenn die Zellen aufgrund der reduzierten Mitochondrienfunktion ihre Energiebereitstellung stärker auf die Seite der Glykolyse, und damit zur erhöhten Laktat-Produktion, verschieben würden. An dieser Stelle sind die Ergebnisse diesbezüglich aber nicht ausreichend klar interpretierbar.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass das Konfluenz-Assay zu unsensibel ist, um einen tatsächlichen Nutzen für die Charakterisierung zu haben. Der MTT-Assay und ATP-Assay scheinen die zellschädigende Wirkung der Substanzen ähnlich der Base-Impedanz zu bestimmen, sind jedoch abhängig von weiteren Faktoren, die die Interpretation der Ergebnisse erschweren, was der MTT-Assay und der ATP-Assay zu unzureichenderen Assays zur Evaluierung des Zellüberlebens macht, als die Base-Impedanz. Die Ergebnisse des Laktat-Assays lassen nicht klar erkennen, ob eine Regulation der Laktat-Produktion vorliegt oder ob das Assay nicht ausreichend genau funktioniert. Mithilfe einer Referenzsubstanz, die z.B. Atmungskette inhibiert, könnten die gemessenen Ergebnisse in einen besseren Zusammenhang gesetzt werden, um mehr über die metabolischen Veränderungen durch Substanzzugabe zu

erfahren.

Diese *in vitro* Assays bestätigten, dass sich die Base-Impedanzmessung besser zur Bestimmung des Zellüberlebens eignet als gängige *in vitro* Assays, die abhängig sind von metabolischen Funktionen der Zellen.

### 5.2.3 Grenzen und Probleme des Impedanzassays

Obwohl das Impedanzassay eine Reihe an relevanten Daten erzeugt, die Aufschluss über die Effekte der Substanzen auf die Kardiomyozyten geben, ist eine Einordnung und Interpretation an dieser Stelle nicht immer einfach. Ob die beobachteten Effekte auch klinische Relevanz haben werden, zeigt sich erst im Zusammenhang mit der im Menschen wirksamen Dosis und der maximalen Serumkonzentration, welche in klinischen Phase 1 Studien ermittelt werden. Das Wissen um mögliche kardiale Nebenwirkungen kann in diesen ersten klinischen Studien helfen, die kritischen Aspekte der Herzfunktion speziell zu beobachten und entsprechend zu bewerten, um die Sicherheit der Patienten während der Studie zu gewährleisten.

Ein wichtiger Aspekt dieses Assays ist die Verwendbarkeit mit kultivierten Zellen. Dies ermöglicht zum einen eine schnelle und einfache Charakterisierung schon früh in der Entwicklung neuer Substanzen, wirft aber auch Probleme und Ungenauigkeiten auf. Die hier verwendeten isolierten Mauskardiomyozyten sind zwar ein hinreichend gutes Modell für erste Testversuche, spiegeln aber viele Aspekte des Organismus nicht wider. Verschiedene Zellstrukturen, vaskuläre Einflüsse und komplexe interzelluläre Regulation können einen Einfluss auf die Schlagfunktion des Herzens haben, werden aber *in vitro* nicht simuliert und können daher nicht ausreichend dargestellt werden. Auch die Kardiomyozyten selbst verhalten sich in Kultur mitunter nicht wie ihr physiologisches Äquivalent und bestimmte Artefakte treten aufgrund dieser Unterschiede auf. Die reziproke Kopplung von Schlagfrequenz und Amplitude zum Beispiel entsteht als Artefakt der Impedanzmessung mit adhärennten Zellen. Durch eine Verstärkung der Kontraktion, zum Beispiel nach Stimulation, vergrößert sich der intermediäre Platz zwischen den Zellen. Das Kulturmedium, das neben den Zellen Einfluss auf die gemessene Impedanz nimmt, hat so einen größeren Einfluss auf die Messung. Da das Medium einen geringeren Widerstand bietet als die Zellen, nimmt die gemessene Impedanz mit erhöhtem Einfluss des Mediums ab. Dies führt zu einer fälschlichen Abnahme der Impedanz, sprich der Amplitude, bei einer erhöhten Schlagfrequenz und –kraft der Zellen [175,215,222].

Neuere Messmodelle wie das FLEXcyte96 von Nanion ermöglichen es, aufgrund einer

flexiblen Oberfläche, diesen Effekt zu umgehen. Durch die membranartige Oberfläche, an der die Zellen adhären, können die Zellen kontrahieren, ohne dass sich der intermediäre Platz zwischen ihnen erhöht und stattdessen die Membran mit kontrahiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine physiologische Reaktion der Zellen auf Stimuli wie Isoproterenol artefaktfrei nachweisbar ist [222,223].

Weitere methodische Artefakte können entstehen, wenn Substanzen die Adhärenz der Zellen beeinflussen. Da die Impedanzmessung nur solche Zellen messen kann, die auf der Elektrode adhären, kann ein Abdissoziieren der Zellen zu einem falschen Messergebnis führen. Dementgegen kann ein hypertrophes Zellwachstum die gemessene Zellzahl fälschlich höher erscheinen lassen, da die belegte Fläche auf der Elektrode trotz gleicher Zellzahl steigt. Um solche Artefakte auszuschließen, würde sich eine mikroskopische Untersuchung der Zellen eignen, um sowohl die Adhärenz als auch die Zellgröße zu kontrollieren.

Eine der wichtigsten methodischen Grenzen dieses Assays ist der Mangel an Information über den mechanistischen Hintergrund der beobachteten Effekte. Obwohl bestimmte Reaktionen der Zellen einen Hinweis über die Wirkungsweise der Substanzen in Kardiomyozyten geben können, sind diese bei weitem nicht ausreichend. Um hinreichend genaue Informationen zur Wirkungsweise zu erhalten, wäre die Anwendung weiterer Assays notwendig, die allerdings aufgrund der Daten aus der Impedanzmessung genau auf die jeweilige Substanz angepasst werden könnten. So könnte bei beobachteten Veränderungen in der Kontraktion eine Untersuchung des zellulären Calciums oder bei beobachteten Arrhythmien eine Untersuchung bestimmter Ionenkanäle, deren Dysregulation für pro-arrhythmische Wirkung bekannt sind, Aufschluss über mögliche Mechanismen der Wirkstoffe geben [35,165].

#### **5.2.4 Mögliche Erweiterungen und Verbesserungen des Impedanzassays**

Um das Impedanzassay weiter zu optimieren und die beobachteten Mängel möglichst zu minimieren, ist die Veränderung und Erweiterung des Assays möglich. Die Charakterisierung weiterer Referenzsubstanzen zur Erstellung einer Datenbank könnte hier zusätzlich zur Evaluierung neuer Substanzen beitragen, da ein Vergleich gewonnener Daten neuer Substanzen mit den bereits klinisch bekannten Substanzen eine Einordnung der beobachteten Effekte vereinfachen würde. Die Erstellung einer Referenzbibliothek könnte für die Zukunft eine große Hilfe in der Evaluierung neuer Substanzen sein, erfordert aber ein standardisiertes Messverfahren, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Eine Anwendung des Assays auf aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten (hiPS-CM) würde die Vorhersagegenauigkeit vermutlich zusätzlich verbessern. Die Verwendung menschlicher Zellen nähert das Assay den realen Bedingungen im menschlichen Organismus weiter an. Da hiPS-CM Zellen zudem langlebiger sind als NMCM, können Messungen über mehrere Tage bis hin zu Woche laufen, um den Langzeiteffekt und die Zytotoxizität der Wirkstoffe noch genauer darzustellen [172,215]. Ebenso ist es möglich, diese Zellen durch elektrische Impulse zu *pacen*, um eine Abhängigkeit der Schlagkraft von der Schlagfrequenz zu vermeiden und so die Einschränkungen des Assays weiter zu reduzieren.

Eine Beobachtung der Elektrophysiologie der hiPS-CM mithilfe des CardioExcyte96 ist ebenfalls möglich und ermöglicht die Aufzeichnung weiterer Parameter ohne den Aufwand der Messung unnötig zu steigern. Durch die Messung des elektrischen Feldpotenzials (EFP) ist es möglich, ähnlich einem Multielektrodenarray (MEA), die Elektrophysiologie der kontrahierenden Zellen aufzuzeichnen [175]. Die Identifizierung von elektrophysiologischen Veränderungen, wie zum Beispiel einer Verzögerung der Repolarisation, kann nicht nur zusätzliche Daten zur Kardiotoxizität liefern, sondern auch in der Ursachenfindung von unerwünschten Effekten helfen.

Der einfache Aufbau des Assays ermöglicht es, die Messung auch direkt um weitere Faktoren zu erweitern. In unseren Untersuchungen haben wir die Zellen künstlich unter Stress gesetzt indem wir das Stimulanz Isoproterenol dazugaben. Die Wirkung der Inhibitoren wurde teilweise durch den simulierten Stress beeinflusst. Weitere Aspekte und Risikofaktoren können zum Beispiel durch die Verwendung mutierter pluripotenter Stammzellen, um Patientenmutationen zu simulieren, untersucht werden [224].

Mechanistische Informationen zur Wirkung der Substanzen, die durch das Impedanzassay nicht abgedeckt sind, können durch die gezielte Wahl weiterer Assays gewonnen werden. Die aus der Impedanzmessung gewonnenen Daten können hierbei als Referenz für die Wahl der geeignetsten Assays verwendet werden.

### **5.2.5 Zusammenfassung der Evaluierung**

Die Entwicklung dieses neuen Impedanzassays zur Bestimmung von kardiotoxischen Nebenwirkungen legt einen wichtigen Grundstein für die zukünftige Charakterisierung von neuen Wirkstoffen. Obwohl noch einige Aspekte der Messung nicht optimal die Wirkung im

Menschen widerspiegeln, bietet es doch eine Reihe an wichtigen Einblicken in die Kardiotoxizität der Substanzen und ermöglicht die Charakterisierung von neuen Wirkstoffen, die zuvor nicht möglich war.

Wie alle *in vitro* Assays, deckt das Impedanzassay nicht alle Bereiche des menschlichen Herzens ab. Die Einordnung der Ergebnisse in einen relevanten klinischen Hintergrund, die Abgrenzung von Artefakten aufgrund des vereinfachten Systems sowie der Mangel an Informationen zur Wirkungsweise der Substanzen sind wichtige Aspekte dieses *in vitro* Assays, die nicht unbeachtet bleiben dürfen. Die zusätzliche Untersuchung der Substanzen mit geeigneten Assays, die diese Aspekte besser abdecken sind aufgrund der Ergebnisse aus dem Impedanz-Assay gut wählbar und werden weitere wichtige Informationen liefern.

Die Weiterentwicklung des Impedanzassays zur besseren Verwendbarkeit, höheren Vorhersagegenauigkeit sowie zur Darstellung weiterer kardialer Parameter sollte für die Zukunft in Angriff genommen werden. Das Impedanzassay ermöglicht eine Reihe an methodischen Anpassungen und Erweiterungen, um den Ansprüchen einer kardiotoxischen Charakterisierung noch besser zu entsprechen.

Nichtsdestotrotz zeigte der bisherige Aufbau des Assays vielversprechende Ergebnisse, die eine große Reihe an Parametern detektierte und ein verlässliches Bild der Kardiotoxizität der Substanzen lieferte. Um dieses Assay nun an neuen Substanzen anzuwenden, wählten wir eine Reihe an AKT- und ERK-Inhibitoren, die sich in der Entwicklung zum Einsatz in der Tumorthapie befinden, und charakterisierten ihre strukturellen und funktionellen kardiotoxischen Effekte auf die kultivierten NMCM.



### 5.3 Charakterisierung neuer AKT-Inhibitoren

Um das hier etablierte Impedanzassay auf verschiedene Wirkstoffe anzuwenden und diese zu charakterisieren, haben wir verschiedene in der Entwicklung befindliche Inhibitoren der Kinasen AKT und ERK gewählt, die bisher nicht spezifisch auf ihre Kardiotoxizität untersucht wurden. Da die Signalwege, die AKT und ERK beinhalten, wichtige regulatorische Wirkungen auch im Herzen vermitteln, ist eine kardiotoxische Wirkung durch die Inhibierung dieser Kinase sehr wahrscheinlich [20,58,225].

Zunächst erfolgte die Charakterisierung der AKT-Inhibitoren Borussertib, Capivasertib, Ipatasertib, MK-2206 und Miransertib. Die PI3K/AKT/mTORC1 Kaskade ist ein wichtiger Signalweg, der in vielen Tumorerkrankungen mutiert oder anderweitig hochreguliert ist und so das Zellwachstum antreibt, Apoptose unterdrückt und zu Medikamentenresistenzen führt. Er bietet daher ein vielversprechendes Angriffsziel für zukünftige Mono- und Kombinationstherapien. Eine Inhibierung dieses Signalwegs verspricht daher einerseits vielversprechende Effekte in der Behandlung von Tumoren, kann andererseits aber aufgrund der Vielseitigkeit dieses Signalwegs auch gesundes Gewebe schwer in Mitleidenschaft ziehen. Derart komplexe und vielfältige Signalkaskade anzugreifen, kann schnell zu unerwünschten *on-* und *off-Target* Effekten führen und auch im kardiovaskulärem System zu schweren Nebenwirkungen führen. Insbesondere ATP-kompetitive Inhibitoren wie Capivasertib und Ipatasertib sind bekannt für ihre schlechte Selektivität und häufig auftretende *off-target* Effekte in strukturähnlichen Kinasen wie Mitgliedern der AGC Familie. Zusätzlich kann die Inhibierung des AKT-Signalweges, der wichtige Signale in Zellüberleben, Zellwachstum, Proliferation und Zellmetabolismus vermittelt, zu schwerer Zellschädigung unter anderem im Herzen führen [41,44].

Ziel dieses Teils der Arbeit war daher mit dem zuvor etablierten und evaluierten Impedanzassay einige dieser AKT-Inhibitoren auf ihre Kardiotoxizität in Hinblick auf Zellschädigung, kontraktile Funktion und Arrhythmien zu untersuchen. Um weitere Informationen über die kardialen Effekte der Wirkstoffe zu erhalten, wurden zusätzlich Hypertrophie-Assays und Metabolismus-Assays durchgeführt sowie Impedanzmessungen unter Zugabe des stressinduzierenden Wirkstoffes Isoproterenol durchgeführt.

Unter den hier untersuchten AKT-Inhibitoren konnten keine allgemein auftretenden Nebenwirkungen von AKT-Inhibition beobachtet werden. Während einige Inhibitoren starke kardiale Nebenwirkungen hervorriefen, waren andere sehr gut verträglich.

Die allosterischen AKT-Inhibitoren besitzen zwar eine verhältnismäßig bessere Selektivität

für AKT als ATP-kompetitive Inhibitoren [18,226], verursachten jedoch eine starke Zellschädigung, die mit steigender Konzentration zunahm. Diese stärkere Zytotoxizität der allosterischen Inhibitoren im Gegensatz zu den ATP-kompetitiven Inhibitoren konnte auch in verschiedenen Krebszelllinien beobachtet werden, in denen sich die Einflüsse als *on-Target* Effekte herausstellten [226]. Ob es sich auch in Kardiomyozyten um *on-Target* Effekte handelt, kann jedoch an dieser Stelle nicht hinreichend belegt werden.

Die beobachteten Einflüsse auf die kontraktile Funktion waren jedoch zwischen den allosterischen Inhibitoren nicht einheitlich. Die schweren Nebenwirkungen von MK-2206, die bei hohen Konzentrationen (über 6  $\mu\text{M}$ ) beobachtet wurden, werden eventuell durch den niedrigen  $c_{\text{max}}$  (0,6  $\mu\text{M}$ ) in Patienten relativiert [92]. Solange eine Verwendung von MK-2206 in derart niedrigen Konzentrationen möglich ist, könnte eine sichere Verwendung möglich sein. Besonderes Augenmerk auf die kardiale Funktion von Patienten, insbesondere bei Risikopatienten, zu legen, ist jedoch empfohlen. Miransertib verursachte zusätzlich mittlere bis schwere Arrhythmien, die unter Stress signifikant zunahm und sollte daher nur mit besonderer Vorsicht in Patienten angewendet werden.

