

Aus dem
CharitéCentrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Endres

Habilitationsschrift

Zelltod- und Präventionsmechanismen Zytostatika- induzierter Neurotoxizität im peripheren und zentralen Nervensystem

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Petra Hühnchen

geboren in Pirna

Eingereicht:	August 2020
Dekan:	Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Helmar Lehmann
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
EINLEITUNG	4
1 Beschreibung des medizinischen Problems	4
2 Zusammenfassung des bisherigen Erkenntnisstands	6
3 Zielstellungen der Arbeit	9
EIGENE ARBEITEN	11
1 Zelltodmechanismen Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im PNS	11
1.1 Der Einfluss einer Inhibition des transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 Ionenkanals (TRPV4) auf die Paclitaxel-induzierte Neuropathie	11
1.2 Neuroprotektive Strategien der Suramin-induzierten Neuropathie.....	25
2 Die Relevanz einer sekundären Neuro-Immun-Interaktion in der Pathogenese Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im PNS	42
2.1 Die Rolle des Interleukin-6 Signalwegs bei der Entstehung der Paclitaxel-induzierten Neuropathie	42
3 Gemeinsame funktionelle Endpunkte Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im ZNS im Mausmodell und Menschen	57
3.1 Präklinische Evidenz für eine neue präventive Therapie von Paclitaxel-induzierten kognitiven Defiziten	57
3.2 Der Einfluss von Bortezomib in therapeutischen Dosierungen auf verschiedene kognitive Funktionen beim Menschen und der Maus	70
DISKUSSION	79
1 Substanzübergreifende Zelltodmechanismen Zytostatika-induzierter Neurotoxizität	79
1.1 Ca ²⁺ und TRPV4	79
1.2 Ca ²⁺ und spannungs-aktivierte Ca ²⁺ Kanäle (VGCC)	80
1.3 Ca ²⁺ und Interleukin-6 (IL-6)	81
2 Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im peripheren und zentralen Nervensystem	83
3 Gemeinsame Schlüsselproteine der Zytostatika-induzierten Neurotoxizität und Tumorbilogie	84
ZUSAMMENFASSUNG	86
LITERATURANGABEN	87
DANKSAGUNG	91
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BTZ	Bortezomib
Ca ²⁺	Calcium
CIN	Chemotherapie-induzierte Neuropathie
CNO	Clozapin-N-Oxid
DREADD	engl. <i>designer receptor exclusively activated by designer drugs</i>
DRGN	engl. <i>dorsal root ganglia neurons</i> (Spinalganglienneurone)
ER	endoplasmatisches Retikulum
IL-6	Interleukin-6
InsP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphatrezeptor
Li ⁺	Lithium
NCS-1	Neuronaler Calcium Sensor 1
NSC	engl. <i>neural stem cells</i> (neurale Stammzellen)
OATP	organischer Anionentransporterprotein
PCCI	engl. <i>post-chemotherapy cognitive impairment</i> (kognitive Störungen nach Chemotherapie)
PNS	peripheres Nervensystem
PTX	Paclitaxel
TAVAB	Studie ‚Therapie Antikörper-vermittelter autoimmuner Erkrankungen mit Bortezomib‘
TRPV4	engl. <i>transient receptor potential cation channel subfamily V member 4</i>
VGCC	engl. <i>voltage-gated calcium channels</i> (spannungs-aktivierte Calciumkanäle)
VEH	Vehikel (Lösungsmittel)
ZNS	zentrales Nervensystem

EINLEITUNG

1 Beschreibung des medizinischen Problems

Nach den Unterlagen des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts wurden 2016 482.500 Patientinnen und Patienten allein in Deutschland mit einer onkologischen Erkrankung erstdiagnostiziert. Damit zählen maligne Tumorerkrankungen zu den häufigsten Todesursachen bei Frauen (22%) und Männern (28%) gleichermaßen [1]. Für viele dieser Patienten stellt die Behandlung mit zytotoxischen Medikamenten einen entscheidenden Teil ihrer Therapie dar. Die durchschnittliche Überlebensrate von Patientinnen und Patienten mit malignen Tumorerkrankungen erhöhte sich zwischen 1977 und 2009 drastisch (49% vs. 68%), weshalb (persistierende) Nebenwirkungen einer Zytostatikabehandlung mittlerweile zu den wichtigsten Komplikationen von Tumortherapien zählen und ein ungelöstes medizinisches Problem darstellen [2]. Mit einer Prävalenz von 0,5% der Gesamtbevölkerung zählen neurologische Folgeerkrankungen zu den häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen einer zytotoxischen Therapie [3] und sind damit häufiger als beispielsweise das idiopathische Parkinsonsyndrom oder die Multiple Sklerose. Sie tragen entscheidend zu einer weiteren Abnahme der Lebensqualität von Tumorpatienten bei und stellen einen der wichtigsten Gründe für prognoserelevante Therapielimitierungen dar. Gegenwärtig existieren keine kausalen Therapieoptionen und symptomatische Behandlungen sind oft unbefriedigend.

Die Entwicklung einer *Chemotherapie-induzierten Neuropathie* (CIN) stellt eine gut beschriebene unerwünschte Folgeerkrankung des peripheren Nervensystems (PNS) dar, welche in ihrer Pathophysiologie jedoch weiterhin nur unzureichend verstanden ist. Die betroffenen Patienten leiden unter Hyp-, Par- und Dysästhesien, Feinmotorikstörungen, Gangstörungen/ Ataxie und neuropathischen Schmerzen.

Besonders letztere sind oftmals nur unzureichend mit etablierten Schmerzmedikamenten behandelbar [4]. Obwohl die CIN zumeist durch eine sensorische axonale Neuropathie gekennzeichnet ist, können auch Schäden an den motorischen Fasern auftreten (zusammengefasst in [5]). Während einige Patienten eine Besserung ihrer Symptome nach Beendigung der Chemotherapie erfahren, berichten viele Patienten von persistierenden Symptomen einer (small fibre) Neuropathie, zumeist Parästhesien und Schmerzen, auch noch mehrere Jahre nach Therapiebeendigung [6]. Bislang sind nur wenige Prognosefaktoren für die Entwicklung einer CIN wie eine vorbestehende Neuropathie, Diabetes mellitus oder eine Niereninsuffizienz bekannt [7]. Eine zuverlässige Vorhersage, welche Patienten eine CIN entwickeln und von welchem Schweregrad, ist gegenwärtig jedoch noch nicht möglich. Trotz der hohen klinischen Relevanz dieses Krankheitsbildes – je nach appliziertem Zytostatikum können bis zu 90% der Patienten betroffen sein – werden vergleichsweise wenig Forschungsanstrengungen aufgewandt um die pathophysiologischen Grundlagen besser zu verstehen. Bislang sind die zugrundeliegenden Mechanismen, warum zytotoxische Substanzen ausgerechnet post-mitotische Nervenzellen schädigen, nur unzureichend verstanden. Es wird jedoch deutlich, dass sich für viele Zytostatika die Pathomechanismen der Neurotoxizität vom primären Wirkmechanismus der Substanzen unterscheiden, was eine Neuroprotektion bei gleichzeitigem Erhalt der antineoplastischen Wirkung ermöglicht.

Im Gegensatz zur CIN sind Veränderungen der kognitiven Funktionen nach Chemotherapie (*post-chemotherapy cognitive impairment (PCCI)*) – in der Laienpresse oft als ‚Chemobrain‘ oder ‚Chemodemenz‘ bezeichnet – eher diffus und erst in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Betroffene Patientinnen und Patienten mit PCCI beklagen häufig eine Abnahme ihrer verbalen und visuo-konstruktiven Fähigkeiten, der Konzentration,

Aufmerksamkeit und Informationsverarbeitungsgeschwindigkeit (zusammengefasst in [8]). Im Gegensatz zum PNS, ist das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke vor Noxen geschützt. Jedoch wurde PCCI auch bei Patienten beschrieben, welche eine Chemotherapie mit schlechter Blut-Hirn-Schrankenpenetranz erhielten [9]. Bis zu 50% der Patienten schildern Störungen der kognitiven Funktionen in zeitlichem Zusammenhang zur Chemotherapie [10]. Verschiedene Metaanalysen bestätigen, dass vor allem die Domänen des verbalen und visuo-konstruktiven Gedächtnisses betroffen sind [11, 12], die beide stark von der funktionellen Integrität des Hippocampus abhängen. Jedoch weisen die klinischen Daten eine große Heterogenität auf, die auf verschiedene Faktoren zurückzuführen ist: 1) unzureichender Ausschluss von konkurrierenden Einflussfaktoren, 2) die Verwendung von uneinheitlichen neuropsychologischen Testverfahren und 3) Fehlen von adäquaten Kontrollgruppen (zusammengefasst in [8]). Dennoch zeigen unter anderem auch radiologische Studien, dass eine neurobiologische Grundlage für PCCI wahrscheinlich ist und dass es sich nicht nur um ein Epiphänomen der Tumorerkrankung handelt [13, 14].