Zwischen den einzelnen ATP-kompetitiven AKT-Inhibitoren konnte ebenfalls nur wenig Zusammenhang beobachtet werden. Insgesamt schienen sie weniger Zellschädigung zu verursachen als die allosterischen Inhibitoren, was sich mit anderen Studien zu AKT-Inhibitoren deckt [226]. Während Ipatasertib darüber hinaus gar keine Nebenwirkungen erzeugte, war bei Capivasertib ab einem Schwellenwert in der Konzentration ein gleichbleibender Einfluss auf die Zellen zu beobachten. Die schlechte Selektivität von Capivasertib im Vergleich zu Ipatasertib ist eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Einflüsse auf die Zellen. Die in Patienten beobachtete Serumkonzentration von Capivasertib war mit 3,33  $\mu\text{M}$  auch vergleichsweise hoch und lässt nicht vermuten, dass eine selektive Hemmung von AKT im Menschen erreicht werden kann. Somit ist Ipatasertib ein sehr viel aussichtsreicherer ATP-kompetitiver Inhibitor als Capivasertib und anhand seines kardiotoxischen Profils der verträglichste der hier untersuchten AKT-Inhibitoren.

Der kovalent-allosterische Inhibitor Borussertib hingegen verursachte in allen Bereichen dosisabhängige Effekte, die unterschiedlich schwer ausfielen. Im Vergleich zu den anderen allosterischen Inhibitoren, verursachte Borussertib weniger Zellschädigung, wurde jedoch auch in einer geringeren maximalen Konzentration eingesetzt. Den größten Einfluss hatte es auf die Schlagfrequenz und den Schlagrhythmus der Zellen. Da Borussertib in vielen Krebszelllinien bessere Antitumorwirkung bewies als die anderen hier verwendeten AKT-Inhibitoren [73],

könnte die mögliche verwendete Dosis dieses Inhibitors sehr gering ausfallen und ein Einsatz des Wirkstoffes in geringen Konzentrationen könnte anhand der hier erhobenen Daten ungefährlich sein.

### 5.3.1 Borussertib

Borussertib ist ein AKT-Inhibitor, der bisher nur in präklinischen Studien untersucht wurde. Als kovalent allosterischer Inhibitor bildet er mit AKT1-3 einen irreversiblen Komplex und verhindert so eine Konformationsänderung zur aktiven Form. Borussertib zeigte in zellfreien Inhibierungs-Assays eine spezifische Inhibierung von AKT1 im Vergleich zu den anderen Isoformen und in *in vitro* Versuchen in verschiedenen Krebszelllinien stark anti-proliferatorische Wirkung bei verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen [72,73,227].

In unseren Untersuchungen wurde Borussertib (hergestellt und zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Rauh, TU Dortmund) aufgrund seiner niedrigen effektiven Konzentrationen ebenfalls in niedrigen Konzentrationen eingesetzt [73]. Da allerdings auch die effektive Konzentration in den Kardiomyozyten (36,4 nM) nur leicht höher lag als die in Krebszellen, wäre ein Einfluss auf die kardialen Zellen auch bei niedrigen Konzentrationen nicht ungewöhnlich. Borussertib zeigte nur in der höchsten gemessenen Konzentration (10.000 x *in vitro* IC<sub>50</sub>: 8 µM) eine zellschädigende Wirkung auf die Kardiomyozyten, die allerdings selbst in dieser Konzentration bei unter 10 % lag (Abb. 17). Anhand der in den Kontrollsubstanzen beobachteten Effekten und deren klinischen Daten, kann bei Borussertib davon ausgegangen werden, dass eine kardiale Zellschädigung in physiologischen Konzentrationen vermutlich nicht auftreten wird. Da allerdings noch keine *in vivo* Studien zu Borussertib durchgeführt wurden, ist die effektive Konzentration im Menschen noch unbekannt.

Die durch Borussertib aufgetretenen funktionellen Veränderungen in Amplitude und Schlagrate wurden ebenfalls nur in den höchsten Konzentrationen (10.000 x *in vitro* IC<sub>50</sub>: 8 µM) beobachtet (Abb. 18). Allerdings zeigten sich zuvor in der Evaluierung des Assays, dass funktionelle Schädigungen weniger sensitiv detektiert werden und auch klinische Nebenwirkungen teilweise erst in sehr hohen *in vitro* Konzentrationen repliziert werden konnten. Ein Einfluss von Borussertib auf die kontraktile Funktion von kardialen Zellen sollte daher auch bei niedrigeren *in vivo* Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden. Die Messung weiterer Konzentrationen von Borussertib zeigte eine klare Zunahme der Effekte bei steigender

Konzentration. Während die Schlagfrequenz schon bei mittleren Konzentrationen signifikante Veränderungen zeigte, nahm die Amplitude erst bei hohen Konzentrationen signifikant ab. Dies bestärkt die Vermutung, dass Borussertibs Einfluss auf die Schlagfrequenz der Zellen eine relevante Nebenwirkung darstellt.

Den prominentesten Effekt zeigte Borussertib auf den Schlagrhythmus der kultivierten Kardiomyozyten. Schon bei mittlerer Konzentration (100x EC<sub>50</sub>: 0,5 µM) zeigten sich klar pro-arrhythmische Effekte, die sich bei höheren Konzentrationen (10.000 x *in vitro* IC<sub>50</sub>: 8 µM) noch verstärkten. Das in Borussertib gemessene pro-arrhythmische Potential glich den Werten, die zuvor in der klinisch auffälligen Substanz Doxorubicin beobachtet wurde (Abb. 19 B) und weist darauf hin, dass Borussertib vermutlich in Patienten ebenfalls arrhythmogene Nebenwirkungen erzeugen wird. Ähnlich den anderen Parametern, scheint die arrhythmogene Wirkung dosisabhängig zu sein. Schon bei geringer Konzentration zeigt sich ein leicht erhöhtes Auftreten von Arrhythmien, das prinzipiell mit steigender Konzentration zunimmt (Abb. 19 D).

Nach Stimulation der Zellen mit Isoproterenol zeigte Borussertib einen leicht verringerten Einfluss auf die Zellen. Durch die Stimulation erhöhte sich die Schwankung der Messwerte zwischen den einzelnen Messungen, wodurch die tendenziell gleichen Einflüsse von Borussertib im Vergleich zur stimulierten Kontrolle bei hohen Konzentrationen (10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub>: 8 µM) nicht mehr signifikant waren (Abb. 21 & 22). Bemerkenswerterweise sorgte die Stimulation der Zellen mit Isoproterenol jedoch für eine vollständige Aufhebung der pro-arrhythmischen Wirkung von Borussertib. Nach Stimulation sind in keiner der Konzentrationen mehr Arrhythmien messbar (Abb. 23). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Mechanismen, mit denen Borussertib seine pro-arrhythmischen Effekte vermittelt eine antagonistische Interaktion mit der durch Isoproterenol vermittelten Reaktion hat [228]. Eine symptomatische Behandlung der durch Borussertib ausgelösten kardialen Nebenwirkungen mit einem β-AR Agonisten wie Isoproterenol ist eventuell eine mögliche Strategie, die Verträglichkeit von Borussertib zu verbessern. Eine klare Evaluierung der Einflüsse, die eine solche Kombinationstherapie auf den Organismus hätte, ist mithilfe dieses Impedanzassays jedoch nicht hinreichend möglich.

Da Borussertib noch in keinen klinischen Studien untersucht wurde, gibt es keine Daten zur effektiven Dosis oder der maximalen Serumkonzentration in Patienten. Um schwerwiegende Nebenwirkungen auszuschließen, sollten die *in vitro* beobachteten Nebenwirkungen im Patienten berücksichtigt werden und ein Studiendesign zu diesem Inhibitor eine genaue Charakterisierung der Kardiotoxizität, besonders in Hinblick auf Arrhythmien, beinhalten.

### 5.3.2 Ipatasertib (GDC-0068)

Ipatasertib ist ein ATP kompetitiver Inhibitor von AKT, der sich zurzeit in klinischen Phase 2 Studien befindet [80–82]. Ipatasertib ist im Vergleich zu den anderen Inhibitoren in seiner Inhibierung von AKT und seiner anti-proliferatorische Wirkung in Krebszellen vergleichsweise ineffizient [73]. Auch der in Kardiomyozyten gemessene  $IC_{50}$  Wert (178,8 nM) war nach Capivasertib der zweithöchste. Ipatasertib wurde daher in dem Impedanzassay mit verhältnismäßig hohen Konzentrationen eingesetzt und auf seine Kardiotoxizität geprüft.

Trotz der hohen eingesetzten Konzentration von Ipatasertib zeigte es von allen AKT-Inhibitoren die beste Verträglichkeit in den kultivierten NMCM. Lediglich in der höchsten verwendeten Konzentration (10.000x  $IC_{50}$ : 30  $\mu$ M) zeigte es eine leichte Zellschädigung um ca. 7 % (Abb. 17 B), was ungefähr den beobachteten Effekten von Trametinib in niedriger Konzentration gleichkommt. Da die beobachtete maximale Serumkonzentration im Menschen mit 1,83  $\mu$ M weit darunterliegt [60], sind hier, ebenso wie bei Trametinib, vermutlich keine weiteren Auswirkungen in *in vivo* Studien zu erwarten. Sowohl die kontraktile Funktion der Zellen sowie deren Schlagrhythmus blieben durch Ipatasertib gänzlich unbeeinflusst (Abb. 18 & 19). Auch die Stimulierung durch Isoproterenol (Abb. 21-23) verändert den Einfluss von Ipatasertib auf die Zellen im Vergleich zur stimulierten Kontrolle nicht.

In vorangegangenen klinischen Phase 1 Studien wurden bei einer Dosis von 400 mg täglich, wie es in späteren Phase 2 Studien eingesetzt wurde, ein  $c_{max}$  von 1,83  $\mu$ M beobachtet [60]. Dieser Wert liegt weit unterhalb der in unserem Assay als bedenkenlos beurteilten Konzentration von Ipatasertib. Mit diesen Daten übereinstimmend wurden in keiner klinischen Studie bislang kardiotoxische Nebenwirkungen von Ipatasertib beobachtet [60,80,82,146].

### 5.3.3 Capivasertib (AZD-5363)

Capivasertib ist ein ATP-kompetitiver AKT-Inhibitor, der aktuell in klinischen Phase 2 Studien zum Einsatz kommt. In den Phase 2 Studien wurden keine Kardiotoxizitäten beobachtet, jedoch wurde auch nicht speziell darauf untersucht und Langzeitstudien zur Verträglichkeit von Capivasertib stehen ebenfalls noch aus [38,77–79].

Capivasertib war der einzige Inhibitor, dessen verwendete 100x  $EC_{50}$  Konzentration höher lag als die 10.000x  $IC_{50}$  Konzentration (20  $\mu$ M vs. 9  $\mu$ M). Allerdings zeigte es mit Abstand die

höchste effektive Konzentration in Kardiomyozyten, wodurch ein Einfluss der hohen Konzentrationen eventuell relativiert wird (Tabelle 4). Es wies bereits bei mittlerer Konzentration (10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub>: 9 µM) eine geringe, aber signifikante Zellschädigung auf, die bei höherer Konzentration (100x EC<sub>50</sub>: 20 µM) nicht wesentlich verstärkt wurde (Abb. 17). In klinischen Phase 1 Studien wurde bei einer Dosis von 480 mg ein c<sub>max</sub> von 3,3 µM gemessen [76]. In darauffolgenden Kombinationsstudien wurde die Dosis auf 400 mg reduziert, allerdings kein c<sub>max</sub> mehr ermittelt [78]. Der Vergleich der Impedanzdaten mit den klinischen Daten lässt vermuten, dass sich die zellschädigende Wirkung von Capivasertib nicht auf den Menschen übertragen wird, da sie nur in Konzentrationen auftritt, die weit über dem c<sub>max</sub> von 3,3 µM liegen und zudem mit unter 10 % auch eher gering ausfällt.

Der Einfluss von Capivasertib auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten beschränkt sich auf eine leichte Verringerung der Schlagfrequenz bei mittlerer und hoher Konzentration (Abb. 18). Die Amplitude bleibt durchgehend unverändert. Dass die adversen Effekte nur bei höheren Konzentrationen auftreten, schließt hier einen möglichen Effekt im Menschen nicht aus, da das Assay in Bezug auf die kontraktile Funktion der Zellen weniger sensibler ist als beim Zellüberleben. Bei Capivasertib zeigt sich eine Verringerung der Schlagfrequenz bei beiden Konzentrationen um ca. 17 %, was gerade eine relevante Reduktion der Schlagfrequenz ausmachen würde. Ob Capivasertib im Menschen zu einer Verringerung der Schlagrate führt und ob sie pathologische Maße annimmt, ist hieraus nicht eindeutig, sollte aber in zukünftigen Studien beobachtet werden.

Durch die Stimulation mit Isoproterenol veränderten sich die beobachteten Unterschiede in Zellüberleben und kontraktile Funktion im Vergleich zur Kontrolle nicht (Abb. 21 & 22). Die höhere Streuung der Messergebnisse verhinderte eine Signifikanz der adversen Effekte, die Tendenzen blieben jedoch gleich. Lediglich der Schlagrhythmus, der in unstimulierten Zellen gänzlich unauffällig geblieben war, zeigte nach Stimulation ein pro-arrhythmisches Potential von Capivasertib bei mittlerer Konzentration, das in höherer Konzentration nicht mehr auftauchte. Obwohl in bisherigen klinischen Studien keine Arrhythmien beobachtet wurden [76–79], zeigte sich in einer Phase 2 Kombinationsstudie mit dem Östrogen-Rezeptor Antagonisten Fulvestrant von 2020 eine leichte Erhöhung von Fällen von Grad 1 QT-Prolongation in Patienten nach Capivasertibeinnahme im Vergleich zum Placebo [79]. Ob dies von Capivasertib oder durch die Kombination mit Fulvestrant verursacht ist, ist nicht klar ersichtlich, sollte in zukünftigen Studien in Patienten, besonders bei Risikopatienten, zusätzlich beobachtet werden.

Obwohl der ATP-kompetitive AKT-Inhibitor Ipatasertib nahezu keine negativen Effekte verursachte, erzeugte Capivasertib eine Reihe an kardiotoxischen Effekten. Ein relevanter Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren liegt in ihrer Selektivität. Während Ipatasertib eine sehr hohe Selektivität für die AKT Isoformen aufweist [229,230], ist Capivasertib auch bei niedrigen Konzentrationen in der Lage P70S6K, PKA und weitere Mitglieder der AGC-Familie zu inhibieren. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass Capivasertib seine kardiotoxische Funktion über diese *off-Target* Effekte vermittelt [74].

#### 5.3.4 MK-2206

MK-2206 ist ein allosterischer AKT-Inhibitor, der sich zurzeit in klinischen Phase 2 Studien befindet [97,99]. Obwohl MK-2206 in zellfreien Inhibierungs-Assays eine eher schlechte Inhibierung von AKT zeigte im Vergleich zu den anderen Inhibitoren, wies es sowohl eine recht gute anti-proliferatorische Wirkung in Krebszellen als auch eine effektive Inhibierung von AKT in H9c2 Zellen auf (Tabelle 3 & 4) [73]. Dieser geringe IC<sub>50</sub> Wert in den Kardiomyozyten ist eventuell eine Ursache für die starke Toxizität von MK-2206 bei hohen Konzentrationen.

Während es schon in mittlerer Konzentration (100x EC<sub>50</sub>: 6 µM) zu einer geringen, aber signifikanten Zellschädigung führt, zeigt sich bei der höchsten Konzentration (10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub>: 30 µM) eine starke Reduktion des Zellüberlebens um fast 40 % (Abb. 17). Diese enorme Einbuße in lebenden Zellen führte bereits durch Sorafenib zu einem vollständigen Verlust der kontraktilen Funktion der übrigen Zellen und hat auch durch MK-2206 den gleichen Effekt. In den niedrigeren Konzentrationen hingegen zeigen sich keinerlei Beeinträchtigung der Kontraktion durch MK-2206 (Abb. 18). Durch die Stimulation mit dem β-AR Agonisten Isoproterenol ließ sich die Schlagfunktion der Zellen nach MK-2206 Einwirkung teilweise wiederherstellen, blieb aber stark beeinträchtigt (Abb. 22). Da Isoproterenol β-adrenerge Rezeptoren anspricht, was daraufhin die cAMP Level in der Zelle erhöht und die PKA Aktivität steigert, wird die Freisetzung von Calcium in der Zelle verstärkt. Dies stellt die Schlagfunktion der Zellen wieder her, allerdings reicht dieser kompensatorische Effekt nicht, um eine gesunde Funktion zu erreichen [228,231].

Die stark myokardschädigende Wirkung dieses Inhibitors lässt vermuten, dass er in Patienten zu irreversiblen Langzeitschäden der Herzmuskulatur führen könnte und sollte dahingehend beobachtet werden. Der in klinischen Phase 1 Studien bestimmte c<sub>max</sub> Wert von 571 nM im Menschen bei einer Dosis von 200 mg wöchentlich [92] gibt allerdings Grund zur

Vermutung, dass MK-2206 in niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden kann, die keine Myokardschädigung hervorrufen. Da der Wirkstoff allerdings im Körper zu akkumulieren scheint, ähnlich wie das stark kardiotoxische Anthrazyklin Doxorubicin, sollte es mit besonderer Vorsicht und nur im Zusammenspiel mit geeigneter Serumdiagnostik verwendet werden. In den bisherigen Phase 1 und 2 Studien zu diesem Inhibitor wurden keine signifikanten kardiotoxischen Effekte beobachtet, die auf MK-2206 zurückzuführen waren [92–99]. Allerdings werden Myokardschäden im Herzen häufig erst nach langer Einwirkung der Wirkstoffe oder lange nach Beendigung der Behandlung symptomatisch auffällig. In anderen präklinischen Studien zu AKT-Inhibitoren zeigte sich ebenfalls die erhöhte zytotoxische Wirkung von allosterischen AKT-Inhibitoren wie MK-2206 [226].

### 5.3.5 Miransertib (ARQ 092)

Miransertib ist ein allosterischer Inhibitor von AKT, der aktuell in klinischen Studien gegen PI3K/AKT getriebene Tumore oder Proteussyndrom untersucht wird. Aktuell laufen klinische Phase 2 Studien zu diesem Inhibitor, nachdem eine Dosis-Wirkungs-Studie der Phase 1 abgeschlossen wurde [211].

Miransertib besitzt einen sehr geringen  $IC_{50}$  Wert in Kardiomyozyten, der den in Brustkrebszellen um fast zwei Drittel unterschreitet (Tabelle 3 & 4). Es bewirkte bei Einwirkung auf die kultivierten NMCM eine Zellschädigung, die mit zunehmender Konzentration anstieg. Bei mittlerer Konzentration ( $100\times EC_{50}$ :  $3,5\ \mu\text{M}$ ) verursachte dieser Inhibitor eine Myokardschädigung um 10 %, die bei höchster Konzentration ( $10.000\times in\ vitro\ IC_{50}$ :  $14\ \mu\text{M}$ ) bei über 30 % lag (Abb. 17). Dies passt zu den Beobachtungen von Kostaras et al., die zeigten, dass allosterische AKT-Inhibitoren eine stärkere Zytotoxizität vermitteln als ATP-kompetitive Inhibitoren [226].

Auch auf die kontraktile Funktion der Zellen scheint Miransertib Einfluss zu haben. Anders als bei noch stärker zytotoxischen Substanzen MK-2206 und Sorafenib, schien das verringerte Zellüberleben bei Miransertib noch zu keinem Verlust der Schlagfunktion zu führen (Abb. 18). So war bei mittlerer Konzentration ein signifikanter Abfall der Schlagrate zu beobachten und bei hoher Konzentration eine Verringerung der Amplitude. Bei mittlerer Konzentration waren zusätzlich Arrhythmien messbar, die bei hohen Konzentrationen von Miransertib jedoch nicht mehr auftraten (Abb. 19). Die von Miransertib verursachten Effekte scheinen daher nicht konzentrationsabhängig zuzunehmen. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass bei



unterschiedlichen Konzentrationen unterschiedliche *off-Target* Effekte den Einfluss auf die Zellen dominieren. Um welche Zielproteine und Effekte es sich handelt, müsste in gesonderten Studien zur Selektivität von Miransertib in Kardiomyozyten ermittelt werden.

Die Stimulation der Zellen mit Isoproterenol führte zu keiner Veränderung der zytotoxischen Wirkung von Miransertib, beeinflusste aber den Effekt auf die kontraktile Funktion der Zellen (Abb. 22). Nach Stimulation zeigte Miransertib bei mittlerer und hoher Konzentration eine Reduktion der Schlagrate und Amplitude im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Obwohl die Amplitude bei hoher Konzentration nicht signifikant anders war als die Kontrolle, kann dennoch von einem Einfluss von Miransertib ausgegangen werden, da die geringere Amplitude der stimulierten Kontrolle vermutlich durch die reziproke Kopplung von Schlagrate und Amplitude ausgelöst wird. Da Miransertib jedoch zu keiner Erhöhung der Schlagrate führte, ist die Reduktion der Amplitude eher ein direkter Einfluss des Wirkstoffes, als ein abgeleiteter Effekt durch die Messtechnik. Zusätzlich verstärkt die Stimulation die pro-arrhythmische Wirkung von Miransertib auf die Zellen und sowohl in mittlerer als auch hoher Konzentration treten nun Arrhythmien auf (Abb. 23). Die Stimulation mit Isoproterenol verschlechterte also alle Parameter der Schlagfunktion unter Miransertibeeinfluss. Da Isoproterenol die Calciumfreisetzung beeinflusst, kann man vermuten, dass auch Miransertib seine kardiotoxische Wirkung über einen Einfluss auf die Calcium-Homöostase vermittelt. Um das hinreichend zu klären, wären allerdings spezifische Untersuchungen des Calcium-Haushaltes unter Miransertibeeinfluss nötig.

Obwohl in Phase 1 Studien im Menschen ein  $c_{\max}$  von 1,5  $\mu\text{M}$  beobachtet wurde [85], was noch unterhalb der hier eingesetzten mittleren Konzentration lag, ist Miransertib aufgrund der zahlreichen kardiotoxischen Effekte in NMCM bei höheren Konzentrationen mit Vorsicht einzusetzen. Unerwartet hohe Serumkonzentrationen oder kardiale Risikofaktoren könnten zu schweren kardiotoxischen Effekten führen und schwere, eventuell irreversible Schäden am Herzen verursachen.

### **5.3.6 Stimulation der Herzfunktion mit dem $\beta$ -AR Agonisten Isoproterenol**

Einen großen Vorteil, den der einfache Aufbau des Impedanzsystems besitzt, ist die Möglichkeit, den Assay um weitere Stressoren zu erweitern, um bestimmte Situationen, die in Patienten auftreten können, zu simulieren. So haben wir zum Beispiel durch die Zugabe des  $\beta$ -adrenerger-Rezeptor Agonisten Isoproterenol eine Stresssituation für die Zellen simuliert und

die Wirkung der Inhibitoren auf diese neue Situation beobachtet. Zusätzlich wird Isoproterenol eingesetzt, um kurzzeitig die Schlagkraft des Herzens zu verbessern [232,233]. Sollte der Einsatz von Isoproterenol keinen Einfluss oder sogar eine Aufhebung der negativen Effekte bestimmter Inhibitoren haben, wäre ein Einsatz dieses oder ähnlicher Katecholamine zur Behandlung der auftretenden Nebenwirkungen eventuell eine reale Möglichkeit.

Isoproterenol aktiviert vor allem den  $\beta_1$ -AR und erhöht die Freisetzung von cAMP, erhöht die PKA Aktivität und verstärkt den Calcium-Einstrom in die Zellen und erzeugt so eine stärkere diastolische Depolarisation und eine erhöhte Schlagfrequenz des Herzens [228,231].

Wir konnten beobachten, dass die Reaktion der unbehandelten Zellen auf den Stimulus physiologisch passende Auswirkungen hatte. So nahm das Zellüberleben nach Stimulation leicht ab und die Schlagfrequenz signifikant zu. Ein unphysiologischer Effekt ist die Abnahme der Amplitude, die in physiologischen Systemen bei Stress zunimmt. Dies liegt an der reziproken Kopplung von Schlagfrequenz und gemessener Amplitude in der impedanzbasierten Messung von kultivierten Zellen (vgl. 5.2.3) (Abb. 21-23).

Die Inhibitoreinwirkung auf die stimulierten Zellen zeigte unabhängig von der physiologischen Reaktion der Zellen kaum einen Unterschied zu ihrer Wirkung in unstimulierten Zellen. Bemerkenswert jedoch ist, dass die Stimulation mit Isoproterenol die kontraktile Funktion nach Einwirkung von MK-2206 in seiner höchsten Konzentration wiederherstellen konnte (Abb. 22), wenn auch nur eingeschränkt. Zusätzlich ist zu beobachten, dass die Stimulation die pro-arrhythmische Wirkung von Borussertib vollständig verhindert hat, dementsprechend die pro-arrhythmische Wirkung von Miransertib verstärkte (Abb. 23). Offenbar vermitteln Borussertib und Miransertib ihre pro-arrhythmische Wirkung über unterschiedliche Mechanismen, die durch die Stimulation mit Isoproterenol unterschiedlich beeinflusst werden. Die durch die Aktivierung von  $\beta$ -AR erreichte Erhöhung in cAMP-Leveln und PKA Aktivität führen subsequent zu einer Regulierung verschiedener Ionenkanäle, die sowohl die Kontraktion als auch die Signalweiterleitung der Zellen beeinflussen. Dies kann zu Arrhythmien führen [228,231]. Additive oder antagonistische Einflüsse der Inhibitoren und der Stimulation könnten die beobachtete Veränderung in pro-arrhythmischen Effekten von Borussertib und Miransertib nach Stimulation erklären. Welche genauen Einflüsse die Inhibitoren tatsächlich auf die Ionenkanäle haben ist nicht abschließend geklärt. Die Einflüsse der Stimulation auf die Effekte der Inhibitoren können jedoch dabei helfen, die Mechanismen der pro-arrhythmischen Wirkung genauer zu identifizieren.

### 5.3.7 AKT-Inhibitoren verhindern Stimulus-induziertes hypertrophes Zellwachstum im Herzen

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Kardiotoxizität ist das Potential hypertrophes Wachstum von Herzzellen auszulösen. Da der PI3K/AKT Signalweg für eine Beteiligung an sowohl physiologischem als auch pathologischem hypertrophem Wachstum bekannt ist [159], liegt die Vermutung nahe, dass ein Eingriff in diesen komplexen Signalweg negative Folgen haben könnte. Um das Zellwachstum zu analysieren, wurden neonatale Mauskardiomyozyten unter dem Mikroskop auf ihre Zellgröße nach Inhibitoreinwirkung untersucht. Zusätzlich wurden zwei hypertrophe Stimuli verwendet, Phenylephrin (PE) und IGF, um den Einfluss der Inhibitoren auf diese Stimuli zu untersuchen.

Da keiner der Inhibitoren zu einer Veränderung in der Zellgröße der Kardiomyozyten geführt hat, kann man davon ausgehen, dass eine Inhibierung von AKT durch diese Inhibitoren die Kardiomyozytengröße nicht beeinflusst (Abb. 20 A). Eine Zugabe des  $\alpha_1$ -Rezeptor Agonisten Phenylephrin bewirkte in gesunden Zellen ein hypertrophes Zellwachstum um fast 35 %. Die Verwendung des RTK Agonisten IGF führte zu einer Zellgrößenveränderung um 25 %. Die Inhibierung von AKT durch alle verwendeten Inhibitoren verhindert diese Effekte vollständig (Abb. 20 B & C).

RTKs sind einer der Hauptinitiatoren der PI3K/AKT Kaskade und eine Inhibierung dieses Signalweges schränkt die Signalweiterleitung der durch IGF Stimulierten RTK stark ein. Der durch Phenylephrin aktivierte  $\alpha_1$ -Rezeptor vermittelt seine Aktivität über die  $G\alpha_q$  Subklasse der G-Proteine, welche durch Phospholipase C (PLC) Aktivierung PIP<sub>3</sub> Level erhöht und so ebenfalls Einfluss auf die PI3K/AKT Kaskade nimmt [155,156,234,235]. Da allerdings beide dieser Rezeptorklassen auch maßgeblich die Raf/MEK/ERK Kaskade ansprechen, welche eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Hypertrophie spielt [107,236], ist es unwahrscheinlich, dass eine Inhibierung von AKT eine pathologische Hypertrophie *in vivo* vollständig verhindern kann. Gao et al. (2017), zeigte in einem Mausmodell zur Untersuchung von kardialer Hypertrophie, dass die Inhibierung des PI3K/AKT Signalwegs eine signifikante aber nicht vollständige Reduktion pathologischer Hypertrophie nach Aortenkonstriktion bewirkt, was auch unsere *in vitro* Ergebnisse unterstützen würde [237].

## 5.4 Charakterisierung neuer ERK-Inhibitoren

Ein weiterer wichtiger Signalweg, der in Krebserkrankungen häufig mutiert oder hochreguliert ist, ist die Raf/MEK/ERK Kaskade [225]. Es gibt bereits eine Reihe an chemotherapeutischen Inhibitoren, die verschiedene Kinasen innerhalb dieses Signalwegs hemmen. Während Raf- und MEK-Inhibitoren schon seit längerer Zeit entwickelt und eingesetzt werden, gibt es bisher keine ERK-Inhibitoren, die eine Zulassung in der Klinik erreicht haben. Eine Reihe an ERK-Inhibitoren befinden sich zurzeit in präklinischen Studien und werden auf ihre Effektivität in der Tumorbekämpfung untersucht [137,143,145,147,151,154]. Einige dieser Substanzen haben wir ausgewählt, um sie mit dem Impedanzassay auf ihre kardiotoxischen Effekte zu untersuchen und ihre möglichen Einflüsse auf das Herz zu charakterisieren.

Da die Raf/MEK/ERK eine ubiquitär vorkommende Signalkaskade ist, die insbesondere im Herzen sowohl protektive als auch pathologische Effekte auslösen kann [162,238], ist die Inhibierung einer der maßgeblichen Kinasen dieser Kaskade ein schwieriges Unterfangen. Obwohl auch MEK-Inhibitoren bereits in der Klinik zugelassen sind, zeigen sich auch dort immer wieder kardiotoxische Nebenwirkungen, wie wir bereits an Trametinib und Selumetinib haben zeigen können. Um die neuen ERK-Inhibitoren auf ihre Kardiotoxizität zu untersuchen, haben wir verschiedene Konzentrationen, abgeleitet aus der zellfreien Kinasehemmung der jeweiligen Stoffe, auf ihren Einfluss auf verschiedene kardiiale Eigenschaften untersucht. Die Inhibitoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, waren der Dimerisierungs-Inhibitor DEL-22379 [137]; die dual-spezifischen ATP-kompetitiven Inhibitoren Sch772984 und MK-8353 [147,152]; sowie die ATP-kompetitiven Inhibitoren Ravoxertinib, Ulixertinib und Ly-3214996 [143,145,153].