Für eine Vielzahl von neurologischen Erkrankungen wie z.B. dem ischämischen Schlaganfall oder der Alzheimer Demenz ist bislang die Translation neuroprotektiver Strategien von der Präklinik zur Klinik aufgrund des nicht vorsehbaren Schädigungszeitpunktes weitestgehend gescheitert. Im Gegensatz zu diesen Erkrankungen ist dieser bei der Zytostatika-induzierten Neurotoxizität jedoch klar definiert, was einen entscheidenden Vorteil bei der Entwicklung und Anwendung neuroprotektiver Verfahren darstellt.

2 Zusammenfassung des bisherigen Erkenntnisstands

Die Pathomechanismen der Neurotoxizität unterscheiden sich zwischen den zytotoxischen Substanzen. Paclitaxel (PTX) ist ein das Tubulin-Zytoskelett-

stabilisierendes Agens, welches sehr häufig in der Behandlung solider Tumore wie dem Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und weiteren eingesetzt wird [15]. Für die Paclitaxel-induzierte *Neuropathie* konnte bislang nachgewiesen werden, dass nanomolare Konzentrationen von Paclitaxel in neuronalen Zellen innerhalb von Sekunden zu einer positiven Modulation des Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptors (InsP₃R) durch das Neuronale Calcium Sensor 1-Protein (NCS-1) führen, welche einen Calciumausstrom (Ca²⁺) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytosol bewirkt [16, 17]. Der Anstieg des zytosolischen Ca²⁺ führt zur Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Protease Calpain, welche zum einen über die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3/7 klassische intrazelluläre Apoptosemechanismen anstößt und zum anderen zum Abbau von NCS-1 führt [18]. Nachfolgend konnte demonstriert werden, dass Lithiumionen (Li⁺) spezifisch die durch Paclitaxel induzierte Interaktion des NCS-1 mit dem InsP₃R unterbinden und so die Entstehung einer Paclitaxel-induzierten Neuropathie im Zellkultur- und Tiermodell verhindern können [19, 20].

Der intrazellulären Signalkaskade vorangeschaltet ist die Passage von Paclitaxel über die Zellmembran Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Trotz der lipophilen Eigenschaften des Paclitaxel konnte belegt werden, dass der Transport von Paclitaxel über die Zellmembran über organische Anionentransporterpolypeptide (OATP) stattfindet und eine genetische Defizienz von OATP1B2 im knockout-Tiermodell die Entstehung der Paclitaxel-induzierten Neuropathie unterbindet. Gleiches konnte über eine spezifische Inhibition dieses Transporters mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Nilotinib erreicht werden [21]. Den direkten intrazellulären Apoptosemechanismen nachgeschaltet scheinen zudem sekundäre Immunreaktionen entscheidend zur Paclitaxel-induzierten Neuropathie beizutragen: so konnte gezeigt werden, dass es ca.

14 Tage nach Paclitaxelexposition zu einer über den Toll-like-Rezeptor 4-vermittelten Makrophageninfiltration der Spinalganglien kommt [22].

Im Gegensatz zu den Pathomechanismen im PNS, ist bislang sehr wenig bekannt, was die pathophysiologischen Grundlagen zur Entstehung von *kognitiven Defiziten* nach Chemotherapie im zentralen Nervensystem (ZNS) angeht. Verschiedene Mechanismen werden als pathophysiologisch relevant diskutiert: 1) genetische Mutationen z.B. im Apolipoprotein E oder Transportproteinen wie dem p-Glykoprotein, 2) DNA Schädigung durch oxidativen Stress, 3) inflammatorisch/ immunologische Reaktionen mit Freisetzung von (proinflammatorischen) Zytokinen, 4) hormonelle Einflüsse z.B. durch Östrogenmangel, 5) Reduktion der endogenen adulten hippocampalen Neurogenese (zusammengefasst von [23]). Wenn man die klinische Präsentation Chemotherapie-induzierter kognitiver Defizite mit einer vorrangig reduzierten verbalen und visuo-konstruktiven Gedächtnisleistung – beides Hippocampus-vermittelte Funktionen – und zudem Ergebnisse radiologischer Studien [24] in Betracht zieht, stellen Störungen der adulten hippocampalen Neurogenese als zugrundeliegender Pathomechanismus eine interessante Hypothese dar. Bislang wurden für verschiedene zytotoxische Substanzen wie Temozolomid, Cyclophosphamid oder 5-Fluorouracil Alterationen der adulten hippocampalen Neurogenese mit entsprechenden Lern- und Gedächtnisdefiziten im Tiermodell nachgewiesen [25, 26]. Obwohl Paclitaxel durch aktiven Transport über p-Glykoproteine rasch wieder aus dem Hirnparenchym ausgeschieden wird [27] und daher nur geringe Konzentrationen von Paclitaxel im ZNS erreicht werden [28], sind kognitive Störungen bei Patienten auch nach Paclitaxeltherapie beschrieben [29]. Die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch nicht unkritisch, da Patienten zumeist eine Kombination von Chemotherapeutika erhalten und oftmals Rückschlüsse der Effekte

auf individuelle Substanzen schwierig sind. Ob Paclitaxel tatsächlich zu kognitiven Störungen führt, war bislang nicht abschließend belegt.

3 Zielstellungen der Arbeit

Vor dem Hintergrund der vielen unbeantworteten Fragen bezüglich der Pathophysiologie Zytostatika-induzierter neurologischer Folgeerkrankungen sind weitere präklinische Arbeiten essentiell um entscheidende Schlüsselschritte in der pathophysiologischen Kaskade sowie mögliche Präventionsstrategien zu identifizieren. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden daher aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen weitere molekulare Mechanismen untersucht, aus denen sich neue Präventionsstrategien ableiten lassen. Die zusammengefassten Einzelarbeiten sollten folgende relevante Forschungsfragestellungen beantworten:

- 1) Lassen sich neben der bekannten NCS-1/InsP₃R Interaktion weitere relevante Schlüsselproteine identifizieren, die an der gestörten Calciumhomöostase in neuronalen Zellen nach einer Paclitaxelexposition beteiligt sind? Ergeben sich daraus neue Präventionsmöglichkeiten?
- 2) Ist eine gestörte Calciumhomöostase ein substanzübergreifendes Merkmal Zytostatika-induzierter Neurotoxizität und auch am Beispiel von Suramin nachweisbar?
- 3) Was sind Schlüsselmoleküle der sekundären Neuro-Immun-Interaktion und welche Rolle spielen diese in der Entstehung der Paclitaxel-induzierten Neuropathie?
- 4) Lassen sich Paclitaxel-induzierte kognitive Defizite im Tiermodell nachweisen? Liegen diesen ähnliche Pathomechanismen wie bei der Paclitaxel-induzierten Neuropathie zugrunde?

5) Welche Bortezomibkonzentrationen lassen sich im ZNS nachweisen? Reichen diese aus um kognitiven Störungen im Tiermodell und bei Patienten hervorzurufen?

EIGENE ARBEITEN

1 Zelltodmechanismen Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im PNS

1.1 Der Einfluss einer Inhibition des transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 Ionenkanals (TRPV4) auf die Paclitaxel-induzierte Neuropathie

„TRPV4 inhibition prevents paclitaxel-induced neurotoxicity in preclinical models“

(DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.04.014)

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nanomolare Konzentrationen von Paclitaxel bereits nach wenigen Sekunden einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in Spinalganglienneuronen (DRGN) induzieren und dass dies durch eine mittels des NCS-1 Proteins bedingte positive Modulation des InsP_3R vermittelt wird [16, 17]. Es war jedoch nicht nachgewiesen, welcher Subtyp des InsP_3R hierfür verantwortlich ist und ob weitere Schlüsselproteine in diese Signalkaskade eingebunden sind. In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass in DRGN der $\text{InsP}_3\text{R1}$ Subtyp ein retikuläres Verteilungsmuster mit Betonung in der Peripherie nahe der Plasmamembran aufweist [30]. Ein Signal für $\text{InsP}_3\text{R3}$ konnte in DRGN wiederum nicht gezeigt werden, währenddessen der Ryanodinrezeptor RYR3 – ein weiterer Ca^{2+} transportierender Kanal – ebenfalls in DRGN nachweisbar war. Mit Hilfe eines lentiviralen Vektors wurde ein Designerrezeptor (DREADD) in DRGN transduziert, der exklusiv durch ein ‚Designerdrug‘ wie Clozapin-N-Oxid (CNO) aktiviert wird. In Zellen, welche das DREADD exprimieren, kommt es durch Zugabe von Clozapin-N-Oxid (CNO) zu einer vermehrten Aktivierung des Gq Proteins und einer Phospholipase C-vermittelten Produktion von InsP_3 und einem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} . Transduzierte und über den DREADD aktivierte Zellen lassen sich

mittels eines mCherry-Fluoreszenzsignals dabei sicher detektieren. Die mikroskopische Visualisierung des Ca^{2+} -Signals offenbarte, dass CNO in DREADD exprimierenden DRGN zu einem schnellen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} mit einem starken Fluoreszenzsignal nahe der Plasmamembran, passend zu dem histologischen Verteilungsmuster des $\text{InsP}_3\text{R1}$, führt. $\text{InsP}_3\text{R1}$ Inhibition führte zu einer Aufhebung dieses zytosolischen Ca^{2+} Anstiegs. Nachdem wir histologisch eine hohe Kollokalisierung von $\text{InsP}_3\text{R1}$ mit dem TRPV4 in DRGN nachweisen konnten, untersuchten wir den Einfluss einer pharmakologischen TRPV4 Inhibition auf den InsP_3 vermittelten Ca^{2+} Anstieg in DRGN und fanden, dass dieser nach Applikation des TRPV4 Inhibitor HC067047 deutlich abgeschwächt war. In der Immunpräzipitation aus Spinalgliengewebe konnten beide Proteine sowohl mit anti- $\text{InsP}_3\text{R1}$ als auch anti-TRPV4 Antikörpern visualisiert werden, was die räumliche Nähe beider Proteine in DRGN zeigt. Weiterhin konnte TRPV4 Inhibition dosisabhängig die Zytotoxizität von Paclitaxel im DRGN Zellkulturmodell sowie die Entstehung der Paclitaxel-induzierten Neuropathie im Mausmodell verhindern. Zusammenfassend konnte die Arbeit belegen, dass neben der bekannten NCS-1/ InsP_3R Interaktion auch das funktionelle Zusammenspiel von $\text{InsP}_3\text{R1}$ mit dem TRPV4 Kanal zu der gestörten Ca^{2+} Homöostase nach Paclitaxelexposition beiträgt und dass TRPV4 Inhibition die Entstehung der Paclitaxel-induzierten Neuropathie im Zellkultur- und Tiermodell verhindern kann. Dies stellt einen weiter zu verfolgenden möglichen Präventionsmechanismus dar.

Platzhalter:

Boehmerle W*, **Huehnchen P***, Lee SLL, Harms C, Endres M. TRPV4 inhibition prevents paclitaxel-induced neurotoxicity in preclinical models. *Experimental Neurology* 2018;306:64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.014>.

(* geteilte Autorenschaft)

1.2 Neuroprotektive Strategien der Suramin-induzierten Neuropathie

„Suramin-Induced Neurotoxicity: Preclinical Models and Neuroprotective Strategies“

(DOI: 10.3390/molecules23020346)

Für einige Zytostatika wie Paclitaxel oder Cisplatin wurde eine Störung der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase als ein zentraler Schlüsselmechanismus in der Zelltodkaskade der CIN bereits nachgewiesen [16, 31]. Was sich zwischen den Zytostatika jedoch unterscheidet, sind die beteiligten Ca^{2+} Kanäle, welche den Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} vermitteln. Suramin ist ein Trypanblauanalogon, welches als experimentelle Substanz diverse Antitumoreffekte aufweist, aber sehr häufig zu einer CIN führt. Wir waren daher interessiert, ob sich jenseits von Paclitaxel und Platinsubstanzen Ca^{2+} auch als Schlüsselion bei der Suramin-induzierten Neuropathie identifizieren lässt und welche Ca^{2+} transportierenden Kanäle daran beteiligt sind. In unserer Arbeit führte die einmalige Gabe von Suramin im Mausmodell zu einer sensomotorischen Neuropathie mit Zeichen der mechanischen Hypersensibilität/Allodynie, einer Reduktion des sensiblen Nervenaktionspotentials und der sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit [32]. Die IC_{50} der Zytotoxizität in DRGN lag bei 283 μM . Wir beobachteten ähnlich zu den Untersuchungen mit Paclitaxel oder Platinderivaten einen starken Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} Spiegels nach Suraminexposition. Unter Suramin kam es zu einem Ca^{2+} Einstrom von extra- nach intrazellulär, der verschiedene Signale aufwies: 1) in den meisten DRGN (53%) zeigte sich ein kurzer transienter Ca^{2+} Einstrom gefolgt von einem weiteren langsamen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration, 2) andere DRGN (23%) zeigten einen stetigen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} , 3) und bei weiteren 18% der DRGN fand sich nur ein kurzer transienter Ca^{2+} Anstieg im Zytosol. Nur ein sehr geringer Teil der DRGN (5%) zeigte keine Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Es ließen sich

partiell protektive Effekte auf die Zellviabilität nach Suraminexposition durch den Inhibitor spannungs-aktivierter Ca^{2+} Kanäle (VGCC) Nimodipin und den TRPV4 Inhibitor HC067047 nachweisen. Bei ersterem konnten wir auch einen Effekt auf den zytosolischen Ca^{2+} Spiegel feststellen, der bei letzterem fehlte. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine gestörte Ca^{2+} Homöostase auch einen Schlüsselmechanismus in der pathophysiologischen Kaskade bei der Suramin-induzierten Neuropathie darstellt und dass der durch Suramin induzierte Ca^{2+} Einstrom über die Zellmembran primär durch VGCC Kanäle vermittelt wird. TRPV4 Kanäle spielen im Gegensatz zur Paclitaxel-induzierten Neuropathie eine eher untergeordnete Rolle.

Platzhalter:

Von der Ahe D*, **Huehnchen P***, Balkaya M, Peruzzaro S, Endres M, Boehmerle W.

Suramin-induced neurotoxicity: preclinical models and neuroprotective strategies.

Molecules 2018;23(2):346. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23020346>.

(* geteilte Autorenschaft)

2 Die Relevanz einer sekundären Neuro-Immun-Interaktion in der Pathogenese Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im PNS

2.1 Die Rolle des Interleukin-6 Signalwegs bei der Entstehung der Paclitaxel-induzierten Neuropathie

„Blockade of IL-6 signaling prevents paclitaxel-induced neuropathy in C57Bl/6 mice“

(DOI: 10.1038/s41419-020-2239-0)

Bislang lag der wissenschaftliche Fokus zumeist auf den intrazellulären Mechanismen der Chemotherapie-induzierten Neurotoxizität. Einige Studien konnten jedoch auch immun-vermittelte Mechanismen bei der Entstehung des CIN-assoziierten neuropathischen Schmerzes beschreiben (zusammengefasst von [33]). Hier wurden insbesondere Interleukin-6 (IL-6) und nachrangig Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) eine zentrale Rolle zugesprochen. Neben dem neuropathischen Schmerz, der lediglich ein Symptom der CIN darstellt, waren wir vielmehr an der grundsätzlichen pathogenetischen Bedeutung von IL-6 interessiert. In IL-6 knock-out Mäusen (IL-6^{-/-}) führte eine Behandlung mit Paclitaxel verglichen mit den Wildtyptieren in keinem der erfassten Endpunkte (Verhalten, Elektrophysiologie, Histologie) zu einem CIN typischen Phänotyp [34]. Wir konnten im Rückenmarksgewebe von Paclitaxel behandelten Wildtyptieren erhöhte IL-6 Konzentrationen messen, die in mit Vehikel behandelten Tieren nicht nachweisbar waren. In Zellkulturuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass es in DRGN nach Paclitaxelexposition zur Freisetzung von IL-6 kommt, welche durch Ko-Inkubation mit einem Calpaininhibitor bzw. Lithiumionen unterdrückt werden kann. Dies legt nahe, dass die sekundäre, IL-6 vermittelte Immunantwort mit den bislang identifizierten Mechanismen der NCS-1/ InsP₃R Interaktion im funktionellen Zusammenhang steht. Mittels Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass Paclitaxelbehandlung von DRGN die Translokation von

Nuclear factor κ B (NF- κ B) aus dem Zytosol in den Zellkern bewirkt. NF- κ B ist ein bekannter Transkriptionsfaktor, der über Aktivierung weiterer Gene zur Freisetzung verschiedener Zytokine u.a. IL-6 beiträgt. Ähnlich zu unserem vorhergehenden Versuch mit IL-6^{-/-} Mäusen konnte auch eine präventive Behandlung mit einem IL-6 neutralisierenden Antikörper im Mausmodell die Paclitaxel-induzierte Neuropathie in allen Endpunkten (mechanische Allodynie, Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotentials, histologisch nachgewiesene Nervenfaserverdegeneration) verhindern. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IL-6 eine deutlich umfassendere Rolle in der Pathophysiologie der CIN spielt und ein Schlüsselprotein in der sekundären Neuro-Immun-Interaktion darstellt. Weiterhin steht mit einem IL-6 neutralisierenden Antikörper eine neue potentielle Präventionsstrategie zur Verfügung, die in klinischen Studien nun evaluiert werden sollte.