Die hier charakterisierten ERK-Inhibitoren zeigten unabhängig von ihren Wirkmechanismen eine konzentrationsabhängige Zellschädigung, die schon bei mittleren Konzentrationen zu signifikanten Schäden führen konnte (Abb. 24). Da diese Zytotoxizität in allen ERK-Inhibitoren auftrat, die neben ERK1/2 sehr unterschiedliche *off-Target* Zielproteine haben [143,145,147,152,154], ist naheliegend, dass es sich hier um einen *on-Target* Effekt der ERK-Inhibierung handelt. Obwohl es auch einzelne Inhibitoren gab, die darüber hinaus weitere Nebenwirkungen verursachten, scheinen die wichtigsten Faktoren beim Einsatz von ERK-Inhibitoren die strukturelle Zellschädigung zu sein, die stark abhängt von der eingesetzten Dosis und der daraus resultierenden Serumkonzentration. Allerdings zeigten bisherige klinische Studien, dass die maximale Serumkonzentration der ERK-Inhibitoren mit 5-10  $\mu\text{M}$  eher in

höheren Bereichen liegt [117,119,152]. Ob eine Reduktion der Dosis zum kardialen Schutz signifikante Einbußen in der Wirksamkeit der Wirkstoffe gegen Tumore bedingt, bleibt noch zu untersuchen.

Der Dimerisierungs-Inhibitor DEL-22379 vermittelte bei hohen Konzentrationen zusätzlich zur strukturellen Zellschädigung in allen Bereichen schwere kardiotoxische Einflüsse. Da wir jedoch nur einen solchen Inhibitor vermessen konnten, ist nicht klar, ob dies ein Effekt der Dimerisierungs-Hemmung oder ein spezifischer Effekt dieses Wirkstoffes ist. Die Charakterisierung und der Vergleich mit anderen Dimerisierungs-Inhibitoren, wie zum Beispiel dem Dimerisierungs-Inhibitor EDI von Tomasovic et al. [142], könnte hier mehr Informationen liefern.

Unter den vermessenen ATP-kompetitiven ERK-Inhibitoren hatte nur MK-8353 über die strukturelle Zellschädigung hinaus Einflüsse auf die kontraktile Funktion der Zellen. Ein allgemeiner Einfluss durch die ATP-Konkurrenz ist daher eher auszuschließen.

#### **5.4.1 DEL-22379**

Nach der Phosphorylierung durch MEK1/2 am TEY-Motiv ist ERK1/2 in der Lage Zielproteine im Zytosol oder im Zellkern zu phosphorylieren. ERK1/2 kann im phosphorylierten Zustand sowohl als Monomer oder als auch als Dimer agieren. DEL-22379 ist ein potenter Dimerisierungs-Inhibitor von ERK1/2 und befindet sich zurzeit in präklinischen Studien. Die Notwendigkeit einer Dimerisierung zur Bindung bestimmter Zielproteine oder zur Lokalisation im Zytosol bzw. im Nukleus ist nach wie vor umstritten. Während andere Studien zur Dimerisierung von ERK1/2 zeigten, dass eine Auto-Phosphorylierung von ERK1/2 Dimeren an der Stelle Thr188 zu einer Translokation in den Zellkern führt [106,163] und eine Dimerisierungs-Inhibierung dies zu verhindern scheint [142], zeigte die Verwendung von DEL-22379 eine Verringerung in der Phosphorylierung zytosolischer und eine Erhöhung der Phosphorylierung nuklearer Zielproteine [137].

DEL-22379 verursachte in der Base-Impedanzmessung eine signifikante Zellschädigung bei hohen Konzentrationen ( $10.000\times$  *in vitro*  $IC_{50}$ :  $10\ \mu\text{M}$ ), die die gleiche konzentrationsabhängige Ausprägung zeigte wie die anderen hier untersuchten ERK-Inhibitoren (Abb. 24). Zusätzlich verursachte es jedoch bei hoher Konzentration eine starke Verringerung der Schlagrate und eine milde Reduktion der Amplitude (Abb. 25). DEL-22379 war schließlich auch der einzige hier untersuchte ERK-Inhibitor, der

schwerwiegende Arrhythmien hervorrief, die die Schwere der gemessenen Arrhythmien von AKT-Inhibitoren und der Referenzsubstanzen noch überstieg (Abb. 26).

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Zellschädigung sowie des hohen pro-arrhythmischen Potentials, das in DEL-22379 beobachtet werden konnte, ist die sichere Anwendung in Patienten vorsichtig zu erwägen. Im vergangenen Jahr (2020) untersuchten Yang et al. jedoch eine Vielzahl von DEL-22379 Derivaten, die sie auf ihre Effektivität in verschiedenen Krebszelllinien untersuchten [138]. Eine Erweiterung dieser Studie um kardiotoxische Effekte würde einen wichtigen Parameter hinzufügen, um eine optimale Strukturauswahl treffen und weiterentwickeln zu können.

#### 5.4.2 Sch772984 und MK-8353

Nachdem der ATP-kompetitive dual-spezifische ERK-Inhibitor Sch772984 in *in vitro* und Xenograft Versuchen vielversprechende Ergebnisse lieferte [148], wurde MK-8353, ein aus der Struktur von Sch772984 abgeleiteter Inhibitor, entwickelt [147]. MK-8353 stammt aus einer Erweiterung der Struktur von Sch772984 um eine Thiomethylpyrrolidin-Gruppe, um die Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit zu verbessern [151]. Während Sch772984 bisher nur *in vitro* untersucht wurde, fand MK-8353 bereits Anwendung in klinischen Phase 1 Studien [152]. Beide Inhibitoren haben wir hier auf ihre Kardiotoxizität hin untersucht und beobachteten in niedriger Konzentration (100x *in vitro* IC<sub>50</sub><sub>Sch772984</sub>: 0,1 µM, 100x *in vitro* IC<sub>50</sub><sub>MK-8353</sub>: 0,7 µM) keine Auffälligkeiten, sahen aber bei hohen Konzentrationen (10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub><sub>Sch772984</sub>: 10 µM, 10.000x *in vitro* IC<sub>50</sub><sub>MK-8353</sub>: 30 µM) eine starke konzentrationsabhängige Zellschädigung, die bei MK-8353 aufgrund der höheren Konzentration etwas stärker ausgeprägt war als bei Sch772984 (Abb. 24 B). In den Messungen zur Amplitude und zum Schlagrhythmus der Zellen waren sowohl Sch772984 als auch MK-8353 unauffällig (Abb. 25 & 26). Lediglich in der Schlagfrequenz verursachte MK-8353 eine signifikante Reduktion, die bei Sch772984 nicht auftrat. (Abb. 25 D).

MK-8353 wurde als Nachfolger von Sch772984 entwickelt, besitzt aber eine geringere Inhibierungswirkung von ERK1/2 in zellfreien Assays sowie in Kardiomyozyten und verursacht eine ähnliche kardiale Zellschädigung wie Sch772984. Besonders auffällig war jedoch die signifikante Verringerung der Schlagrate, die durch MK-8353, nicht aber durch Sch772984, verursacht wurde. Obwohl MK-8353 eine strukturelle Weiterentwicklung von Sch772984 ist, besitzen sie sehr unterschiedliche *off-Target* Zielproteine [147,152]. Dass die

durch MK-8353 verursachten Nebenwirkungen daher *off-Target* Effekte sind, ist wahrscheinlicher als ein *on-Target* Effekt.

Da MK-8353 für bessere Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit im Menschen entwickelt wurde, kann es eventuell in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt werden, als es bei Sch772984 möglich gewesen wäre. Während Sch772984 noch nicht im Menschen verwendet wurde, konnte bei MK-8353 ein  $c_{\max}$  Wert von 10  $\mu\text{M}$  bei einer Dosis von 400 mg beobachtet werden [152]. Dies bewegt sich eher in der Größenordnung der höheren hier vermessenen Konzentration. Eine Übertragung der beobachteten kardialen Nebenwirkung auf den Menschen ist daher möglich.

### 5.4.3 Ravoxertinib (GDC-0994), Ulixertinib (BVD-523) und Ly-3214996

Die ERK-Inhibitoren Ravoxertinib, Ulixertinib und Ly-3214996 inhibieren ERK ATP-kompetitiv. Alle drei Inhibitoren verursachten eine Zellschädigung, die der eingesetzten Konzentration entsprach. Ravoxertinib und Ly-3214996 verursachten bei hoher Konzentration (10.000x *in vitro*  $\text{IC}_{50}$ : 30  $\mu\text{M}$ ) signifikante Zellschädigung, während Ulixertinib in seiner hohen Konzentration (10.000x *in vitro*  $\text{IC}_{50}$ : 3  $\mu\text{M}$ ) nur ein Zehntel so konzentriert ist wie die anderen Inhibitoren und auch keine signifikante Veränderung in der Base-Impedanz verursacht (Abb. 24). Allerdings ist schon bei 3  $\mu\text{M}$  eine tendenzielle Schädigung der Zellen durch Ulixertinib zu beobachten. Es ist zu vermuten, dass auch Ulixertinib eine konzentrationsabhängige Zellschädigung verursacht und in höheren Konzentrationen ebenso zytotoxisch ist, wie die anderen hier vermessenen ERK-Inhibitoren. Eine klinische Phase 1 Studie zur Dosisevaluierung zeigte in der empfohlenen Dosis von 600 mg eine Serumkonzentration von 6,3  $\mu\text{M}$  [119]. Diese Konzentration ist mehr als doppelt so hoch wie die von uns eingesetzte und eine signifikante Zellschädigung durch Ulixertinib im Patienten ist daher nicht unwahrscheinlich. Ravoxertinib hingegen erreichte eine maximale Serumkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  bei einer Dosis von 800 mg und immerhin noch 5  $\mu\text{M}$  bei der empfohlenen Dosis von 400 mg [117], was niedriger als die hier verwendete Konzentration ist, aber dennoch kardiotoxische Effekte vermuten lässt. Klinische Phase 1 Studien mit Ly-3214996 laufen aktuell und sollen später im Jahr (2021) abgeschlossen werden. Entsprechende pharmakokinetische Daten sind daher noch nicht veröffentlicht.

Während diese ATP-kompetitiven Inhibitoren also konzentrationsabhängig vermutlich die gleichen Schäden an der strukturellen Zellgesundheit verursachen, schienen sie auf die

kontraktile Funktion der Zellen keinen Einfluss zu haben. Sowohl die Amplitude, Schlagrate als auch der Schlagrhythmus sind unbeeinflusst durch die Inhibitoreinwirkung (Abb. 25 & 26). Da die Inhibitoren augenscheinlich die gleichen konzentrationsabhängigen kardiotoxischen Effekte vermitteln, hängt ihre Verwendbarkeit im Menschen hauptsächlich von der eingesetzten Dosis und der daraus resultierenden Serumkonzentration ab.

## 5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Impedanzassay erwies sich als sehr gute Vorhersagemethode für die Zytotoxizität von Wirkstoffen und zeigten bei den von uns verwendeten Referenzsubstanzen eine Übereinstimmung mit den Erwartungen aufgrund klinischer Daten. Der Einfluss der Substanzen auf die kontraktile Funktion der Zellen war weniger sensibel, konnte aber in höheren Konzentrationen ebenfalls evaluiert werden. Die Daten zur pro-arrhythmischen Wirkung der Substanzen war ebenfalls verlässlich, benötigt aber für die Zukunft eine bessere Art der Quantifizierung, um eine schnelle und intuitive Evaluierung der Wirkstoffe zuzulassen.

Nachdem das Impedanzassay sich anhand der Referenzsubstanzen als gutes Vorhersageinstrument für klinische Nebenwirkungen herausstellte, wendeten wir es auf verschiedene in der Entwicklung befindliche AKT- und ERK-Inhibitoren an, die bisher nicht spezifisch auf ihre Kardiotoxizität untersucht wurden. Sowohl bei den AKT- als auch den ERK-Inhibitoren zeigten sich verschiedene Einflüsse der Substanzen auf die Kardiomyozyten, die eine Einschätzung der kardiotoxischen Wirkung ermöglichten und vielversprechende Wirkstoffe wie Ipatasertib und Ravoxertinib von toxischen Stoffen wie Miransertib und DEL-22379 abgrenzten. Anhand der gewonnenen Daten der verschiedenen Inhibitoren, lassen sich nicht nur einzelne Inhibitoren charakterisieren, sondern auch Erkenntnisse über Substanzklassen erlangen. Da die auftretenden Nebenwirkungen immer von der verwendeten Konzentration abhängig sind, hängt eine Übertragung auf den Menschen stark von der eingesetzten Dosis und der resultierenden Serumkonzentration ab. Die präklinische Charakterisierung ermöglicht jedoch während der klinischen Studien die kritischen Faktoren der untersuchten Substanzen gezielt im Auge zu behalten und so die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten sowie die relevanten Informationen während der Studie aufzuzeichnen.

Noch immer besteht die Möglichkeit und Notwendigkeit, das Impedanzassay zu erweitern und zu optimieren, um die Situation im Menschen noch genauer darzustellen. Die Verwendung von hiPS-CM könnte das Assay den menschlichen Bedingungen weiter annähern. Eine



Erweiterung der Messung durch *Pacing* der Zellen, Charakterisierung der Elektrophysiologie oder die zusätzliche Verwendung von membranbasierten Kultivierungsplatten würde die Genauigkeit der Substanzcharakterisierung weiter optimieren.

Ein derart optimiertes Assay würde sich für die standardisierte Charakterisierung von neuen Wirkstoffe eignen und könnte für die Zukunft einen Standard in der Vermeidung von Kardiotoxizitäten setzen, der bisher nicht existiert. So können kardiotoxische Substanzen schon präklinisch oder nach klinischen Phase 1 Studien identifiziert und optimiert werden und akute und chronische Herzschiidigung in Patienten vorhersehbarer werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sarkar, S.; Horn, G.; Moulton, K.; Oza, A.; Byler, S.; Kokolus, S.; Longacre, M. Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21087–21113, doi:10.3390/ijms141021087.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
4. Allemani, C.; Matsuda, T.; Di Carlo, V.; Harewood, R.; Matz, M.; Nikšić, M.; Bonaventure, A.; Valkov, Mi.; Johnson, C.J.; Estève, J.; et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* **2018**, *391*, 1023–1075, doi:10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
5. Koci, B.; Luerman, G.; Duenbostell, A.; Kettenhofen, R.; Bohlen, H.; Coyle, L.; Knight, B.; Ku, W.; Volberg, W.; Woska, J.R.; et al. An impedance-based approach using human iPSC-derived cardiomyocytes significantly improves in vitro prediction of in vivo cardiotoxic liabilities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2017**, *329*, 121–127, doi:10.1016/j.taap.2017.05.023.
6. Gintant, G.; Sager, P.T.; Stockbridge, N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 457–471, doi:10.1038/nrd.2015.34.
7. Onakpoya, I.J.; Heneghan, C.J.; Aronson, J.K. Worldwide withdrawal of medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review and analysis. *Crit. Rev. Toxicol.* **2016**, *46*, 477–489, doi:10.3109/10408444.2016.1149452.
8. Pai, V.B.; Nahata, M.C. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents. Incidence, treatment and prevention. *Drug Saf.* **2000**, *22*, 263–302, doi:10.2165/00002018-200022040-00002.
9. Van Leeuwen, M.T.; Luu, S.; Gurney, H.; Brown, M.R.; Webber, K.; Pearson, S.A.; Hunt, L.; Vajdic, C.M. Cardiovascular toxicity of targeted therapies for cancer: A protocol for an overview of systematic reviews. *BMJ Open* **2018**, *8*, 1–6, doi:10.1136/bmjopen-2017-021064.
10. Lipshultz, S.E.; Franco, V.I.; Miller, T.L.; Colan, S.D.; Sallan, S.E. Cardiovascular disease in adult survivors of childhood cancer. *Annu. Rev. Med.* **2015**, *66*, 161–176,

- doi:10.1146/annurev-med-070213-054849.
11. Magdy, T.; Schuldt, A.J.T.; Wu, J.C.; Bernstein, D.; Burridge, P.W. Human Induced Pluripotent Stem Cell (hiPSC)-Derived Cells to Assess Drug Cardiotoxicity: Opportunities and Problems. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *58*, 83–103, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010617-053110.
  12. Palmer, J.A.; Smith, A.M.; Gryshkova, V.; Donley, E.L.R.; Valentin, J.-P.; Burrier, R.E. A Targeted Metabolomics-Based Assay Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Identifies Structural and Functional Cardiotoxicity Potential. *Toxicol. Sci.* **2020**, *174*, 218–240, doi:10.1093/toxsci/kfaa015.
  13. Lyon, A.R.; Dent, S.; Stanway, S.; Earl, H.; Brezden-Masley, C.; Cohen-Solal, A.; Tocchetti, C.G.; Moslehi, J.J.; Groarke, J.D.; Bergler-Klein, J.; et al. Baseline cardiovascular risk assessment in cancer patients scheduled to receive cardiotoxic cancer therapies: a position statement and new risk assessment tools from the Cardio-Oncology Study Group of the Heart Failure Association of the European Society. *Eur. J. Heart Fail.* **2020**, *22*, 1945–1960, doi:10.1002/ejhf.1920.
  14. Clements, M.; Millar, V.; Williams, A.S.; Kalinka, S. Bridging functional and structural cardiotoxicity assays using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for a more comprehensive risk assessment. *Toxicol. Sci.* **2015**, *148*, 241–260, doi:10.1093/toxsci/kfv180.
  15. Lenneman, C.G.; Sawyer, D.B. Cardio-oncology: An update on cardiotoxicity of cancer-related treatment. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1008–1020, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303633.
  16. Mellor, H.R.; Bell, A.R.; Valentin, J.P.; Roberts, R.R.A. Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer. *Toxicol. Sci.* **2011**, *120*, 14–32, doi:10.1093/toxsci/kfq378.
  17. Cardinale, D.; Colombo, A.; Lamantia, G.; Colombo, N.; Civelli, M.; De Giacomi, G.; Rubino, M.; Veglia, F.; Fiorentini, C.; Cipolla, C.M. Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. Clinical Relevance and Response to Pharmacologic Therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *55*, 213–220, doi:10.1016/j.jacc.2009.03.095.
  18. Wu, P.; Clausen, M.H.; Nielsen, T.E. Allosteric small-molecule kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *156*, 59–68, doi:10.1016/j.pharmthera.2015.10.002.
  19. Sanderson, K. Irreversible kinase inhibitors gain traction. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 649–651, doi:10.1038/nrd4103.