Platzhalter:

Huehnchen P, Muenzfeld H, Boehmerle W, Endres M. Blockade of IL-6 signaling prevents paclitaxel-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Cell Death and Disease* 2020;11(1):45. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2239-0>.

3 Gemeinsame funktionelle Endpunkte Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im ZNS im Mausmodell und Menschen

3.1 Präklinische Evidenz für eine neue präventive Therapie von Paclitaxel-induzierten kognitiven Defiziten

„A novel preventive therapy for paclitaxel-induced cognitive deficits: preclinical evidence from C57BL/6 mice” (DOI: 10.1038/tp.2017.149)

Inwiefern Paclitaxel neben einer CIN auch zu kognitiven Defiziten führt, konnte im Tiermodell bis dato nicht eindeutig bewiesen werden. Wir waren daher an der Etablierung eines Tiermodells und der Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen mit dem Fokus auf Störungen der adulten hippocampalen Neurogenese interessiert. In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Paclitaxel im ZNS nicht homogen verteilt ist, vielmehr sind im Hippocampus ca. 7fach höhere Paclitaxelkonzentrationen gegenüber dem Neocortex nachzuweisen [35]. Paclitaxel induzierte im Mausmodell deutliche Defizite im räumlich-visuellen Gedächtnis verglichen mit den mit Lösungsmittel behandelten Kontrolltieren. Symptome begleitender Angst- oder depressiver Störungen konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Nanomolare Paclitaxelkonzentrationen für zwei Stunden waren ausreichend, um adulte neurale Stammzellen (NSC) zu schädigen. Paclitaxel induzierte in NSC ähnlich unseren Erkenntnissen in DRGN einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration. Weiterhin konnten wir auch in NSC einen Anstieg der Calpain- und Caspase-3/7 Aktivität nach Paclitaxeexposition nachweisen, die durch Calpaininhibition bzw. Ko-Inkubation mit Lithiumionen unterdrückt werden konnte. Gleiches ließ sich für die Zytotoxizität von NSC nach Paclitaxelbehandlung zeigen. Lithium hatte keinen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität von Paclitaxel gegenüber Tumorzellen. Im Tiermodell war eine präventive Therapie mit Lithium in der Lage, die

räumlich-visuellen Defizite nach Paclitaxelexposition zu verhindern. Histologisch konnte gezeigt werden, dass Paclitaxel zu einer Verminderung von sich teilenden neuronalen Zellen und reifen Neuronen führt, welche bei den mit Lithium behandelten Tieren nicht nachweisbar war. Eine Volumenreduktion des Gyrus dentatus oder grundsätzliche Abnahme reifer Neuronen in diesem konnte histologisch nicht festgestellt werden. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Paclitaxel zu Störungen des räumlich-visuellen Gedächtnisses führt, welche auf Alterationen der adulten Neurogenese zurückzuführen waren. Zudem waren Übereinstimmungen im molekularen Pathomechanismus zwischen NSC und DRGN nachweisbar. Ähnlich wie für die Paclitaxel-induzierte Neuropathie, war Lithium auch bei den kognitiven Störungen in der Lage diese zu verhindern.

Platzhalter:

Huehnchen P*, Boehmerle W*, Springer A, Freyer D, Endres M. A novel preventive therapy for paclitaxel-induced cognitive deficits: preclinical evidence from C57Bl/6 mice. *Translational Psychiatry* 2017;7(8):e1185. DOI: <https://doi.org/10.1038/tp.2017.149>.

(* geteilte Autorenschaft)

3.2 Der Einfluss von Bortezomib in therapeutischen Dosierungen auf verschiedene kognitive Funktionen beim Menschen und der Maus

„Bortezomib at therapeutic doses poorly passes the blood–brain barrier and does not impair cognition“ (DOI: 10.1093/braincomms/fcaa021)

Bortezomib ist ein 26S Proteasominhibitor, der neben der Behandlung des Multiplen Myeloms zunehmend in der Therapie refraktärer autoimmuner Erkrankungen eingesetzt wird. Kognitive Störungen wurden unter Bortezomibtherapie bei Myelompatienten beschrieben, ohne dass diese bislang systematisch untersucht wurden. Daher waren wir interessiert, ob Bortezomib überhaupt die Blut-Hirn-Schranke passiert und zu kognitiven Defiziten führt. In dieser Arbeit wurde bei einer limitierten Anzahl von Patientinnen und Patienten mit einer Myasthenia gravis bzw. eines Systemischen Lupus erythematodes (n=6), die im Rahmen der TAVAB Studie (NCT02102594) mit je 8 Gaben Bortezomib behandelt wurden (kumulative Dosis 9,6 mg m⁻²), vor und nach Therapie eine standardisierte neuropsychologische Untersuchung durchgeführt. Es konnten keine Einschränkungen der kognitiven Leistungen in allen Untertests (verbales Gedächtnis, visuo-konstruktives Gedächtnis, Arbeitsgedächtnis, exekutive Funktionen, duale Anforderungen und Arbeitsgeschwindigkeit) festgestellt werden [36]. Auch im Mausmodell wurden keine Störungen in verschiedenen untersuchten kognitiven Domänen wie dem räumlich-visuellen Gedächtnis, Arbeitsgedächtnis oder Wiedererkennungsgedächtnis nachgewiesen, selbst nicht bei einer höheren verabreichten kumulativen humanen Äquivalenzdosis von 15,6 mg m⁻². In pharmakokinetischen Analysen von Hirngewebe im Mausmodell wie auch aus dem Liquor mit Bortezomib behandelter Patienten wurden nur 5-7% der Serumkonzentration von Bortezomib im Maximum gemessen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Bortezomib die intakte Blut-Hirn-

Schranke schlecht passiert und sich weder bei Patienten noch im Tiermodell kognitive Störungen nachweisen ließen, was Bortezomib zu einer klinisch effektiven Alternative in der Behandlung Therapie-refraktärer Autoimmunerkrankungen mit insgesamt vertretbarem Nebenwirkungsprofil macht.

Platzhalter:

Huehnchen P, Springer A, Kern J, Kopp U, Kohler S, Alexander T, Hiepe F, Meisel A, Boehmerle W, Endres M. Bortezomib at therapeutic doses poorly passes the blood-brain-barrier and does not impair cognition. Brain Communications 2020;2(1):1. DOI: <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa021>.

DISKUSSION

In den hier zusammengefassten Arbeiten wurden, basierend auf zum Teil eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, weitere (substanzübergreifende) Pathomechanismen Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im peripheren und zentralen Nervensystem in verschiedenen Modellsystemen untersucht. Nach Identifikation eines möglichen neuen Pathomechanismus erfolgte die Evaluation darauf aufbauender gezielter Präventionsstrategien. Die Methodik basierte dabei auf einem übergeordneten systematischen translationalen Ansatz, bei dem sich an die Identifikation relevanter molekularer Schlüssel- und Präventionsmechanismen im Zellkulturmodell die Validierung dieser im Tiermodell anschloss. Letztlich wurden auch relevante Zielparameter parallel im Mausmodell und Menschen untersucht um die Validität der Modellsysteme zu überprüfen.

1 Substanzübergreifende Zelltodmechanismen Zytostatika-induzierter Neurotoxizität

1.1 Ca^{2+} und TRPV4

Wie bereits erwähnt zählt die intrazelluläre Ca^{2+} Dyshomöostase zu einem der zentralen Schlüsselmechanismen Zytostatika-induzierter Neurotoxizität. Für Paclitaxel wurde dies z.T. in eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegt. Zwei Proteine sind bei der Paclitaxel-induzierten Neurotoxizität maßgeblich in diesen Regelkreislauf eingebunden, welche den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration vermitteln – das Neuronale Calcium Sensor 1-Protein (NCS-1) sowie der InsP_3 -Rezeptor (InsP_3R) [16-18]. Aufbauend auf diesen Vorarbeiten konnte in dieser Arbeit zudem gezeigt werden, dass neben der NCS-1/ InsP_3R Interaktion das funktionelle Zusammenspiel des $\text{InsP}_3\text{R}1$ mit dem membranständigen TRPV4 Kanal dazu beiträgt, dass Ca^{2+} nicht nur aus dem ER freigesetzt wird, sondern auch von extra- nach intrazellulär einströmt

und somit den Effekt einer ansteigenden zytosolischen Ca^{2+} Konzentration potenziert. Dadurch ließ sich ein weiteres Protein in der Zelltodkaskade identifizieren, welches einer pharmakologischen Intervention zugänglich ist. TRPV4 Inhibition konnte im Zellkultur- und Tiermodell die Paclitaxel-induzierte Neuropathie verringern. Dass TRPV4 bei der Entstehung der CIN-assoziierten Symptome eine Schlüsselrolle spielt, konnte bereits durch andere Gruppen gezeigt werden [37, 38]. TRP Kanäle sind mitentscheidend bei der Vermittlung des neuropathischen Schmerzes und letztlich nicht nur deswegen bereits länger Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (zusammengefasst durch [39, 40]). Unsere Untersuchungen dagegen belegen eine darüber hinaus weitaus substantiellere Rolle von TRPV4 bei der Entstehung der CIN. Erste Daten einer frühen klinischen Anwendung in Gesunden und Patienten mit Herzinsuffizienz belegen, dass TRPV4 Inhibition zu keinen ernsthaften Nebenwirkungen führt und gut vertragen wurde [41]. Inwiefern sich dieses Medikament auch in der Prävention der CIN eignet, gilt es zu evaluieren.

1.2 Ca^{2+} und spannungs-aktivierte Ca^{2+} Kanäle (VGCC)

Jenseits der Effekte von Paclitaxel auf die intrazelluläre Ca^{2+} Homöostase konnte auch für andere Zytostatika ein Einfluss auf diese nachgewiesen werden. Untersuchungen zu den Platinderivaten Cisplatin und Oxaliplatin zum Beispiel zeigten, dass diese ebenso zu einem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} führen [31]. Interessant hingegen ist, dass selbst innerhalb dieser Substanzgruppe die Effekte der Zytostatika auf die zytosolische Ca^{2+} Konzentration zwar ähnlich sind, sich aber die beteiligten Ca^{2+} Kanalproteine unterscheiden. Während der Effekt bei Cisplatin maßgeblich durch N-Typ spannungs-aktivierte Ca^{2+} Kanäle (VGCC) vermittelt ist [31], konnte für Oxaliplatin nachgewiesen werden, dass vorrangig T- und L-Typ VGCC mehr als P/Q-VGCC an dem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration beteiligt sind und N-Typ VGCC praktisch keine Rolle spielen [42]. Wir konnten wiederum in unseren Arbeiten für

Suramin zeigen, dass auch hier die L-Typ VGCC für den von extra- nach intrazellulär zirkulierenden Ca^{2+} Einstrom verantwortlich sind [32]. Interessanterweise hatte auch TRPV4 Inhibition einen Effekt auf die Zytotoxizität von Suramin in DRGN, wenn auch deutlich geringer ausgeprägt.

1.3 Ca^{2+} und Interleukin-6 (IL-6)

Intrazelluläres Ca^{2+} spielt durch seine membranstabilisierenden Eigenschaften, als metabolischer Regulator und Signalgeber („second messenger“) eine entscheidende Rolle (zusammengefasst in [43]) und ist keineswegs nur ein Schlüsselion der Zytostatika-induzierten Neurotoxizität. Vielmehr sind Veränderungen der Ca^{2+} Homöostase auch für andere neurologische Erkrankungen wie z.B. den ischämischen Schlaganfall oder die Multiple Sklerose beschrieben (zusammengefasst in [44, 45]). Bei der Zytostatika-induzierten Neurotoxizität treten Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase überwiegend zu einem frühen Zeitpunkt der pathophysiologischen Kaskade auf. Die Identifikation der daran beteiligten Schlüsselproteine ermöglicht somit eine gezielte und dadurch idealerweise möglichst nebenwirkungsarme Intervention, wie wir im Tiermodell für den TRPV4 Inhibitor HC067047 oder Lithium belegen konnten, die beide zur Prävention von CIN und/ oder PCCI beitragen. Jedoch wird nicht zuletzt durch diese Arbeit deutlich, dass obwohl Ca^{2+} ein gemeinsames Schlüsselion Zytostatika-induzierter Neurotoxizität darstellt, die involvierten Ca^{2+} Kanäle sich zwischen den Substanzgruppen und zum Teil auch Einzelsubstanzen innerhalb einer Substanzgruppe deutlich unterscheiden. Dies wiederum bedeutet im Umkehrschluss jedoch, dass eine frühe Blockade der durch Zytostatika hervorgerufenen Ca^{2+} Dyshomöostase durch einen universellen pharmakologischen Ansatz, welcher substanzgruppenübergreifend die Entstehung von CIN und/ oder PCCI hemmt, nahezu ausgeschlossen ist. Aus diesem Grund ist die Erkenntnis der Relevanz einer sekundären Neuro-Immun-Interaktion bei der Entstehung der

Zytostatika-induzierten Neurotoxizität von entscheidender Bedeutung. Sollten die verschiedenen intrazellulären Pathomechanismen in einer gemeinsamen pathophysiologischen Endstrecke einer sekundären Immunreaktion münden, ließe sich ggf. eine substanzübergreifende Präventionsstrategie etablieren. Wir konnten für Paclitaxel die Schlüsselrolle von IL-6 bei der Entstehung der CIN belegen. Auch für Bortezomib konnte von anderen Gruppen gezeigt werden, dass eine Bortezomibbehandlung von DRGN zur Hochregulation des Interleukin-6 Rezeptors (IL-6R) in DRGN führt [46]. Eine größere randomisierte klinische Studie mit 106 Patienten untersuchte den Einfluss einer Ko-Medikation mit dem anti-IL-6 Antikörper Siltuximab zusätzlich zur Chemotherapie mit Bortezomib/ Melphalan/ Prednisolon (VMP Schema) auf die Myelomentwicklung und konnte zwar keinen Unterschied der additiven Siltuximabtherapie (S+VMP) auf die Remissionsraten des Myeloms verglichen mit der Standardtherapie (VMP) nachweisen. Interessant war jedoch bei dieser Studie, dass in der Siltuximabgruppe (S+VMP) deutlich weniger neuropathischen Beschwerden auftraten und dass unter Ko-Medikation mit Siltuximab weniger Dosisreduktionen von Bortezomib notwendig waren [47]. IL-6 scheint demnach auch bei der Bortezomib-induzierten Neuropathie eine Rolle zu spielen. Auch für die Substanz Vincristin konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass es ähnlich zu den Effekten einer Paclitaxeltherapie zu einer IL-6 vermittelten Makrophageninvasion in die Spinalganglien kommt. Auch hier hatte eine präventive Behandlung mit einem IL-6 neutralisierenden Antikörper positive Effekte auf die Vincristin-induzierten Symptome der CIN (Allodynie, Schmerz) [48]. Leider fehlen bei der überwiegenden Zahl der genannten präklinischen Studien histologische Daten, was die Entwicklung der CIN angeht. Dies gilt es im nächsten Schritt zu untersuchen, um die Hypothese einer gemeinsamen, substanzübergreifenden pathophysiologischen Endstrecke der sekundären Neuro-

Immun-Interaktion zu erhärten und somit Daten für die Rechtfertigung einer klinischen Studie zu sammeln.