20. Carnero, A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 34–44, doi:10.2174/138161210789941865.
21. Gewirtz, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727–741, doi:10.1016/S0006-2952(98)00307-4.
22. Greene, R.F.; Jenkins, J.F.; Speyer, J.L.; Myers, C.E.; Collins, J.M. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: Implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 3417–3421.
23. Chatterjee, K.; Zhang, J.; Honbo, N.; Karliner, J.S. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* **2010**, *115*, 155–162, doi:10.1159/000265166.
24. Zhao, L.; Zhang, B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–11, doi:10.1038/srep44735.
25. Koleini, N.; Kardami, E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget* **2017**, *8*, 46663–46680, doi:10.18632/oncotarget.16944.
26. Tan, X.; Wang, D.; Lu, X.; Wei, H.; Zhu, R.; Zhu, S.; Jiang, H.; Yang, Z. Doxorubicin Induces Apoptosis in H9c2 Cardiomyocytes: Role of Overexpressed Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A. *Biol. Pharm. Bull. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 1666–1672, doi:10.1248/bpb.33.1666.
27. Al-malky, H.S.; Al Harthi, S.E.; Osman, A.M.M. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **2020**, *26*, 434–444, doi:10.1177/1078155219877931.
28. Wilhelm, S.M.; Carter, C.; Tang, L.Y.; Wilkie, D.; McNabola, A.; Rong, H.; Chen, C.; Zhang, X.; Vincent, P.; McHugh, M.; et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7099–7109, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1443.
29. Hansen, C.R.; Grimm, D.; Bauer, J.; Wehland, M.; Magnusson, N.E. Effects and side effects of using sorafenib and sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18020461.
30. Bronte, E.; Bronte, G.; Novo, G.; Bronte, F.; Bavetta, M.G.; Re, G. Lo; Brancatelli, G.; Bazan, V.; Natoli, C.; Novo, S.; et al. What links BRAF to the heart function? New

- insights from the cardiotoxicity of BRAF inhibitors in cancer treatment. *Oncotarget* **2015**, *6*, 35589–35601, doi:10.18632/oncotarget.5853.
31. Strumberg, D.; Clark, J.W.; Awada, A.; Moore, M.J.; Richly, H.; Hendlisz, A.; Hirte, H.W.; Eder, J.P.; Lenz, H.; Schwartz, B. Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Antitumor Activity of Sorafenib: A Review of Four Phase I Trials in Patients with Advanced Refractory Solid Tumors. *Oncologist* **2007**, *12*, 426–437, doi:10.1634/theoncologist.12-4-426.
  32. Yang, B.; Papoian, T. Preclinical approaches to assess potential kinase inhibitor-induced cardiac toxicity: Past, present and future. *J. Appl. Toxicol.* **2018**, *38*, 790–800, doi:10.1002/jat.3584.
  33. Government, U. Sorafenib, UK SPC. *Med. Healthc. Prod. Regul. Agency* **2020**.
  34. Chaar, M.; Kamta, J.; Ait-Oudhia, S. Mechanisms, monitoring, and management of tyrosine kinase inhibitors-associated cardiovascular toxicities. *Onco. Targets. Ther.* **2018**, *11*, 6227–6237, doi:10.2147/OTT.S170138.
  35. Ma, W.; Liu, M.; Liang, F.; Zhao, L.; Gao, C.; Jiang, X.; Zhang, X.; Zhan, H.; Hu, H.; Zhao, Z. Cardiotoxicity of sorafenib is mediated through elevation of ROS level and CaMKII activity and dysregulation of calcium homeostasis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2020**, *126*, 166–180, doi:10.1111/bcpt.13318.
  36. Hasinoff, B.B.; Patel, D. Mechanisms of myocyte cytotoxicity induced by the multikinase inhibitor sorafenib. *Cardiovasc. Toxicol.* **2010**, *10*, 1–8, doi:10.1007/s12012-009-9056-0.
  37. Song, G.; Ouyang, G.; Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* **2005**, *9*, 59–71, doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x.
  38. Rinnerthaler, G.; Gampenrieder, S.P.; Greil, R. ASCO 2018 highlights: metastatic breast cancer. *Memo - Mag. Eur. Med. Oncol.* **2018**, *11*, 276–279, doi:10.1007/s12254-018-0450-9.
  39. Mundi, P.S.; Sachdev, J.; McCourt, C.; Kalinsky, K. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *110*, 943–956, doi:10.1111/bcp.13021.
  40. Datta, S.R.; Brunet, A.; Greenberg, M.E. Cellular survival: A play in three acts. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2905–2927, doi:10.1101/gad.13.22.2905.
  41. Abeyrathna, P.; Su, Y. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul. Pharmacol.* **2015**, *74*, 38–48, doi:10.1016/j.vph.2015.05.008.

42. Staal, S.P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 5034–5037, doi:10.1073/pnas.84.14.5034.
43. Staal, S.P.; Hartley, J.W.; Rowe, W.P. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 3065–3067, doi:10.1073/pnas.74.7.3065.
44. Wang, Q.; Chen, X.; Hay, N. Akt as a target for cancer therapy: More is not always better (lessons from studies in mice). *Br. J. Cancer* **2017**, *117*, 159–163, doi:10.1038/bjc.2017.153.
45. Santi, S.A.; Lee, H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2010**, *298*, 580–591, doi:10.1152/ajpcell.00375.2009.
46. Yu, H.; Littlewood, T.; Bennett, M. Akt isoforms in vascular disease. *Vascul. Pharmacol.* **2015**, *71*, 57–64, doi:10.1016/j.vph.2015.03.003.
47. Nitulescu, G.M.; Van De Venter, M.; Nitulescu, G.; Ungurianu, A.; Juzenas, P.; Peng, Q.; Olaru, O.T.; Grădinaru, D.; Tsatsakis, A.; Tsoukalas, D.; et al. The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *Int. J. Oncol.* **2018**, *53*, 2319–2331, doi:10.3892/ijo.2018.4597.
48. Kumar, C.C.; Madison, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **2005**, *24*, 7493–7501, doi:10.1038/sj.onc.1209087.
49. Liao, Y.; Hung, M.C. Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am. J. Transl. Res.* **2010**, *2*, 19–42.
50. Klimovich, B.; Mutlu, S.; Schneikert, J.; Elmshäuser, S.; Klimovich, M.; Nist, A.; Mernberger, M.; Timofeev, O.; Stiewe, T. Loss of p53 function at late stages of tumorigenesis confers ARF-dependent vulnerability to p53 reactivation therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 22288–22293, doi:10.1073/pnas.1910255116.
51. Cardone, M.H.; Roy, N.; Stennicke, H.R.; Salvesen, G.S.; Franke, T.F.; Stanbridge, E.; Frisch, S.; Reed, J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science (80-. )*. **1998**, *282*, 1318–1321, doi:10.1126/science.282.5392.1318.
52. Basu, S.; Totty, N.F.; Irwin, M.S.; Sudol, M.; Downward, J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 11–23, doi:10.1016/S1097-2765(02)00776-1.
53. Cai, S.L.; Tee, A.R.; Short, J.D.; Bergeron, J.M.; Kim, J.; Shen, J.; Guo, R.; Johnson, C.L.; Kiguchi, K.; Walker, C.L. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated

- phosphorylation and membrane partitioning. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 279–289, doi:10.1083/jcb.200507119.
54. Murakami, M.; Ichisaka, T.; Maeda, M.; Oshiro, N.; Hara, K.; Edenhofer, F.; Kiyama, H.; Yonezawa, K.; Yamanaka, S. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 6710–8, doi:10.1128/MCB.24.15.6710-6718.2004.
55. Wiza, C.; Nascimento, E.B.M.; Ouwens, D.M. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2012**, *302*, 1453–1460, doi:10.1152/ajpendo.00660.2011.
56. Bouskila, M.; Hunter, R.W.; Ibrahim, A.F.M.; Delattre, L.; Peggie, M.; Van Diepen, J.A.; Voshol, P.J.; Jensen, J.; Sakamoto, K. Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell Metab.* **2010**, *12*, 456–466, doi:10.1016/j.cmet.2010.10.006.
57. Jacobs, K.M.; Bhawe, S.R.; Ferraro, D.J.; Jaboin, J.J.; Hallahan, D.E.; Thotala, D. GSK-3 $\beta$ : A bifunctional role in cell death pathways. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, doi:10.1155/2012/930710.
58. Carnero, A.; Blanco-Aparicio, C.; Renner, O.; Link, W.; Leal, J. The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications. *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, *8*, 187–198, doi:10.2174/156800908784293659.
59. Carnero, A.; Paramio, J.M. The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, cancer mouse models. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 1–10, doi:10.3389/fonc.2014.00252.
60. Saura, C.; Roda, D.; Roselló, S.; Oliveira, M.; Macarulla, T.; Pérez-Fidalgo, J.A.; Morales-Barrera, R.; Sanchis-García, J.M.; Musib, L.; Budha, N.; et al. A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive AKT-Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of AKT in Patients with Solid Tumors. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 102–113, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0512.
61. Song, M.; Bode, A.M.; Dong, Z.; Lee, M.H. AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1019–1031, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2738.
62. Revathidevi, S.; Munirajan, A.K. Akt in cancer: Mediator and more. *Semin. Cancer Biol.* **2019**, doi:10.1016/j.semcancer.2019.06.002.
63. Hafsi, S.; Pezzino, F.M.; Candido, S.; Ligresti, G.; Spandidos, D.A.; Souza, Z.; McCubrey, J.A.; Travali, S.; Libra, M. Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT

- pathway as a mechanism of drug-resistance (review). *Int. J. Oncol.* **2012**, *40*, 639–644, doi:10.3892/ijo.2011.1312.
64. Brown, J.S.; Banerji, U. Maximising the potential of AKT-Inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *172*, 101–115, doi:10.1016/j.pharmthera.2016.12.001.
65. McCubrey, J.A.; Steelman, L.S.; Abrams, S.L.; Lee, J.T.; Chang, F.; Bertrand, F.E.; Navolanic, P.M.; Terrian, D.M.; Franklin, R.A.; D'Assoro, A.B.; et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv. Enzyme Regul.* **2006**, *46*, 249–279, doi:10.1016/j.advenzreg.2006.01.004.
66. West, K.A.; Castillo, S.S.; Dennis, P.A. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist. Updat.* **2002**, *5*, 234–248, doi:10.1016/S1368-7646(02)00120-6.
67. Gottesman, M.M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627, doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103929.
68. Gremke, N.; Polo, P.; Dort, A.; Schneikert, J.; Elmshäuser, S.; Brehm, C.; Klingmüller, U.; Schmitt, A.; Reinhardt, H.C.; Timofeev, O.; et al. mTOR-mediated cancer drug resistance suppresses autophagy and generates a druggable metabolic vulnerability. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-18504-7.
69. Guerrero-Zotano, A.; Mayer, I.A.; Arteaga, C.L. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* **2016**, *35*, 515–524, doi:10.1007/s10555-016-9637-x.
70. Efeyan, A.; Sabatini, D.M. MTOR and cancer: Many loops in one pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 169–176, doi:10.1016/j.ceb.2009.10.007.
71. Rozengurt, E.; Soares, H.P.; Sinnet-Smith, J. Suppression of Feedback Loops Mediated by PI3K/mTOR Induces Multiple Overactivation of Compensatory Pathways: An Unintended Consequence Leading to Drug Resistance. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 2477–2488, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0330.
72. Uhlenbrock, N.; Smith, S.; Weisner, J.; Landel, I.; Lindemann, M.; Le, T.A.; Hardick, J.; Gontla, R.; Scheinpflug, R.; Czodrowski, P.; et al. Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 3573–3585, doi:10.1039/c8sc05212c.
73. Weisner, J.; Landel, I.; Reintjes, C.; Uhlenbrock, N.; Trajkovic-Arsic, M.; Dienstbier,



- N.; Hardick, J.; Ladigan, S.; Lindemann, M.; Smith, S.; et al. Preclinical efficacy of covalent-allosteric AKT-Inhibitor borussertib in combination with trametinib in KRAS-mutant pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 2367–2378, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2861.
74. Davies, B.R.; Greenwood, H.; Dudley, P.; Crafter, C.; Yu, D.H.; Zhang, J.; Li, J.; Gao, B.; Ji, Q.; Maynard, J.; et al. Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: Pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 873–887, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0824-T.
75. Addie, M.; Ballard, P.; Buttar, D.; Crafter, C.; Currie, G.; Davies, B.R.; Debreczeni, J.; Dry, H.; Dudley, P.; Greenwood, R.; et al. Discovery of 4-amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an orally bioavailable, potent inhibitor of Akt kinases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2059–73, doi:10.1021/jm301762v.
76. Banerji, U.; Dean, E.J.; Alejandro Perez-Fidalgo, J.; Batist, G.; Bedard, P.L.; You, B.; Westin, S.N.; Kabos, P.; Garrett, M.D.; Tall, M.; et al. A phase I open-label study to identify a dosing regimen of the pan-AKT-Inhibitor azd5363 for evaluation in solid tumors and in PIK3CA-mutated breast and gynecologic cancers. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 2050–2059, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2260.
77. Schmid, P.; Abraham, J.; Chan, S.; Wheatley, D.; Brunt, A.M.; Nemsadze, G.; Baird, R.D.; Park, Y.H.; Hall, P.S.; Perren, T.; et al. Capivasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer: The PAKT trial. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 423–433, doi:10.1200/JCO.19.00368.
78. Turner, N.C.; Alarcón, E.; Armstrong, A.C.; Philco, M.; López Chuken, Y.A.; Sablin, M.P.; Tamura, K.; Gómez Villanueva, A.; Pérez-Fidalgo, J.A.; Cheung, S.Y.A.; et al. BEECH: a dose-finding run-in followed by a randomised phase II study assessing the efficacy of AKT-Inhibitor capivasertib (AZD5363) combined with paclitaxel in patients with estrogen receptor-positive advanced or metastatic breast cancer, and in a PIK3CA . *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2019**, *30*, 774–780, doi:10.1093/annonc/mdz086.
79. Jones, R.H.; Casbard, A.; Carucci, M.; Cox, C.; Butler, R.; Alchami, F.; Madden, T.A.; Bale, C.; Bezecny, P.; Joffe, J.; et al. Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-

- positive breast cancer (FAKTION): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 345–357, doi:10.1016/S1470-2045(19)30817-4.
80. Kim, S.-B.; Dent, R.; Im, S.; Espi , M.; Blau, S.; Tan, A.R.; Isakoff, S.J.; Oliveira, M.; Saura, C.; Wongchenko, M.J.; et al. Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1360–1372, doi:10.1016/S1470-2045(17)30450-3.
81. Oliveira, M.; Saura, C.; Nuciforo, P.; Calvo, I.; Andersen, J.; Passos-Coelho, J.L.; Gil Gil, M.; Bermejo, B.; Patt, D.A.; Ciruelos, E.; et al. FAIRLANE, a double-blind placebo-controlled randomized phase II trial of neoadjuvant ipatasertib plus paclitaxel for early triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 1289–1297, doi:https://doi.org/10.1093/annonc/mdz177.
82. De Bono, J.S.; De Giorgi, U.; Rodrigues, D.N.; Massard, C.; Bracarda, S.; Font, A.; Arija, J.A.A.; Shih, K.C.; Radavoi, G.D.; Xu, N.; et al. Randomized phase II study evaluating AKT blockade with ipatasertib, in combination with abiraterone, in patients with metastatic prostate cancer with and without PTEN loss. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 928–936, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0981.
83. Nandan, D.; Zhang, N.; Yu, Y.; Schwartz, B.; Chen, S.; Kima, P.E.; Reiner, N.E. Miransertib (ARQ 092), an orally-available, selective AKT-Inhibitor is effective against *Leishmania*. *PLoS One* **2018**, *13*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0206920.
84. Yu, Y.; Savage, R.E.; Eathiraj, S.; Meade, J.; Wick, M.J.; Hall, T.; Abbadessa, G.; Schwartz, B. Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT pathway with an allosteric AKT-Inhibitor, ARQ 092. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–26, doi:10.1371/journal.pone.0140479.
85. Tolcher, A.; Harb, W.; Sachdev, J.; Papadopoulos, K.; Bordoni, R.; Chai, F.; Larmar, M.; Savage, R.; Abbadessa, G.; Saleh, M. Results from a phase 1 study of ARQ 092, a novel pan AKT-inhibitor, in subjects with advanced solid tumors or recurrent malignant lymphoma. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, S66, doi:10.1016/s0959-8049(16)30201-5.
86. Wang, J.; Chandrasekhar, V.; Abbadessa, G.; Yu, Y.; Schwartz, B.; Kontaridis, M.I. In vivo efficacy of the AKT-Inhibitor ARQ 092 in Noonan Syndrome with Multiple Lentiginos-associated hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0178905.
87. Leoni, C.; Gullo, G.; Resta, N.; Fagotti, A.; Onesimo, R.; Schwartz, B.; Kazakin, J.;

- Abbadessa, G.; Crown, J.; Collins, C.D.; et al. First evidence of a therapeutic effect of miransertib in a teenager with Proteus syndrome and ovarian carcinoma. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2019**, *179*, 1319–1324, doi:10.1002/ajmg.a.61160.
88. Kim, K.; Li, J.; Barazia, A.; Tseng, A.; Youn, S.W.; Abbadessa, G.; Yu, Y.; Schwartz, B.; Andrews, R.K.; Gordeuk, V.R.; et al. ARQ 092, an orally-available, selective AKT-Inhibitor, attenuates neutrophil-platelet interactions in sickle cell disease. *Haematologica* **2017**, *102*, 246–259, doi:10.3324/haematol.2016.151159.
89. Keppler-Noreuil, K.M.; Sapp, J.C.; Lindhurst, M.J.; Darling, T.N.; Burton-Akright, J.; Bagheri, M.; Dombi, E.; Gruber, A.; Jarosinski, P.F.; Martin, S.; et al. Pharmacodynamic Study of Miransertib in Individuals with Proteus Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2019**, *104*, 484–491, doi:10.1016/j.ajhg.2019.01.015.
90. Weisner, J.; Gontla, R.; Van der westhuizen, L.; Oeck, S.; Ketzer, J.; Janning, P.; Richters, A.; Mühlenberg, T.; Fang, Z.; Taher, A.; et al. Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 10313–10316, doi:10.1002/anie.201502142.
91. Hirai, H.; Sootome, H.; Nakatsuru, Y.; Miyama, K.; Taguchi, S.; Tsujioka, K.; Ueno, Y.; Hatch, H.; Majumder, P.K.; Pan, B.-S.; et al. MK-2206, an Allosteric AKT-Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs In vitro and In vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1956–1967, doi:10.1158/1535-7163.mct-09-1012.
92. Doi, T.; Tamura, K.; Tanabe, Y.; Yonemori, K.; Yoshino, T.; Fuse, N.; Kodaira, M.; Bando, H.; Noguchi, K.; Shimamoto, T.; et al. Phase 1 pharmacokinetic study of the oral pan-AKT-Inhibitor MK-2206 in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *76*, 409–416, doi:10.1007/s00280-015-2810-z.
93. Mehnert, J.M.; Kaveney, A.D.; Malhotra, J.; Spencer, K.; Portal, D.; Goodin, S.; Tan, A.R.; Aisner, J.; Moss, R.A.; Lin, H.; et al. A phase I trial of MK-2206 and hydroxychloroquine in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2019**, *84*, 899–907, doi:10.1007/s00280-019-03919-x.
94. Ma, C.X.; Sanchez, C.; Gao, F.; Crowder, R.; Naughton, M.; Pluard, T.; Creekmore, A.; Guo, Z.; Hoog, J.; Lockhart, A.C.; et al. A Phase I Study of the AKT-Inhibitor MK-2206 in Combination with Hormonal Therapy in Postmenopausal Women with Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2650–2658, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2160.

95. Wisinski, K.B.; Tevaarwerk, A.J.; Burkard, M.E.; Rampurwala, M.; Eickhoff, J.; Bell, M.C.; Kolesar, J.M.; Flynn, C.; Liu, G. Phase I Study of an AKT-Inhibitor (MK-2206) Combined with Lapatinib in Adult Solid Tumors Followed by Dose Expansion in Advanced HER2 + Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2659–2667, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2365.
96. Gonzalez-Angulo, A.M.; Krop, I.; Akcakanat, A.; Chen, H.; Liu, S.; Li, Y.; Culotta, K.S.; Tarco, E.; Piha-Paul, S.; Moulder-Thompson, S.; et al. SU2C phase Ib study of paclitaxel and MK-2206 in advanced solid tumors and metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*, 1–9, doi:10.1093/jnci/dju493.
97. Xing, Y.; Lin, N.U.; Maurer, M.A.; Chen, H.; Mahvash, A.; Sahin, A.; Akcakanat, A.; Li, Y.; Abramson, V.; Litton, J.; et al. Phase II trial of AKT-Inhibitor MK-2206 in patients with advanced breast cancer who have tumors with PIK3CA or AKT mutations, and/or PTEN loss/PTEN mutation. *Breast Cancer Res.* **2019**, *21*, 1–12, doi:10.1186/s13058-019-1154-8.
98. Jonasch, E.; Hasanov, E.; Corn, P.G.; Moss, T.; Shaw, K.R.; Stovall, S.; Marcott, V.; Gan, B.; Bird, S.; Wang, X.; et al. A randomized phase 2 study of MK-2206 versus everolimus in refractory renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, 804–808, doi:10.1093/annonc/mdw676.
99. Ma, C.X.; Suman, V.; Goetz, M.P.; Northfelt, D.; Burkard, M.E.; Ademuyiwa, F.; Naughton, M.; Margenthaler, J.; Aft, R.; Gray, R.; et al. A Phase II Trial of Neoadjuvant MK-2206, an AKT-Inhibitor, with Anastrozole in Clinical Stage II or III PIK3CA - Mutant ER-Positive and HER2-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 6823–6832, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1260.
100. Roskoski, R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *417*, 5–10, doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.145.
101. Guo, Y.; Pan, W.; Liu, S.; Shen, Z.; Xu, Y.; Hu, L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp. Ther. Med.* **2020**, 1997–2007, doi:10.3892/etm.2020.8454.
102. Roskoski, R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* **2012**, *66*, 105–143, doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005.
103. Roskoski, R. RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *399*, 313–317, doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.092.
104. Degirmenci, U.; Wang, M.; Hu, J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling

- for Cancer Therapy. *Cells* **2020**, *9*, 198, doi:10.3390/cells9010198.
105. Brietz, A.; Schuch, K.V.; Wangorsch, G.; Lorenz, K.; Dandekar, T. Analyzing ERK 1/2 signalling and targets. *Mol. Biosyst.* **2016**, *12*, 2436–2446, doi:10.1039/c6mb00255b.
106. Lorenz, K.; Schmitt, J.P.; Schmitteckert, E.M.; Lohse, M.J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 75–83, doi:10.1038/nm.1893.
107. Lorenz, K.; Schmitt, J.P.; Vidal, M.; Lohse, M.J. Cardiac hypertrophy: Targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 2351–2355, doi:10.1016/j.biocel.2009.08.002.
108. Hauge, C.; Frödin, M. RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3021–3023, doi:10.1242/jcs.02950.
109. Caunt, C.J.; Keyse, S.M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): Shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.* **2013**, *280*, 489–504, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x.
110. Kondoh, K.; Nishida, E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2007**, *1773*, 1227–1237, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.12.002.
111. Caunt, C.J.; Armstrong, S.P.; Rivers, C.A.; Norman, M.R.; McArdle, C.A. Spatiotemporal Regulation of ERK2 by Dual Specificity Phosphatases. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 26612–26623, doi:10.1074/jbc.M801500200.
112. Mandl, M.; Slack, D.N.; Keyse, S.M. Specific Inactivation and Nuclear Anchoring of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 by the Inducible Dual-Specificity Protein Phosphatase DUSP5. *Society* **2005**, *25*, 1830–1845, doi:10.1128/MCB.25.5.
113. Kidger, A.M.; Rushworth, L.K.; Stellzig, J.; Davidson, J.; Bryant, C.J.; Bayley, C.; Caddy, E.; Rogers, T.; Keyse, S.M.; Caunt, C.J. Dual-specificity phosphatase 5 controls the localized inhibition, propagation, and transforming potential of ERK signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114*, E317–E326, doi:10.1073/pnas.1614684114.
114. Samatar, A.A.; Poulikakos, P.I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: Promises and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 928–942, doi:10.1038/nrd4281.
115. Smorodinsky-Atias, K.; Soudah, N.; Engelberg, D. Mutations That Confer Drug-Resistance, Oncogenicity and Intrinsic Activity on the ERK MAP Kinases—Current State of the Art. *Cells* **2020**, *9*, 129, doi:10.3390/cells9010129.
116. Sebolt-Leopold, J.S. Advances in the development of cancer therapeutics directed

- against the RAS-mitogen-activated protein kinase pathway. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3651–3656, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0333.
117. Varga, A.; Soria, J.-C.; Hollebecque, A.; LoRusso, P.; Bendell, J.; Huang, S.-M.A.; Wagle, M.-C.; Okrah, K.; Liu, L.; Murray, E.; et al. A First-in-Human Phase I Study to Evaluate the ERK1/2 Inhibitor GDC-0994 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 1229–1236, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-2574.
118. Roskoski, R. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.* **2019**, *142*, 151–168, doi:10.1016/j.phrs.2019.01.039.
119. Sullivan, R.J.; Infante, J.R.; Janku, F.; Lee Wong, D.J.; Sosman, J.A.; Keedy, V.; Patel, M.R.; Shapiro, G.I.; Mier, J.W.; Tolcher, A.W.; et al. First-in-class ERK1/2 inhibitor ulixertinib (BVD-523) in patients with MAPK mutant advanced solid tumors: Results of a phase I dose-escalation and expansion study. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 184–195, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-1119.
120. Cheng, Y.; Tian, H. Current development status of MEK inhibitors. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22101551.
121. Menzies, A.M.; Long, G. V. Dabrafenib and Trametinib, alone and in combination for BRAF-Mutant metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2035–2043, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2054.
122. Gilmartin, A.G.; Bleam, M.R.; Groy, A.; Moss, K.G.; Minthorn, E.A.; Kulkarni, S.G.; Rominger, C.M.; Erskine, S.; Fisher, K.E.; Yang, J.; et al. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 989–1000, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2200.
123. Huijberts, S.C.F.A.; van Geel, R.M.J.M.; van Brummelen, E.M.J.; Opdam, F.L.; Marchetti, S.; Steeghs, N.; Pulleman, S.; Thijssen, B.; Rosing, H.; Monkhorst, K.; et al. Phase I study of lapatinib plus trametinib in patients with KRAS-mutant colorectal, non-small cell lung, and pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, *85*, 917–930, doi:10.1007/s00280-020-04066-4.
124. Erba, H.P.; Becker, P.S.; Shami, P.J.; Grunwald, M.R.; Flesher, D.L.; Zhu, M.; Rasmussen, E.; Henary, H.A.; Anderson, A.A.; Wang, E.S. Phase 1b study of the MDM2 inhibitor AMG 232 with or without trametinib in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 1939–1949, doi:10.1182/bloodadvances.2019030916.
125. Michailidou, A.; Trenz, H.-J.; de Wilde, P. Mekinist (Trametinib), SPC. *Eur. Med.*

- Agency* **2019**, doi:10.2307/j.ctvdf0dxq.12.
126. Banks, M.; Crowell, K.; Proctor, A.; Jensen, B.C. Cardiovascular Effects of the MEK Inhibitor, Trametinib: A Case Report, Literature Review, and Consideration of Mechanism. *Cardiovasc. Toxicol.* **2017**, *17*, 487–493, doi:10.1007/s12012-017-9425-z.
127. Patnaik, A.; Tolcher, A.; Papadopoulos, K.P.; Beeram, M.; Rasco, D.; Werner, T.L.; Bauman, J.W.; Scheuber, A.; Cox, D.S.; Patel, B.R.; et al. Phase 1 study to evaluate the effect of the MEK inhibitor trametinib on cardiac repolarization in patients with solid tumours. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *78*, 491–500, doi:10.1007/s00280-016-3090-y.
128. Markham, A.; Keam, S.J. Selumetinib: First Approval. *Drugs* **2020**, *80*, 931–937, doi:10.1007/s40265-020-01331-x.
129. Dombi, E.; Baldwin, A.; Marcus, L.J.; Fisher, M.J.; Weiss, B.; Kim, A.; Whitcomb, P.; Martin, S.; Aschbacher-Smith, L.E.; Rizvi, T.A.; et al. Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1–Related Plexiform Neurofibromas. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 2550–2560, doi:10.1056/NEJMoa1605943.
130. Davies, B.R.; Logie, A.; McKay, J.S.; Martin, P.; Steele, S.; Jenkins, R.; Cockerill, M.; Cartlidge, S.; Smith, P.D. AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 kinases: Mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2209–2219, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0231.
131. Sebolt-Leopold, J.S.; Herrera, R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 937–947, doi:10.1038/nrc1503.
132. Song, H.; Zhang, J.; Ning, L.; Zhang, H.; Chen, D.; Jiao, X.; Zhang, K. The MEK1/2 inhibitor AZD6244 sensitizes braf-mutant thyroid cancer to vemurafenib. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 3002–3010, doi:10.12659/MSM.910084.
133. Banerjee, A.; Jakacki, R.I.; Onar-Thomas, A.; Wu, S.; Nicolaidis, T.; Young Poussaint, T.; Fangusaro, J.; Phillips, J.; Perry, A.; Turner, D.; et al. A phase i trial of the MEK inhibitor selumetinib (AZD6244) in pediatric patients with recurrent or refractory low-grade glioma: A Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC) study. *Neuro. Oncol.* **2017**, *19*, 1135–1144, doi:10.1093/neuonc/now282.
134. Carvajal, R.D.; Piperno-Neumann, S.; Kapiteijn, E.; Chapman, P.B.; Frank, S.; Joshua, A.M.; Piulats, J.M.; Wolter, P.; Cocquyt, V.; Chmielowski, B.; et al. Selumetinib in