2 Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie Zytostatika-induzierter Neurotoxizität im peripheren und zentralen Nervensystem

Nur wenige präklinische Studien haben sich bislang mit den zugrundeliegenden Pathomechanismen kognitiver Störungen nach Chemotherapie beschäftigt. Wir konnten für Paclitaxel im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass sich offenbar Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie der Neurotoxizität zwischen DRGN und NSC finden lassen. So spielte auch in NSC eine Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} Signals nach Paclitaxelexposition mit der nachgeschalteten Aktivierung von Calpain eine entscheidende Rolle [35]. Auch andere Gruppen konnten zeigen, dass nach Chemotherapie mit Cyclophosphamid und Docetaxel – einer Weiterentwicklung von Paclitaxel – erhöhte Proteinkonzentrationen von Calpain 1 und 2 im Rattenhirn nachweisbar waren [49]. Calpain ist eine ubiquitär vorkommende Ca^{2+} sensitive Protease, die mit einer Reihe von pathophysiologischen Veränderungen in verschiedenen Krankheitsbildern (Ischämie, Epilepsie, Trauma, Alzheimer Demenz) und unterschiedlichen Endorganen in Verbindung gebracht wurde (zusammengefasst in [50]). Es ist daher nicht verwunderlich, dass sich auch für die Zytostatika-induzierte Neurotoxizität Übereinstimmungen im Pathomechanismus zwischen zentralem und peripheren Nervensystem bezüglich Calpain finden ließen.

Jenseits der intrazellulären Interaktion von NCS-1 mit dem $InsP_3R$ und Calpain, die wie demonstriert sowohl im ZNS als auch PNS bei der Zytostatika-induzierten Neurotoxizität eine Rolle spielt, rückten für das PNS erst in den letzten Jahren auch sekundäre immunologische Prozesse mit u.a. Makrophageninfiltration in die DRGN zunehmend in den Fokus [22]. Wir konnten zeigen, dass v.a. IL-6 eine substantielle Rolle bei der Entwicklung der CIN spielt. Ein Zusammenspiel verschiedener Zelltypen

bei der Entstehung von Chemotherapie-induzierten kognitiven Störungen ist noch nicht abschließend belegt aber ebenfalls sehr wahrscheinlich. Auch hier kommen proinflammatorischen Zytokinen wie u.a. IL-6 eine Schlüsselfunktion zu. So konnte in Chemotherapiepatienten nachgewiesen werden, dass z.B. erhöhte Plasmaspiegel von IL-6 mit schlechteren Leistungen in kognitiven Tests korrelierten [51] oder dass eine Abnahme des hippocampalen Volumens und der verbalen Gedächtnisleistungen mit der IL-6 Konzentration assoziiert war [52]. Auch im Tiermodell waren nach Paclitaxel- bzw. Docetaxeltherapie ebenfalls erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α , IL-6 und CXCL1 sowie auch eine transient erhöhte Genexpression für IL-6 im Hippocampus messbar [53]. Analog zur nachgewiesenen Makrophageninfiltration von DRGN wird im ZNS angenommen, dass es über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 zu einer Mikrogliaaktivierung kommt, welche zur kognitiven Dysfunktion nach Chemotherapie beiträgt. In der Tat konnte für Adriamycin im Mausmodell gezeigt werden, dass nach der Behandlung mehr CD68 positive Mikroglia im Hippocampus nachweisbar waren. Zudem wirkte sich eine Mikroglia-depletion positiv auf die durch Adriamycin hervorgerufenen kognitiven Störungen in diesem Tiermodell aus [54]. Eine sekundäre Immunreaktion scheint somit auch ein übereinstimmender Mechanismus des peripheren und zentralen Nervensystems als Reaktion auf die Chemotherapie zu sein.

3 Gemeinsame Schlüsselproteine der Zytostatika-induzierten Neurotoxizität und Tumorbilogie

Welche Rolle die NCS-1/ InsP₃R/ Calpain Interaktion bei der Entstehung der Paclitaxel-induzierten Neuropathie und kognitiven Störungen spielt, wurde unter den o.g. Punkten erläutert. Viel interessanter ist aber darüber hinaus, dass sowohl Calpain als auch NCS-1 zudem in Bezug auf Tumoraggressivität und Prognose relevant zu sein scheinen. Sowohl Calpain als auch NCS-1 sind ubiquitär vorkommende Proteine

und werden in vielen Geweben exprimiert. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von Calpain-2 die Tumorstadiumsrate von Brustkrebszellen vermindert [55] und in Brustkrebspatientinnen ist eine hohe Calpain-1 und 2 Expression mit einer ungünstigeren Prognose vergesellschaftet [56]. Ähnliches ließ sich auch für NCS-1 nachweisen. Auch hier war die NCS-1 Expression im Brusttumorgewebe mit aggressiveren Verläufen und schlechterem Outcome bei Brustkrebspatientinnen assoziiert [57]. Anschließend konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von NCS-1 zur Metastasierung beiträgt, indem es die Motilität und Migration von Brustkrebszellen fördert [58]. Diese Daten unterstreichen die Relevanz beider Proteine nicht nur in Bezug auf die Pathogenese neurotoxischer Nebenwirkungen, sondern auch auf die Tumorbehandlung selbst. Die Identifikation gezielter Interventionsmechanismen verspricht demzufolge in Zukunft synergistische Effekte auf die Tumorbehandlung und Neuroprotektion.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine erfolgreiche Translation präklinischer Präventionsstrategien ‚bench-to bedside‘ setzt die Identifikation pathophysiologisch relevanter molekularer Schlüsselmechanismen voraus. Im Rahmen der hier dargestellten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase substanzübergreifend einen frühen pathomechanistisch relevanten Prozess für die Zytostatika-induzierte Neurotoxizität im peripheren und zentralen Nervensystem darstellen und nach Paclitaxel- und Suraminbehandlung nachweisbar sind. Damit knüpft die Arbeit an Vorarbeiten (der Arbeitsgruppe) an und erweitert den bisherigen Erkenntnisstand. Am Beispiel von Paclitaxel konnte zum einen gezeigt werden, dass die bekannte NCS-1/ InsP_3R Interaktion auch an der Entstehung der kognitiven Störungen nach Chemotherapie beteiligt ist. Zum zweiten wurde ein weiteres funktionelles Zusammenspiel zwischen dem $\text{InsP}_3\text{R1}$ mit dem TRPV4 Kanal nachgewiesen, welches den Effekt der Neurotoxizität im PNS potenziert und einer spezifischen Inhibition zugänglich ist. Da sich jedoch die zur Ca^{2+} Dyshomöostase beitragenden Ca^{2+} Kanäle zwischen den Zytostatika unterscheidenden und somit ein universeller Präventionsmechanismus von CIN und/ oder PCCI unwahrscheinlich ist, wurden sekundäre Neuro-Immuneffekte untersucht. Hier konnten wir zeigen, dass Interleukin-6 eine substantielle Rolle bei der Entstehung der CIN spielt und mit neutralisierenden IL-6 Antikörpern eine neue Präventionsmöglichkeit etablieren, welche nun auch für andere Zytostatika evaluiert werden sollte.

Zusammenfassend gehören Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase zu den frühen Mechanismen Zytostatika-induzierter Neurotoxizität, die von einer sekundären Neuro-Immuneffekte gefolgt werden, sodass sich spannende neue Ansätze für zukünftige präventive Interventionen ergeben.

LITERATURANGABEN

1. Barnes, B.; Kraywinkel, K.; Nowossadeck, E.; Schönfeld, I.; Starker, A.; Wienecke, A.; Wolf, U., Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut: 2016.
2. American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2014*; American Cancer Society: Atlanta, 2014.
3. Seretny, M.; Currie, G. L.; Sena, E. S.; Ramnarine, S.; Grant, R.; MacLeod, M. R.; Colvin, L. A.; Fallon, M., Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* **2014**, 155, (12), 2461-70.
4. Hershman, D. L.; Lacchetti, C.; Dworkin, R. H.; Lavoie Smith, E. M.; Bleeker, J.; Cavaletti, G.; Chauhan, C.; Gavin, P.; Lavino, A.; Lustberg, M. B.; Paice, J.; Schneider, B.; Smith, M. L.; Smith, T.; Terstriep, S.; Wagner-Johnston, N.; Bak, K.; Loprinzi, C. L., Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology* **2014**, 32, (18), 1941-1967.
5. Boehmerle, W.; Huehnchen, P.; Endres, M., Chemotherapy-induced neuropathy. *Der Nervenarzt* **2015**, 86, (2), 156-60.
6. Kandula, T.; Farrar, M. A.; Kiernan, M. C.; Krishnan, A. V.; Goldstein, D.; Horvath, L.; Grimison, P.; Boyle, F.; Baron-Hay, S.; Park, S. B., Neurophysiological and clinical outcomes in chemotherapy-induced neuropathy in cancer. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* **2017**, 128, (7), 1166-1175.
7. Kerckhove, N.; Collin, A.; Condé, S.; Chaletex, C.; Pezet, D.; Balayssac, D., Long-Term Effects, Pathophysiological Mechanisms, and Risk Factors of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathies: A Comprehensive Literature Review. *Frontiers in Pharmacology* **2017**, 8, 86.
8. Huehnchen, P.; van Kampen, A.; Boehmerle, W.; Endres, M., Cognitive impairment after cytotoxic chemotherapy. *Neuro-Oncology Practice* **2019**, 7, (1), 11-21.
9. Myers, J. S.; Pierce, J.; Pazdernik, T., Neurotoxicology of chemotherapy in relation to cytokine release, the blood-brain barrier, and cognitive impairment. *Oncol Nurs Forum* **2008**, 35, (6), 916-20.
10. Vardy, J.; Rourke, S.; Tannock, I. F., Evaluation of Cognitive Function Associated With Chemotherapy: A Review of Published Studies and Recommendations for Future Research. *Journal of Clinical Oncology* **2007**, 25, (17), 2455-2463.
11. Stewart, A.; Bielajew, C.; Collins, B.; Parkinson, M.; Tomiak, E., A meta-analysis of the neuropsychological effects of adjuvant chemotherapy treatment in women treated for breast cancer. *The Clinical Neuropsychologist* **2006**, 20, (1), 76-89.
12. Jim, H. S.; Phillips, K. M.; Chait, S.; Faul, L. A.; Popa, M. A.; Lee, Y. H.; Hussin, M. G.; Jacobsen, P. B.; Small, B. J., Meta-analysis of cognitive functioning in breast cancer survivors previously treated with standard-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* **2012**, 30, (29), 3578-87.
13. Baudino, B.; D'Agata, F.; Caroppo, P.; Castellano, G.; Cauda, S.; Manfredi, M.; Geda, E.; Castelli, L.; Mortara, P.; Orsi, L.; Cauda, F.; Sacco, K.; Ardito, R. B.; Pinessi, L.; Geminiani, G.; Torta, R.; Bisi, G., The chemotherapy long-term effect on cognitive functions and brain metabolism in lymphoma patients. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the So* **2012**, 56, (6), 559-68.
14. Bruno, J.; Hosseini, S. M.; Kesler, S., Altered resting state functional brain network topology in chemotherapy-treated breast cancer survivors. *Neurobiol Dis* **2012**, 48, (3), 329-38.
15. Long, H. J., Paclitaxel (Taxol): a novel anticancer chemotherapeutic drug. *Mayo Clinic proceedings* **1994**, 69, (4), 341-5.
16. Boehmerle, W.; Splittgerber, U.; Lazarus, M. B.; McKenzie, K. M.; Johnston, D. G.; Austin, D. J.; Ehrlich, B. E., Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor

- and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, 103, (48), 18356-18361.
17. Schlecker, C.; Boehmerle, W.; Jeromin, A.; DeGray, B.; Varshney, A.; Sharma, Y.; Szigeti-Buck, K.; Ehrlich, B. E., Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *The Journal of Clinical Investigation* **2006**, 116, (6), 1668-1674.
 18. Boehmerle, W.; Zhang, K.; Sivula, M.; Heidrich, F. M.; Lee, Y.; Jordt, S.-E.; Ehrlich, B. E., Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104, (26), 11103-11108.
 19. Benbow, J. H.; Mann, T.; Keeler, C.; Fan, C.; Hodsdon, M. E.; Lolis, E.; DeGray, B.; Ehrlich, B. E., Inhibition of paclitaxel-induced decreases in calcium signaling. *The Journal of biological chemistry* **2012**, 287, (45), 37907-16.
 20. Mo, M.; Erdelyi, I.; Szigeti-Buck, K.; Benbow, J. H.; Ehrlich, B. E., Prevention of paclitaxel-induced peripheral neuropathy by lithium pretreatment. *FASEB J* **2012**, 26, (11), 4696-709.
 21. Leblanc, A. F.; Sprowl, J. A.; Alberti, P.; Chiorazzi, A.; Arnold, W. D.; Gibson, A. A.; Hong, K. W.; Pioso, M. S.; Chen, M.; Huang, K. M.; Chodisetty, V.; Costa, O.; Florea, T.; de Bruijn, P.; Mathijssen, R. H.; Reinbolt, R. E.; Lustberg, M. B.; Sucheston-Campbell, L. E.; Cavaletti, G.; Sparreboom, A.; Hu, S., OATP1B2 deficiency protects against paclitaxel-induced neurotoxicity. *J Clin Invest* **2018**, 128, (2), 816-825.
 22. Zhang, H.; Li, Y.; de Carvalho-Barbosa, M.; Kavelaars, A.; Heijnen, C. J.; Albrecht, P. J.; Dougherty, P. M., Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* **2016**, 17, (7), 775-86.
 23. Ahles, T. A.; Saykin, A. J., Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nat Rev Cancer* **2007**, 7, (3), 192-201.
 24. Cheng, H.; Li, W.; Gong, L.; Xuan, H.; Huang, Z.; Zhao, H.; Wang, L. S.; Wang, K., Altered resting-state hippocampal functional networks associated with chemotherapy-induced prospective memory impairment in breast cancer survivors. *Scientific reports* **2017**, 7, 45135.
 25. Garthe, A.; Behr, J.; Kempermann, G., Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies. *PLoS ONE* **2009**, 4, (5), e5464.
 26. M, E. L.; Mustafa, S.; Umka, J.; Lyons, L.; Salman, A.; Dormon, K.; Allcock, C.; Bennett, G.; Wigmore, P., The effect of 5-fluorouracil on the long term survival and proliferation of cells in the rat hippocampus. *Brain research bulletin* **2012**, 88, (5), 514-8.
 27. Fellner, S.; Bauer, B.; Miller, D. S.; Schaffrik, M.; Fankhänel, M.; Spruß, T.; Bernhardt, G.; Graeff, C.; Färber, L.; Gschaidmeier, H.; Buschauer, A.; Fricker, G., Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* **2002**, 110, (9), 1309-1318.
 28. Eiseman, J. L.; Eddington, N. D.; Leslie, J.; MacAuley, C.; Sentz, D. L.; Zuhowski, M.; Kujawa, J. M.; Young, D.; Egorin, M. J., Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **1994**, 34, (6), 465-71.
 29. Wefel, J. S.; Saleeba, A. K.; Buzdar, A. U.; Meyers, C. A., Acute and late onset cognitive dysfunction associated with chemotherapy in women with breast cancer. *Cancer* **2010**, 116, (14), 3348-3356.
 30. Boehmerle, W.; Huehnchen, P.; Lee, S. L. L.; Harms, C.; Endres, M., TRPV4 inhibition prevents paclitaxel-induced neurotoxicity in preclinical models. *Exp Neurol* **2018**, 306, 64-75.
 31. Leo, M.; Schmitt, L. I.; Erkel, M.; Melnikova, M.; Thomale, J.; Hagenacker, T., Cisplatin-induced neuropathic pain is mediated by upregulation of N-type voltage-gated calcium channels in dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol* **2017**, 288, 62-74.
 32. von der Ahe, D.; Huehnchen, P.; Balkaya, M.; Peruzzaro, S.; Endres, M.; Boehmerle, W., Suramin-Induced Neurotoxicity: Preclinical Models and Neuroprotective Strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2018**, 23, (2).

33. Lees, J. G.; Makker, P. G.; Tonkin, R. S.; Abdulla, M.; Park, S. B.; Goldstein, D.; Moalem-Taylor, G., Immune-mediated processes implicated in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Eur J Cancer* **2017**, *73*, 22-29.
34. Huehnchen, P.; Muenzfeld, H.; Boehmerle, W.; Endres, M., Blockade of IL-6 signaling prevents paclitaxel-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Cell death & disease* **2020**, *11*, (1), 45.
35. Huehnchen, P.; Boehmerle, W.; Springer, A.; Freyer, D.; Endres, M., A novel preventive therapy for paclitaxel-induced cognitive deficits: preclinical evidence from C57Bl/6 mice. *Transl Psychiatry* **2017**, *7*, (8), e1185.
36. Huehnchen, P.; Springer, A.; Kern, J.; Kopp, U.; Kohler, S.; Alexander, T.; Hiepe, F.; Meisel, A.; Boehmerle, W.; Endres, M., Bortezomib at therapeutic doses poorly passes the blood–brain barrier and does not impair cognition. *Brain Communications* **2020**, *2*, (1).
37. Alessandri-Haber, N.; Dina, O. A.; Yeh, J. J.; Parada, C. A.; Reichling, D. B.; Levine, J. D., Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2004**, *24*, (18), 4444-52.
38. Materazzi, S.; Fusi, C.; Benemei, S.; Pedretti, P.; Patacchini, R.; Nilius, B.; Prenen, J.; Creminon, C.; Geppetti, P.; Nassini, R., TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2012**, *463*, (4), 561-9.
39. Moore, C.; Gupta, R.; Jordt, S. E.; Chen, Y.; Liedtke, W. B., Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neuroscience bulletin* **2018**, *34*, (1), 120-142.
40. Moran, M. M., TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* **2018**, *58*, 309-330.
41. Goyal, N.; Skrdla, P.; Schroyer, R.; Kumar, S.; Fernando, D.; Oughton, A.; Norton, N.; Sprecher, D. L.; Cheriyan, J., Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of a Novel, First-in-Class TRPV4 Ion Channel Inhibitor, GSK2798745, in Healthy and Heart Failure Subjects. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* **2019**, *19*, (3), 335-342.
42. Schmitt, L. I.; Leo, M.; Kleinschnitz, C.; Hagenacker, T., Oxaliplatin Modulates the Characteristics of Voltage-Gated Calcium Channels and Action Potentials in Small Dorsal Root Ganglion Neurons of Rats. *Molecular neurobiology* **2018**, *55*, (12), 8842-8855.
43. Pinton, P.; Giorgi, C.; Siviero, R.; Zecchini, E.; Rizzuto, R., Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* **2008**, *27*, (50), 6407-6418.
44. Horn, J.; Brouwers, P. J. A. M.; Limburg, M., Disturbances of Calcium Homeostasis in Ischaemic Stroke. *CNS drugs* **1999**, *11*, (5), 373-386.
45. Ehling, P.; Epping, L.; Meuth, S., Calcium Homeostasis in Multiple Sclerosis. *Neurology International Open* **2017**, *01*, E127-E135.
46. Liu, D.; Sun, M.; Xu, D.; Ma, X.; Gao, D.; Yu, H., Inhibition of TRPA1 and IL-6 signal alleviates neuropathic pain following chemotherapeutic bortezomib. *Physiological research* **2019**, *68*, (5), 845-855.
47. San-Miguel, J.; Blade, J.; Shpilberg, O.; Grosicki, S.; Maloisel, F.; Min, C. K.; Polo Zarzuela, M.; Robak, T.; Prasad, S. V.; Tee Goh, Y.; Laubach, J.; Spencer, A.; Mateos, M. V.; Palumbo, A.; Puchalski, T.; Reddy, M.; Uhlar, C.; Qin, X.; van de Velde, H.; Xie, H.; Orłowski, R. Z., Phase 2 randomized study of bortezomib-melphalan-prednisone with or without siltuximab (anti-IL-6) in multiple myeloma. *Blood* **2014**, *123*, (26), 4136-42.
48. Kiguchi, N.; Maeda, T.; Kobayashi, Y.; Kondo, T.; Ozaki, M.; Kishioka, S., The critical role of invading peripheral macrophage-derived interleukin-6 in vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *European journal of pharmacology* **2008**, *592*, (1-3), 87-92.
49. Davis, J. B.; Lawrence, G. N.; Harpole, M. G.; Couch, R. D.; Liotta, L. A.; Dumas, T. C.; Espina, V. A., Chemotherapy modulates proteomic pathways and neuronal metabolites in the brain [abstract]. *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018* **2018**, *78*, (13 (Suppl)), Abstract nr 3476.
50. Vanderklish, P. W.; Bahr, B. A., The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol* **2000**, *81*, (5), 323-339.

51. Cheung, Y. T.; Ng, T.; Shwe, M.; Ho, H. K.; Foo, K. M.; Cham, M. T.; Lee, J. A.; Fan, G.; Tan, Y. P.; Yong, W. S.; Madhukumar, P.; Loo, S. K.; Ang, S. F.; Wong, M.; Chay, W. Y.; Ooi, W. S.; Dent, R. A.; Yap, Y. S.; Ng, R.; Chan, A., Association of proinflammatory cytokines and chemotherapy-associated cognitive impairment in breast cancer patients: a multi-centered, prospective, cohort study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **2015**, *26*, (7), 1446-51.
52. Kesler, S.; Janelins, M.; Koovakkattu, D.; Palesh, O.; Mustian, K.; Morrow, G.; Dhabhar, F. S., Reduced hippocampal volume and verbal memory performance associated with interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in chemotherapy-treated breast cancer survivors. *Brain, Behavior, and Immunity* **2013**, *30*, Supplement, (0), S109-S116.
53. Loman, B. R.; Jordan, K. R.; Haynes, B.; Bailey, M. T.; Pyter, L. M., Chemotherapy-induced neuroinflammation is associated with disrupted colonic and bacterial homeostasis in female mice. *Scientific reports* **2019**, *9*, (1), 16490-16490.
54. Allen, B. D.; Apodaca, L. A.; Syage, A. R.; Markarian, M.; Baddour, A. A. D.; Minasyan, H.; Alikhani, L.; Lu, C.; West, B. L.; Giedzinski, E.; Baulch, J. E.; Acharya, M. M., Attenuation of neuroinflammation reverses Adriamycin-induced cognitive impairments. *Acta Neuropathologica Communications* **2019**, *7*, (1), 186.
55. Ho, W.-c.; Pikor, L.; Gao, Y.; Elliott, B. E.; Greer, P. A., Calpain 2 Regulates Akt-FoxO-p27Kip1 Protein Signaling Pathway in Mammary Carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, (19), 15458-15465.
56. Storr, S. J.; Woolston, C. M.; Barros, F. F. T.; Green, A. R.; Shehata, M.; Chan, S. Y.; Ellis, I. O.; Martin, S. G., Calpain-1 expression is associated with relapse-free survival in breast cancer patients treated with trastuzumab following adjuvant chemotherapy. *International Journal of Cancer* **2011**, *129*, (7), 1773-1780.
57. Moore, L. M.; England, A.; Ehrlich, B. E.; Rimm, D. L., Calcium Sensor, NCS-1, Promotes Tumor Aggressiveness and Predicts Patient Survival. *Molecular cancer research : MCR* **2017**, *15*, (7), 942-952.
58. Apasu, J. E.; Schuette, D.; LaRanger, R.; Steinle, J. A.; Nguyen, L. D.; Grosshans, H. K.; Zhang, M.; Cai, W. L.; Yan, Q.; Robert, M. E.; Mak, M.; Ehrlich, B. E., Neuronal calcium sensor 1 (NCS1) promotes motility and metastatic spread of breast cancer cells in vitro and in vivo. *FASEB J* **2019**, *33*, (4), 4802-4813.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich besonders bei meinem Mentor und klinischen Ausbilder Herrn Prof. Dr. Matthias Endres bedanken, der die Fortsetzung meiner wissenschaftlichen Arbeit in seiner Arbeitsgruppe stets gefördert und meine persönliche Weiterentwicklung wissenschaftlich und klinisch allzeit beratend unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gilt meinem geschätzten Kollegen PD Dr. Wolfgang Böhmerle, der mich nicht nur für das Thema begeistert, sondern mit mir einen Großteil der hier dargelegten Arbeiten konzeptioniert und durchgeführt hat.

Zu großer Dankbarkeit bin ich unserer medizinisch-technischen Assistentin Frau Loge verpflichtet, ohne deren exzellente Arbeit über die letzten 10 Jahre viele dieser Projekte nicht hätten umgesetzt werden können.

Ich möchte mich zudem bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl und allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Experimentelle Neurologie sowie der Klinik für Neurologie für die Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Ein weiterer Dank gilt unseren zahlreichen Studentinnen und Studenten über die letzten Jahre – Sarah, Hannah, David, Adam, Johannes, Kerstin – für die Unterstützung bei unseren Projekten.

Abschließend möchte ich vor allem meiner Familie danken, die mich stets bei allen Ideen und Zielen unterstützt und ohne deren Hilfe, Kritik, Fürsorge und vieles mehr diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

03.08.2020

.....

Datum

.....

Unterschrift