- combination with dacarbazine in patients with metastatic uveal melanoma: A Phase III, Multicenter, Randomized Trial (SUMIT). *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 1232–1239, doi:10.1200/JCO.2017.74.1090.
135. Catalanotti, F.; Solit, D.B.; Pulitzer, M.P.; Berger, M.F.; Scott, S.N.; Iyriboz, T.; Lacouture, M.E.; Panageas, K.S.; Wolchok, J.D.; Carvajal, R.D.; et al. Phase II Trial of MEK Inhibitor Selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in Patients with BRAFV600E/K-Mutated Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 2257–2264, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3476.
136. AstraZeneca Pharmaceuticals Kusolugo (Selumetinib), SPC. *Eur. Med. Agency* **2020**.
137. Herrero, A.; Pinto, A.; Colón-Bolea, P.; Casar, B.; Jones, M.; Agudo-Ibáñez, L.; Vidal, R.; Tenbaum, S.P.; Nuciforo, P.; Valdizán, E.M.; et al. Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 170–182, doi:10.1016/j.ccell.2015.07.001.
138. Yang, Y.; Zhou, Y.; Tao, L.; Yang, T.; Zhao, Y.; Luo, Y. Structure–activity relationship study of DEL-22379: ERK dimerization inhibitors with increased safety. *Mol. Divers.* **2020**, doi:10.1007/s11030-020-10088-0.
139. Lee, S.; Bae, Y.S. Monomeric and dimeric models of ERK2 in conjunction with studies on cellular localization, nuclear translocation, and in vitro analysis. *Mol. Cells* **2012**, *33*, 325–334, doi:10.1007/s10059-012-0023-4.
140. Lidke, D.S.; Huang, F.; Post, J.N.; Rieger, B.; Wilsbacher, J.; Thomas, J.L.; Pouysségur, J.; Jovin, T.M.; Lenormand, P. ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 3092–3102, doi:10.1074/jbc.M109.064972.
141. Adachi, M.; Fukuda, M.; Nishida, E. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: Passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J.* **1999**, *18*, 5347–5358, doi:10.1093/emboj/18.19.5347.
142. Tomasovic, A.; Brand, T.; Schanbacher, C.; Kramer, S.; Hümmert, M.W.; Godoy, P.; Schmidt-Heck, W.; Nordbeck, P.; Ludwig, J.; Homann, S.; et al. Interference with ERK-dimerization at the nucleocytosolic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-15505-4.
143. Bhagwat, S. V.; McMillen, W.T.; Cai, S.; Zhao, B.; Whitesell, M.; Shen, W.; Kindler, L.; Flack, R.S.; Wu, W.; Anderson, B.; et al. ERK-Inhibitor LY3214996 targets ERK



- pathway–driven cancers: A therapeutic approach toward precision medicine. *Mol. Cancer Ther.* **2020**, *19*, 325–336, doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0183.
144. Kidger, A.M.; Siphthorp, J.; Cook, S.J. ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *187*, 45–60, doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.007.
145. Blake, J.F.; Burkard, M.; Chan, J.; Chen, H.; Chou, K.-J.; Diaz, D.; Dudley, D.A.; Gaudino, J.J.; Gould, S.E.; Grina, J.; et al. Discovery of (S)-1-(1-(4-Chloro-3-fluorophenyl)-2-hydroxyethyl)-4-(2-((1-methyl-1H-pyrazol-5-yl)amino)pyrimidin-4-yl)pyridin-2(1H)-one (GDC-0994), an Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) Inhibitor in Early Clinical Development. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5650–5660, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00389.
146. Weekes, C.; Lockhart, A.; LoRusso, P.; Murray, E.; Park, E.; Tagen, M.; Singh, J.; Sarkar, I.; Mueller, L.; Dokainish, H.; et al. A Phase Ib Study to Evaluate the MEK Inhibitor Cobimetinib in Combination with the ERK1/2 Inhibitor GDC-0994 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Oncologist* **2020**, theoncologist.2020-0292, doi:10.1634/theoncologist.2020-0292.
147. Morris, E.J.; Jha, S.; Restaino, C.R.; Dayananth, P.; Zhu, H.; Cooper, A.; Carr, D.; Deng, Y.; Jin, W.; Black, S.; et al. Discovery of a novel ERK-Inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 742–750, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0070.
148. Zhou, J.; Zhao, T.; Ma, L.; Liang, M.; Guo, Y.J.; Zhao, L.M. Cucurbitacin B and SCH772984 exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activities by suppressing EGFR, PI3K/Akt/mTOR, STAT3 and ERK signaling. *Oncotarget* **2017**, *8*, 103167–103181, doi:10.18632/oncotarget.21704.
149. Wong, D.J.L.; Robert, L.; Atefi, M.S.; Lassen, A.; Avarappatt, G.; Cerniglia, M.; Avramis, E.; Tsoi, J.; Foulad, D.; Graeber, T.G.; et al. Antitumor activity of the ERK-Inhibitor SCH722984 against BRAF mutant, NRAS mutant and wild-type melanoma. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 1–15, doi:10.1186/1476-4598-13-194.
150. Broutier, L.; Mastrogiovanni, G.; Verstegen, M.M.; Francies, H.E.; Gavarró, L.M.; Bradshaw, C.R.; Allen, G.E.; Arnes-Benito, R.; Sidorova, O.; Gaspersz, M.P.; et al. Human primary liver cancer–derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1424–1435, doi:10.1038/nm.4438.
151. Boga, S.B.; Deng, Y.; Zhu, L.; Nan, Y.; Cooper, A.B.; Shipps, G.W.; Doll, R.; Shih,

- N.Y.; Zhu, H.; Sun, R.; et al. MK-8353: Discovery of an Orally Bioavailable Dual Mechanism ERK-Inhibitor for Oncology. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 761–767, doi:10.1021/acsmchemlett.8b00220.
152. Moschos, S.J.; Sullivan, R.J.; Hwu, W.-J.; Ramanathan, R.K.; Adjei, A.A.; Fong, P.C.; Shapira-Frommer, R.; Tawbi, H.A.; Rubino, J.; Rush, T.S.; et al. Development of MK-8353, an orally administered ERK1/2 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *JCI Insight* **2018**, *3*, doi:10.1172/jci.insight.92352.
153. Germann, U.A.; Furey, B.F.; Markland, W.; Hoover, R.R.; Aronov, A.M.; Roix, J.J.; Hale, M.; Boucher, D.M.; Sorrell, D.A.; Martinez-Botella, G.; et al. Targeting the MAPK Signaling Pathway in Cancer: Promising Preclinical Activity with the Novel Selective ERK1/2 Inhibitor BVD-523 (Ulixertinib). *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 2351–2363, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0456.
154. Ward, R.A.; Colclough, N.; Challinor, M.; Debreczeni, J.E.; Eckersley, K.; Fairley, G.; Feron, L.; Flemington, V.; Graham, M.A.; Greenwood, R.; et al. Structure-Guided Design of Highly Selective and Potent Covalent Inhibitors of ERK1/2. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4790–4801, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00466.
155. Shiojima, I.; Sato, K.; Izumiya, Y.; Schiekofe, S.; Ito, M.; Liao, R.; Colucci, W.S.; Walsh, K. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2108–2118, doi:10.1172/JCI24682.
156. Walsh, K. Akt signaling and growth of the heart. *Circulation* **2006**, *113*, 2032–2034, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.615138.
157. Channine, A.H.; Hajjar, R.J. AKT signalling in the failing heart. *Eur. J. Heart Fail.* **2011**, *13*, 825–829, doi:10.1093/eurjhf/hfr080.
158. Kim, Y.K.; Kim, S.J.; Yatani, A.; Huang, Y.; Castelli, G.; Vatner, D.E.; Liu, J.; Zhang, Q.; Diaz, G.; Zieba, R.; et al. Mechanism of Enhanced Cardiac Function in Mice with Hypertrophy Induced by Overexpressed Akt. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47622–47628, doi:10.1074/jbc.M305909200.
159. Weeks, K.L.; Bernardo, B.C.; Ooi, J.Y.Y.; Patterson, N.L.; McMullen, J.R. The IGF1-PI3K-Akt signaling pathway in mediating exercise-induced cardiac hypertrophy and protection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *1000*, 187–210, doi:10.1007/978-981-10-4304-8\_12.

160. Cook, S.A.; Matsui, T.; Li, N.; Rosenzweig, A. Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22528–22533, doi:10.1074/jbc.M201462200.
161. Wende, A.R.; O’Neill, B.T.; Bugger, H.; Riehle, C.; Tuinei, J.; Buchanan, J.; Tsushima, K.; Wang, L.; Caro, P.; Guo, A.; et al. Enhanced Cardiac Akt/Protein Kinase B Signaling Contributes to Pathological Cardiac Hypertrophy in Part by Impairing Mitochondrial Function via Transcriptional Repression of Mitochondrion-Targeted Nuclear Genes. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 831–846, doi:10.1128/mcb.01109-14.
162. Gallo, S.; Vitacolonna, A.; Bonzano, A.; Comoglio, P.; Crepaldi, T. ERK: A key player in the pathophysiology of cardiac hypertrophy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–21, doi:10.3390/ijms20092164.
163. Ruppert, C.; Deiss, K.; Herrmann, S.; Vidal, M.; Oezkur, M.; Gorski, A.; Weidemann, F.; Lohse, M.J.; Lorenz, K. Interference with ERKThr188 phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 7440–7445, doi:10.1073/pnas.1221999110.
164. Laverty, H.G.; Benson, C.; Cartwright, E.J.; Cross, M.J.; Garland, C.; Hammond, T.; Holloway, C.; McMahon, N.; Milligan, J.; Park, B.K.; et al. How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines? *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 675–693, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01255.x.
165. Takasuna, K.; Asakura, K.; Araki, S.; Ando, H.; Kazusa, K.; Kitaguchi, T.; Kunimatsu, T.; Suzuki, S.; Miyamoto, N. Comprehensive in vitro cardiac safety assessment using human stem cell technology: Overview of CSAHi HEART initiative. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2017**, *83*, 42–54, doi:10.1016/j.vascn.2016.09.004.
166. CiPA-Project Available online: <https://cipaproject.org> (accessed on Nov 22, 2020).
167. Li, X.; Zhang, R.; Zhao, B.; Lossin, C.; Cao, Z. Cardiotoxicity screening: a review of rapid-throughput in vitro approaches. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 1803–1816, doi:10.1007/s00204-015-1651-1.
168. Jiang, B.; Zhang, L.; Wang, Y.; Li, M.; Wu, W.; Guan, S.; Liu, X.; Yang, M.; Wang, J.; Guo, D. Tanshinone IIA sodium sulfonate protects against cardiotoxicity induced by doxorubicin in vitro and in vivo. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1538–1544, doi:10.1016/j.fct.2009.03.038.
169. Li, Y.; Ju, L.; Hou, Z.; Deng, H.; Zhang, Z.; Wang, L.; Yang, Z.; Yin, J.; Zhang, Y. Screening, verification, and optimization of biomarkers for early prediction of

- cardiotoxicity based on metabolomics. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 2437–2445, doi:10.1021/pr501116c.
170. Jensen, B.C.; Parry, T.L.; Huang, W.; Ilaiwy, A.; Bain, J.R.; Muehlbauer, M.J.; O’Neal, S.K.; Patterson, C.; Johnson, G.L.; Willis, M.S. Non-targeted metabolomics analysis of the effects of tyrosine kinase inhibitors sunitinib and erlotinib on heart, muscle, liver and serum metabolism in vivo. *Metabolites* **2017**, *7*, doi:10.3390/metabo7030031.
171. Jensen, B.C.; Parry, T.L.; Huang, W.; Beak, J.Y.; Ilaiwy, A.; Bain, J.R.; Newgard, C.B.; Muehlbauer, M.J.; Patterson, C.; Johnson, G.L.; et al. Effects of the kinase inhibitor sorafenib on heart, muscle, liver and plasma metabolism in vivo using non-targeted metabolomics analysis. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 4797–4811, doi:10.1111/bph.14062.
172. Peters, M.F.; Lamore, S.D.; Guo, L.; Scott, C.W.; Kolaja, K.L. Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Cellular Impedance Assays: Bringing Cardiotoxicity Screening to the Front Line. *Cardiovasc. Toxicol.* **2015**, *15*, 127–139, doi:10.1007/s12012-014-9268-9.
173. Peters, M.F.; Scott, C.W.; Ochalski, R.; Dragan, Y.P. Evaluation of cellular impedance measures of cardiomyocyte cultures for drug screening applications. *Assay Drug Dev. Technol.* **2012**, *10*, 525–532, doi:10.1089/adt.2011.442.
174. Lamore, S.D.; Kamendi, H.W.; Scott, C.W.; Dragan, Y.P.; Peters, M.F. Cellular impedance assays for predictive preclinical drug screening of kinase inhibitor cardiovascular toxicity. *Toxicol. Sci.* **2013**, *135*, 402–413, doi:10.1093/toxsci/kft167.
175. Doerr, L.; Thomas, U.; Guinot, D.R.; Bot, C.T.; Stoelzle-Feix, S.; Beckler, M.; George, M.; Fertig, N. New Easy-to-Use Hybrid System for Extracellular Potential and Impedance Recordings. *J. Lab. Autom.* **2015**, *20*, 175–188, doi:10.1177/2211068214562832.
176. Çetin, I.; Topçul, M.R. Evaluation of the cytotoxic effect of Ly2109761 on HeLa cells using the xCELLigence RTCA system. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 683–687, doi:10.3892/ol.2018.9556.
177. Kho, D.; MacDonald, C.; Johnson, R.; Unsworth, C.P.; O’Carroll, S.J.; du Mez, E.; Angel, C.E.; Graham, E.S. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors* **2015**, *5*, 199–222, doi:10.3390/bios5020199.
178. Chiu, C.H.; Lei, K.F.; Yeh, W.L.; Chen, P.; Chan, Y.S.; Hsu, K.Y.; Chen, A.C.Y.

- Comparison between xCELLigence biosensor technology and conventional cell culture system for real-time monitoring human tenocytes proliferation and drugs cytotoxicity screening. *J. Orthop. Surg. Res.* **2017**, *12*, 1–13, doi:10.1186/s13018-017-0652-6.
179. Bot, C.T.; Juhasz, K.; Haeusermann, F.; Polonchuk, L.; Traebert, M.; Stoelzle-Feix, S. Cross - site comparison of excitation-contraction coupling using impedance and field potential recordings in hiPSC cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2018**, *93*, 46–58, doi:10.1016/j.vascn.2018.06.006.
180. Obergrussberger, A.; Juhasz, K.; Thomas, U.; Stölzle-Feix, S.; Becker, N.; Dörr, L.; Beckler, M.; Bot, C.; George, M.; Fertig, N. Safety pharmacology studies using EFP and impedance. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2016**, *81*, 223–232, doi:10.1016/j.vascn.2016.04.006.
181. Giaever, I.; Keese, C.R. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7896–7900, doi:10.1073/pnas.88.17.7896.
182. Melzer, S.; Nunes, C.S.M.; Endringer, D.C.; de Andrade, T.U.; Tarnok, A.; Lenz, D. Trypan blue as an affordable marker for automated live-dead cell analysis in image cytometry. *Scanning* **2016**, *38*, 857–863, doi:10.1002/sca.21335.
183. Burnette, W.N. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **1981**, *112*, 195–203, doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5.
184. Legocki, R.P.; Verma, D.P. Multiple immunoreplica Technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **1981**, *111*, 385–92, doi:10.1016/0003-2697(81)90577-7.
185. Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 1473–8, doi:10.1083/jcb.105.4.1473.
186. Mazia, D.; Schatten, G.; Sale, W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J. Cell Biol.* **1975**, *66*, 198–200, doi:10.1083/jcb.66.1.198.
187. Mason, J.T.; O’Leary, T.J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J. Histochem. Cytochem.* **1991**, *39*, 225–9, doi:10.1177/39.2.1987266.
188. Van Tonder, A.; Joubert, A.M.; Cromarty, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when

- compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res. Notes* **2015**, *8*, 1–10, doi:10.1186/s13104-015-1000-8.
189. Limonciel, A.; Aschauer, L.; Wilmes, A.; Prajczek, S.; Leonard, M.O.; Pfaller, W.; Jennings, P. Lactate is an ideal non-invasive marker for evaluating temporal alterations in cell stress and toxicity in repeat dose testing regimes. *Toxicol. Vitro*. **2011**, *25*, 1855–1862, doi:10.1016/j.tiv.2011.05.018.
190. U.S. Food and Drug Administration U.S. Food & Drug Administration Database Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs Available online: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm> (accessed on Mar 6, 2021).
191. Criscione, L.; de Gasparo, M.; Bühlmyer, P.; Whitebread, S.; Ramjoué, H.R.; Wood, J. Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT1-receptor subtype. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *110*, 761–771, doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13877.x.
192. Warner, G.T.; Perry, C.M. Ramipril: a review of its use in the prevention of cardiovascular outcomes. *Drugs* **2002**, *62*, 1381–405, doi:10.2165/00003495-200262090-00016.
193. Grassi, G.; Cattaneo, B.M.; Seravalle, G.; Lanfranchi, A.; Pozzi, M.; Morganti, A.; Carugo, S.; Mancina, G. Effects of Chronic ACE Inhibition on Sympathetic Nerve Traffic and Baroreflex Control of Circulation in Heart Failure. *Circulation* **1997**, *96*, 1173–1179, doi:10.1161/01.CIR.96.4.1173.
194. Muneer, K.; Nair, A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and receptor blockers in heart failure and chronic kidney disease – Demystifying controversies. *Indian Heart J.* **2017**, *69*, 371–374, doi:10.1016/j.ihj.2016.08.007.
195. Bansal, N.; Adams, M.J.; Ganatra, S.; Colan, S.D.; Aggarwal, S.; Steiner, R.; Amdani, S.; Lipshultz, E.R.; Lipshultz, S.E. Strategies to prevent anthracycline-induced cardiotoxicity in cancer survivors. *Cardio-Oncology* **2019**, *5*, 1–22, doi:10.1186/s40959-019-0054-5.
196. Baker, K.M.; Booz, G.W.; Dostal, D.E. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu. Rev. Physiol.* **1992**, *54*, 227–241, doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.001303.
197. Infante, J.R.; Fecher, L.A.; Falchook, G.S.; Nallapareddy, S.; Gordon, M.S.; Becerra, C.; DeMarini, D.J.; Cox, D.S.; Xu, Y.; Morris, S.R.; et al. Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1

- dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 773–781, doi:10.1016/S1470-2045(12)70270-X.
198. Müller, P.; Cohen, T.; de Gasparo, M.; Sioufi, A.; Bacine-Poon, A.; Howald, H. Angiotensin II receptor blockade with single doses of valsartan in healthy, normotensive subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *47*, 231–245, doi:10.1007/BF02570503.
199. Todd, P.A.; Benfield, P. Ramipril. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in cardiovascular disorders. *Drugs* **1990**, *39*, 110–135, doi:10.2165/00003495-199039010-00009.
200. UK Government. Ramipril, UK SPC. *Med. Healthc. Prod. Regul. Agency* **2018**.
201. UK Government. Valsartan, UK SPC. *Med. Healthc. Prod. Regul. Agency* **2017**.
202. UK Government. Doxorubicin, UK SPC. *Med. Healthc. Prod. Regul. Agency* **2012**.
203. Wojtukiewicz, M.Z.; Omyła, J.; Kozłowski, L.; Szynaka, B. Cardiotoxicity of anthracycline. *Postpy Hig. i Med. doświadczalnej* **2000**, *54*, 467–485, doi:10.3389/fcvm.2020.00026.
204. Orphanos, G.S.; Ioannidis, G.N.; Ardavanis, A.G. Cardiotoxicity induced by tyrosine kinase inhibitors. *Acta Oncol. (Madr.)* **2009**, *48*, 964–970, doi:10.1080/02841860903229124.
205. Watkins, S.J.; Borthwick, G.M.; Arthur, H.M. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **2011**, *47*, 125–131, doi:10.1007/s11626-010-9368-1.
206. Kuznetsov, A. V.; Javadov, S.; Sickinger, S.; Frotschnig, S.; Grimm, M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2015**, *1853*, 276–284, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.015.
207. Meredith, A.M.; Dass, C.R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* **2016**, *68*, 729–741, doi:10.1111/jphp.12539.
208. Asphahani, F.; Zhang, M. Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection. *Analyst* **2007**, *132*, 835, doi:10.1039/b704513a.
209. Stefanowicz-Hajduk, J.; Ochocka, J.R. Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: Usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. *Toxicol. Reports* **2020**, *7*, 335–344, doi:10.1016/j.toxrep.2020.02.002.
210. Zhou, D.; So, K.; Dymond, A.W.; Vik, T.; Al-Huniti, N.; Mariani, G.; Zorenyi, G.;

- Huang, Y.; Holmes, V.; Severin, P.; et al. Evaluation of the Effect of Selumetinib on Cardiac Repolarization: A Randomized, Placebo- and Positive-controlled Crossover QT/QTc Study in Healthy Subjects. *Clin. Ther.* **2016**, *38*, 2555–2566, doi:10.1016/j.clinthera.2016.10.004.
211. Saleh, M.; Papadopoulos, K.; Arabnia, A.; Patnaik, A.; Stein, R.M.; Chai, F.; Lamar, M.; Savage, R.; Abbadessa, G.; Tolcher, A. First-in-human study with ARQ 092, a novel pan AKT-inhibitor, in subjects with advanced solid tumors or recurrent malignant lymphoma. *Eur. J. Cancer* **2014**, *50*, 104, doi:10.1016/S0959-8049(14)70446-0.
212. Nakamura, M.; Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* **2018**, *15*, 387–407, doi:10.1038/s41569-018-0007-y.
213. Thomas, W.G.; Brandenburger, Y.; Autelitano, D.J.; Pham, T.; Qian, H.; Hannan, R.D. Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ. Res.* **2002**, *90*, 135–142, doi:10.1161/hh0202.104109.
214. Vidal, M.; Wieland, T.; Lohse, M.J.; Lorenz, K.  $\beta$ -Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a G $\beta\gamma$ /Erk-dependent pathway. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *96*, 255–264, doi:10.1093/cvr/cvs249.
215. Abassi, Y.A.; Xi, B.; Li, N.; Ouyang, W.; Seiler, A.; Watzele, M.; Kettenhofen, R.; Bohlen, H.; Ehlich, A.; Kolossov, E.; et al. Dynamic monitoring of beating periodicity of stem cell-derived cardiomyocytes as a predictive tool for preclinical safety assessment. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 1424–1441, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01623.x.
216. Bhagwat, S. V.; McMillen, W.T.; Cai, S.; Zhao, B.; Whitesell, M.; Kindler, L.; Flack, R.S.; Wu, W.; Huss, K.; Anderson, B.; et al. Abstract 4973: Discovery of LY3214996, a selective and novel ERK1/2 inhibitor with potent antitumor activities in cancer models with MAPK pathway alterations. In Proceedings of the Experimental and Molecular Therapeutics; American Association for Cancer Research, 2017; pp. 4973–4973.
217. Kerkelä, R.; Grazette, L.; Yacobi, R.; Iliescu, C.; Patten, R.; Beahm, C.; Walters, B.; Shevtsov, S.; Pesant, S.; Clubb, F.J.; et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 908–916, doi:10.1038/nm1446.
218. Ardiana, F.; Suciati; Indrayanto, G. Valsartan. *Profiles Drug Subst. Excipients Relat. Methodol.* **2015**, *40*, 431–493, doi:10.1016/bs.podrm.2015.01.004.



219. Cheng, J.; Colledge, M.; Hospital, W. Sacubitril/Valsartan (Entresto) for Heart Failure. *STEPS New Drug Rev.* **2016**.
220. Wood, J.M.; Schnell, C.R.; Levens, N.R. Kidney is an important target for the antihypertensive action of an angiotensin II receptor antagonist in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **1993**, *21*, 1056–61, doi:10.1161/01.hyp.21.6.1056.
221. Stepanenko, A.A.; Dmitrenko, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* **2015**, *574*, 193–203, doi:10.1016/j.gene.2015.08.009.
222. Stoelzle-feix, S.; Juhasz, K.; Thomas, U.; Linder, P.; George, M.; Gossman, M. Higher throughput in vitro cardiac contractility recordings under physiological mechanical conditions. **2016**.
223. Goßmann, M.; Linder, P.; Thomas, U.; Juhasz, K.; Lemme, M.; George, M.; Fertig, N.; Dragicevic, E.; Stoelzle-Feix, S. Integration of mechanical conditioning into a high throughput contractility assay for cardiac safety assessment. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2020**, *105*, 106892, doi:10.1016/j.vascn.2020.106892.
224. Brodehl, A.; Ebbinghaus, H.; Deutsch, M.A.; Gummert, J.; Gärtner, A.; Ratnavadivel, S.; Milting, H. Human induced pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes as models for genetic cardiomyopathies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20184381.
225. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, doi:10.1038/nrc969.
226. Kostaras, E.; Kaserer, T.; Lazaro, G.; Heuss, S.F.; Hussain, A.; Casado, P.; Hayes, A.; Yandim, C.; Palaskas, N.; Yu, Y.; et al. A systematic molecular and pharmacologic evaluation of AKT-Inhibitors reveals new insight into their biological activity. *Br. J. Cancer* **2020**, *123*, 542–555, doi:10.1038/s41416-020-0889-4.
227. Quambusch, L.; Landel, I.; Depta, L.; Weisner, J.; Uhlenbrock, N.; Müller, M.P.; Glanemann, F.; Althoff, K.; Siveke, J.T.; Rauh, D. Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58*, 18823–18829, doi:10.1002/anie.201909857.
228. Grandi, E.; Ripplinger, C.M. Antiarrhythmic mechanisms of beta blocker therapy. *Pharmacol. Res.* **2019**, *146*, 104274, doi:10.1016/j.phrs.2019.104274.
229. Sun, L.; Huang, Y.; Liu, Y.; Zhao, Y.; He, X.; Zhang, L.; Wang, F.; Zhang, Y. Ipatasertib, a novel AKT-Inhibitor, induces transcription factor FoxO3a and NF-κB directly

- regulates PUMA-dependent apoptosis. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41419-018-0943-9.
230. Lin, J.; Sampath, D.; Nannini, M.A.; Lee, B.B.; Degtyarev, M.; Oeh, J.; Savage, H.; Guan, Z.; Hong, R.; Kassees, R.; et al. Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective AKT-Inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1760–1772, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3072.
231. Hammer, K.P.; Ljubojevic, S.; Ripplinger, C.M.; Pieske, B.M.; Bers, D.M. Cardiac myocyte alternans in intact heart: Influence of cell–cell coupling and  $\beta$ -adrenergic stimulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *84*, 1–9, doi:10.1016/j.yjmcc.2015.03.012.
232. Matkovich, S.J.; Diwan, A.; Klanke, J.L.; Hammer, D.J.; Marreez, Y.; Odley, A.M.; Brunskill, E.W.; Koch, W.J.; Schwartz, R.J.; Dorn, G.W. Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and  $\beta$ -adrenergic signaling. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 996–1003, doi:10.1161/01.RES.0000247932.71270.2c.
233. Homcy, C.J.; Vatner, S.F.; Vatner, D.E.  $\beta$ -Adrenergic receptor regulation in the heart in pathophysiologic states: Abnormal adrenergic responsiveness in cardiac disease. *Annu. Rev. Physiol.* **1991**, *53*, 137–159, doi:10.1146/annurev.ph.53.030191.001033.
234. Strittmatter, F.; Walther, S.; Roosen, A.; Rutz, B.; Schlenker, B.; Limmer, S.; Waidelich, R.; Stief, C.G.; Gratzke, C.; Hennenberg, M. Activation of protein kinase B/Akt by  $\alpha$ 1-adrenoceptors in the human prostate. *Life Sci.* **2012**, *90*, 446–453, doi:10.1016/j.lfs.2012.01.002.
235. Li, H.; Li, K.; Xing, Y.; Tang, X.; Yang, D.; Dai, X.; Lu, D.; Wang, H. Phenylephrine Attenuated Sepsis-Induced Cardiac Inflammation and Mitochondrial Injury Through an Effect on the PI3K/Akt Signaling Pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2019**, *73*, 186–194, doi:10.1097/FJC.0000000000000651.
236. Wang, Y. Mitogen-Activated Protein Kinases in Heart Development and Diseases. *Circulation* **2007**, *116*, 1413–1423, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589.
237. Gao, L.; Yao, R.; Liu, Y.; Wang, Z.; Huang, Z.; Du, B.; Zhang, D.; Wu, L.; Xiao, L.; Zhang, Y. Isorhamnetin protects against cardiac hypertrophy through blocking PI3K–AKT pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **2017**, *429*, 167–177, doi:10.1007/s11010-017-2944-x.
238. Wortzel, I.; Seger, R. The ERK cascade: Distinct functions within various subcellular organelles. *Genes and Cancer* **2011**, *2*, 195–209, doi:10.1177/1947601911407328.

## 7 Anhang

### Danksagung

Im Verlauf meiner Arbeit erhielt ich eine Menge fachliche und mentale Unterstützung, für die ich mich hier bedanken möchte.

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Kristina Lorenz für die Möglichkeit, an verschiedenen, spannenden Projekten arbeiten, verschiedenste Methoden lernen und meine Doktorarbeit unter ihrer Führung durchführen zu können.

Insbesondere danke ich Dr. Christoph Senges für die hervorragende mentale und fachliche Unterstützung, die mir durch die schwierigsten Abschnitte meiner Doktorarbeit geholfen hat.

Ich möchte mich bei meinen Kollegen in Dortmund und Würzburg für die viele technische und organisatorische Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt Edeltraut Hoffmann-Posorske, Ann-Katrin Weiß und Jonas Bodmann, die mich im Labor hervorragend unterstützt haben und auch außerhalb des Labors immer für ein angenehmes Betriebsklima gesorgt haben. Zusätzlicher Dank gilt Julia Fender, Katja Merches, Stefan Schraml und Nadine Yurdagül-Hemrich für die Unterstützung im Labor, um meine Messungen auch unter Zeitdruck rechtzeitig zu beenden.

Ich danke dem Covid19 Corona-Virus dafür, alle Formen der Freizeitgestaltung unterbunden zu haben, sodass ich mich ausschließlich und dauerhaft auf meine Arbeit konzentrieren konnte.

Schließlich möchte ich mich bei der Gruppe von Prof. Rauh dafür bedanken, den Inhibitor Borussertib für uns hergestellt und zur Verfügung gestellt zu haben.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des/r Doktoranden/in

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des/r Doktoranden/in

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „**Kardiotoxische Effekte von Chemotherapeutika – Evaluierung eines impedanzbasierten *in vitro* Testsystems und Bestimmung der Kardiotoxizität niedermolekularer Kinaseinhibitoren**“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von **Bettina Tanitha Baumgarten** befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen