

Aus dem Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Die pathophysiologische Rolle des Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptors
und seiner Modulatoren*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

Von

Kun Zhang

aus Anhui, China

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dietmar Schmitz
2. Prof. Dr. Stephan Felix
3. Prof. Dr. Uwe Heinemann

Datum der Promotion: 24.02.2012

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Einleitung und Zielstellung.....	5
Materialien und Methoden	6
1. Zellkultur und Transfektion	6
2. Live Cell Calcium Imaging	6
3. Biochemie	6
4. Elektrophysiologie.....	7
5. In vivo Experimente	7
6. Datenanalyse	8
Ergebnisse.....	9
1. CGB reguliert die InsP_3R abhängige Calcium Signaltransduktion sowie die NF- κB Aktivität und BNP Produktion in Kardiomyozyten.....	9
2. Chronische Exposition mit Paclitaxel vermindert InsP_3R vermittelte Calcium Signale in Neuronen	10
3. Paclitaxel erhöht InsP_3R vermittelt die Frequenz spontaner Calcium Oszillationen in Kardiomyozyten	11
Diskussion	12
1. Mögliche Rolle der CGB/ InsP_3R Interaktion im Rahmen der kardialen Hypertrophie	12
2. Mögliche Rolle der NCS-1/ InsP_3R Interaktion in der Pathogenese Paclitaxel induzierter Nebenwirkungen in Neuronen und im Herzen.....	13
Referenzen	14
Anteilerklärung.....	16
Publikation 1	17
Publikation 2	27
Publikation 3	34
Lebenslauf	42
Publikationsliste.....	43
Selbständigkeitserklärung	44
Danksagung	45

Zusammenfassung

In den hier vorgestellten Arbeiten [1-3] wird die Interaktion des Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptors (InsP₃R) mit Chromogranin B (CGB) sowie dem Neuronal Calcium Sensor 1 (NCS-1) beschrieben. Als ubiquitär am Endoplasmatischen Retikulum (ER) exprimierter Calciumionen-Kanal fördert der InsP₃R unter Stimulation mit Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) die Calcium Freisetzung aus dem ER in das Zytoplasma.

CGB ist ein vornehmlich in neuroendokrinen Zellen exprimiertes Protein, welches endoluminal mit dem InsP₃R interagiert und dessen Aktivität positiv moduliert. Wir beschreiben, dass CGB auch in ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert wird und dort die InsP₃R abhängige Calcium Ausschüttung beeinflusst. Es konnte dargestellt werden, dass eine erniedrigte CGB Expression mit verminderter InsP₃R abhängiger Calcium Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) sowie verminderter Brain Natriuretic Peptide (BNP) Promoter Aktivität und BNP Produktion einhergeht, während unter CGB Überexpression eine erhöhte BNP Promoter Aktivität sowie im Hypertrophie Mausmodell eine erhöhte CGB Expression bei erhöhter BNP Produktion festzustellen war. Als involvierter Transkriptionsfaktor wurde dabei Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) identifiziert. In klinischer Hinsicht könnte CGB als neuer Biomarker bei Kardiomyopathien von Bedeutung sein.

NCS-1 ist ein zytoplasmatischer Modulator des InsP₃Rs mit ebenfalls positivem Einfluss. Erst kürzlich ist NCS-1 als Bindungspartner von Paclitaxel beschrieben worden, einem Chemotherapeutikum, welches seine zytostatische Wirkung über eine Bindung an β-Tubulin und damit verbundener Stabilisierung der Mikrotubuli ausübt. In Neuronen rief die Inkubation von Neuronen mit Paclitaxel in einer therapeutischen Konzentration für mehrere Stunden eine Verminderung von NCS-1 hervor, erklärbar durch eine Aktivierung der Calcium abhängigen Protease Calpain, welches NCS-1 enzymatisch abbaut. Daraus resultierte eine verminderte Calcium Freisetzung über den InsP₃R und damit eine gestörte Calcium Homöostase, eine mögliche Erklärung für die Pathogenese Paclitaxel induzierter Polyneuropathie. Im Gegensatz zu Neuronen bewirkte Paclitaxel in Kardiomyozyten keine Aktivierung von Calpain und eine Erhöhung der NCS-1 Expression. Wir zeigten anhand von Lipid Bilayer Experimenten, dass Paclitaxel mit NCS-1 die Öffnungshäufigkeit des InsP₃Rs ca. dreifach steigert. Es resultierte eine vermehrte Calcium Freisetzung über den InsP₃R und eine Zunahme der Frequenz spontaner Calcium Oszillationen. Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz für Paclitaxel induzierte kardiale Arrhythmien.

Einleitung und Zielstellung

Der InsP_3R ist ein ubiquitär am ER/SR vorkommender Calciumionen-Kanal, der InsP_3 aktiviert zum Calciumausstrom aus dem ER/SR in das Zytoplasma führt. Die physiologische und pathophysiologische Rolle des InsP_3Rs ist in zahlreichen Studien und Übersichtsarbeiten untersucht und beschrieben worden [4-13].

Calcium als Second Messenger ist in diversen zellulären Prozessen involviert wie z.B. in der Signaltransduktion, Regulation der Gen- und Proteinexpression sowie Steuerung von Zelldifferenzierung und Zelltod und ist daher wichtig hinsichtlich vieler Aspekte zur Erhaltung der Zell-Homöostase [14]. Es gibt eine Reihe von Mediatoren, die modulierend auf die Aktivität des InsP_3Rs wirken und damit den Calcium-Haushalt beeinflussen können. Dazu gehören auch CGB und NCS-1 [15].

CGB, welches im Lumen des ER neuroendokriner Zellen exprimiert wird und dort als Botenstoff im Rahmen endo- und exozytotischer Prozesse eine Rolle spielt, interagiert funktionell mit allen drei Isoformen des InsP_3Rs [15-17]. In der hier vorgestellten 1. Publikation [1] wurde CGB, welches bisher in neuroendokrinen Zellen bekannt war, zum ersten Mal in neonatalen sowie adulten ventrikulären Kardiomyozyten beschrieben. Zielstellung dieses Projekts war es, die Funktion des CGB in Kardiomyozyten zu untersuchen.

NCS-1 hingegen ist ein zytoplasmatischer Modulator des InsP_3Rs , welches sowohl Calcium abhängig als auch Calcium unabhängig die InsP_3R -Aktivität erhöht [18]. Paclitaxel ist als neuer Bindungspartner von NCS-1 beschrieben worden [19]. Paclitaxel, welches durch eine Bindung an β -Tubulin die Mikrotubuli stabilisiert, findet in der Medizin u. a. als Chemotherapeutikum [20] und als antiproliferative Substanz in Drug-Eluting-Stents Anwendung [21]. Eine Reihe von Nebenwirkungen sind bekannt, die die Anwendung von Paclitaxel erheblich einschränken, u. a. Polyneuropathie und kardiale Arrhythmien [22-24]. Die Diversität der Nebenwirkungen lässt sich durch die Mikrotubuli stabilisierende Wirkung von Paclitaxel nicht hinreichend erklären. Die Interaktion mit NCS-1 kann jedoch neue Ansätze in der Studie Paclitaxel induzierter Nebenwirkungen liefern. In der 2. und 3. hier vorgestellten Arbeit [2, 3] wird die Wirkung von Paclitaxel auf die Calcium-Homöostase in neuronalen Zellen und in Kardiomyozyten untersucht.

Materialien und Methoden

1. Zellkultur und Transfektion

SH-SY5Y Zellkultur: Die Kultivierung der humanen Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y erfolgte wie zuvor beschrieben [25].

Spinalganglien Kultur: Spinalganglien wurden von Neonaten (P1-3) der Sprague-Dawley Ratte isoliert [2].

Kardiomyozyten Kultur: Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden ebenfalls von Neonaten (P1-3) der Sprague-Dawley Ratte isoliert [26].

Plasmide: Zur transienten Verminderung der CGB Expression wurde small interfering RNA (siRNA) angewandt. Eine Co-Transfektion mit DsRed erfolgte zur Markierung erfolgreich mit siRNA transfizierter Zellen. Zur transienten Verminderung der NCS-1 Expression benutzten wir einen Vektor, der grün fluoreszierendes Protein (GFP) und NCS-1 small hairpin RNA (shRNA) exprimiert. GFP diente als Marker für erfolgreich transfizierte Zellen.

2. Live Cell Calcium Imaging

Nach Isolierung der Zellen wurden diese zunächst auf Deckgläschen kultiviert und vor Durchführung der Calcium Messungen für 30 Minuten in eine Pufferlösung getaucht, welche einen fluoreszierenden Calcium Indikator (Fluo-4, Mag-Fluo4, Fura red, Rhod-2, Fura-2) enthält. Anschließend wurden die Deckgläschen in eine mit Puffer (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,6 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 5,6 mM Glukose; pH 7,4) gefüllte Messkammer eingespannt und auf ein Mikroskop platziert. Die zur Untersuchung verwendeten Pharmaka wurden entweder direkt in den Puffer hinzugegeben oder die Messkammer wurde mit Pharmaka haltigem HEPES Puffer perfundiert. Messungen erfolgten mit einem konfokalen Mikroskop (Zeiss). Genauere Angaben finden sich in den jeweiligen Arbeiten [1-3].

3. Biochemie

3.1. Co-Immunopräzipitation:

Spezifische Antikörper wurden an Protein A Partikel adsorbiert und mit Gewebslysate inkubiert. Nach Inkubation über Nacht und mehreren Waschschritten erfolgte die Auftrennung mittels Standard Western Blot Methoden.

3.2. Western Blot:

Zell-/Gewebslysate bzw. Produkte der Immunopräzipitation wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und elektrophoretisch auf PVDF Membranen transferiert. Es erfolgte eine Blockade unspezifischer Bindungsstellen und die Inkubation mit einem spezifischen Erstantikörper über Nacht sowie anschließend die Inkubation mit einem Enzym konjugierten Zweitantikörper, der gegen den Wirt des Erstantikörpers gerichtet war. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemolumineszenz und die quantitative Auswertung durch Densitometrie (UN-SCAN-IT, Silk Scientific Corporation).

3.3. Immunofluoreszenz:

Gewebe oder Zellen in Kultur wurden gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Die Zielproteine wurden mit einem spezifischen Erstantikörper markiert und dieser mit einem gegen den Wirt des Erstantikörpers gerichteten Fluorophor konjugierten Zweitantikörper gekoppelt. Die Visualisierung erfolgte mithilfe eines konfokalen Mikroskops (Zeiss).

3.4. ELISA:

Messungen zur Sekretion und Produktion von BNP wurden mithilfe des AssayMax Rat BNP-45 ELISA Kits (GENTAUR) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.5. Messung der Calpain Aktivität:

Die Calpain Aktivität wurde mittels CalpainGlo™ (Promega Corp) nach den Angaben des Herstellers gemessen. Dabei handelt es sich um ein auf Lumineszenz basiertes Verfahren.

3.6. Verdau von NCS-1:

Purifiziertes μ -Calpain wurde bei 37 °C purifiziertem NCS-1 zugeführt und mit 50 μ M freiem Calcium aktiviert. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und mittels Western Blot analysiert.

3.7. Messung der zellulären Integrität:

Hierzu wurden zwei Standardverfahren angewandt: Die metabolische Integrität der Mitochondrien dient als ein Maß der zellulären Vitalität und wurde mithilfe des kommerziell verfügbaren TOX-2 Kits gemäß Herstellerprotokoll bestimmt (Sigma Aldrich). Des Weiteren gilt der Verlust der Plasmamembran Asymmetrie als ein frühes Zeichen des Zelltodes. Ein kommerziell verfügbares Detektionssystem, basierend auf Fluoresceinisothiocyanat konjugiertem Annexin V, wurde entsprechend Herstellerprotokoll (BD Biosciences) eingesetzt.

3.8. Luciferase Experimente:

Luciferase Reporter Vektoren sowie Assays waren kommerziell erhältlich und wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet [1].

4. Elektrophysiologie

Zur Messung der Einzelkanalaktivität wurde aus Maus-Cerebellum InsP₃R isoliert und anschließend in eine künstliche Lipidmembran inkorporiert. Diese Doppellipidmembran setzte sich aus Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin im Verhältnis 5:3:2 zusammen und trennte eine Kammer in zwei Hälften, welche jeweils das Zytoplasma und das Lumen des ER darstellten. Genaue Ausführungen sind in [16] zu finden.

5. In vivo Experimente

5.1. Behandlung der Mäuse mit Paclitaxel:

C57bl6 Mäuse wurden mit 60 mg/kg Paclitaxel i.p. injiziert und 6 Stunden später geopfert. Herzen wurden extrahiert und mithilfe von RIPA Lysepuffer (Santa Cruz Biotechnology) lysiert.

5.2. Angiotensin II Infusion über Mikroosmotische Pumpe:

Mikroosmotische Pumpen wurden wie beschrieben implantiert [1]. Angiotensin II wurde den Mäusen für 2 Wochen mit einer Rate von 1000 mg/kg/min über die Pumpe zugeführt. Die kardiale Hypertrophie wurde anhand des Ratios Masse linker Ventrikel / Körpergewicht gemessen.

6. Datenanalyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben oder in Form von repräsentativen Graphen dargestellt. Die statistische Analyse der Unterschiede zwischen mehreren Gruppen erfolgte mit einem Einweg ANOVA (Dunnett) und zwischen zwei Gruppen mit einem Standard t-Test (SigmaPlot, Systat Software). Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Oszillationsfrequenzen wurden mit einem Matlab Programm berechnet [27].

Ergebnisse

1. CGB reguliert die InsP₃R abhängige Calcium Signaltransduktion sowie die NF-κB Aktivität und BNP Produktion in Kardiomyozyten

InsP₃R abhängige Calcium Signaltransduktion ist in ventrikulären Kardiomyozyten in Verbindung mit Excitation-Transcription-Coupling (ETC) gebracht worden. Wir zeigten zunächst, dass neonatale sowie adulte ventrikuläre Kardiomyozyten CGB exprimieren, welches im SR zu finden ist und mit allen drei Isoformen des InsP₃Rs interagiert. Somit stellten wir die Hypothese, dass CGB in InsP₃ vermittelter ETC eine Rolle spielt.

In Live Cell Imaging Experimenten erfolgte die Stimulation der Zellen mit Angiotensin II, welches über den Angiotensin-1 (AT1)-Rezeptor eine Produktion von InsP₃ und damit Aktivierung des InsP₃Rs bewirkt. In einer Calcium freien Umgebung führte dies zur Abnahme und anschließenden Regeneration des SR Calciums. Um den Einfluss des CGB zu beurteilen, erfolgten im nächsten Schritt Messungen nach CGB knock down. Hierzu wurden die Zellen co-transfiziert mit CGB siRNA und DsRed (zur Markierung erfolgreich transfizierter Zellen). CGB knock down führte zu einer Verminderung der maximalen Calcium Freisetzung auf 84 ± 2 % und einer Verminderung der Freisetzungsgeschwindigkeit auf 32 ± 13 %.

Es ist bekannt, dass Angiotensin II den BNP mRNA Spiegel über eine Aktivierung des AT1-Rezeptors und die dadurch entstehenden Phosphoinositide erhöht. Wir nahmen daher an, dass Angiotensin II über den InsP₃ Signalweg BNP Transkription und Sekretion beeinflusst. Sowohl die Blockade des AT1-Rezeptors mittels Telmisartan als auch die Blockade des InsP₃Rs mittels 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) konnten die stimulierende Wirkung des Angiotensin II auf BNP aufheben. Weiterhin zeigten wir mittels ELISA, dass CGB knock down Zellen eine Reduktion der BNP Sekretion auf 65 ± 7 % verglichen zur Kontrollgruppe aufwiesen. Auch unter Angiotensin II Stimulation war die BNP Sekretion in der CGB knock down Gruppe erniedrigt. BNP Expression und BNP Sekretion zeigten in der linearen Regression eine starke Korrelation ($r^2 = 0,98$). Dies deutet darauf hin, dass CGB die BNP Produktion auf der transkriptionalen Ebene steuert.

Um die Zusammenhänge zwischen CGB und BNP auf der transkriptionalen Ebene weiter zu untersuchen, wurde ein humaner BNP Promoter Luciferase Reporter (hBNP luc) angewandt. CGB knock down Zellen zeigten eine im Vergleich zur Kontrolle auf 37 ± 6 % erniedrigte Promoter Aktivität. Angiotensin II erhöhte die hBNP luc Aktivität auf 200 ± 9 %. Unter Angiotensin II Stimulation bei CGB knock down war die Aktivität ebenfalls erniedrigt. CGB Überexpression hingegen führte zur erhöhten hBNP luc Aktivität.

Als nächstes versuchten wir, den Transkriptionsfaktor zu identifizieren, der die regulatorische Rolle von CGB auf den BNP Promoter vermittelt. Dabei konnte eine Beeinflussung der Aktivität von NF-κB, nicht jedoch von Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT), dargestellt werden.

Im Hypertrophie Mausmodell zeigte sich, dass adulte ventrikuläre Kardiomyozyten CGB überexprimieren. Die Expression von InsP₃R blieb unverändert.

2. Chronische Exposition mit Paclitaxel vermindert InsP_3R vermittelte Calcium Signale in Neuronen

Verschiedene Studien haben sich bereits mit dem akuten Effekt des Paclitaxel auf den Calcium-Haushalt in unterschiedlichen Zelllinien befasst. Langzeit-Effekte des Paclitaxel blieben bisher eher unberücksichtigt, wobei gerade diese in der klinischen Anwendung interessant sind. In Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y), welche als Modell für periphere Neuronen verwendet werden, bewirkt die akute Exposition mit Paclitaxel die Induktion von Calcium Oszillationen. In dieser Arbeit untersuchten wir die Wirkung von prolongierter Paclitaxel-Exposition.

SH-SY5Y Zellen wurden 6 h entweder mit 800 ng/ml Paclitaxel oder dem Vehikel als Kontrolle inkubiert und anschließend ihre Spontanaktivität mit dem Calcium Indikator Fluo-4 unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

Da die akuten Wirkungen des Paclitaxel auf die InsP_3 -Signalkaskade zurückzuführen war, untersuchten wir diese als nächstes. Adenosintriphosphat (ATP) fördert über eine Aktivierung des P2Y-Rezeptors die InsP_3 -Bildung und damit eine InsP_3R vermittelte Calcium Freisetzung aus dem ER. Zellen, die 6 h mit Paclitaxel inkubiert wurden, zeigten unter ATP-Stimulation einen zytoplasmatischen Anstieg des Calciums auf 321 ± 30 nM im Vergleich zur Kontrolle (733 ± 48 nM) und damit eine signifikante Verminderung der Calcium Freisetzung aus dem ER. Die Expression des P2Y-Rezeptors und des InsP_3Rs sowie die Menge des im ER gespeicherten Calciums ergaben unter Paclitaxelbehandlung keinen signifikanten Unterschied. Die Zellen zeigten nach 6 h Inkubation mit Etoposin B, einem anderen Mikrotubulus stabilisierenden Stoff, oder Colchicin, einem Mikrotubulus abbauenden Stoff, keine Verminderung der Calcium Freisetzung.

Als nächstes wurde NCS-1, ein Modulator des InsP_3Rs und Bindungspartner des Paclitaxel, untersucht. Western Blot Analysen zeigten eine signifikante Verminderung der NCS-1 Expression auf 57 ± 12 % nach 6 h Paclitaxel Inkubation. 26 h nach Expositionsende konnte eine Normalisierung der NCS-1 Proteinmenge und auch der InsP_3R vermittelten Calcium Freisetzung erreicht werden. NCS-1 knock down mittels shRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der Calcium Freisetzung ähnlich wie unter Paclitaxelbehandlung.

Auch in vivo waren die Ergebnisse reproduzierbar. Primäre Spinalganglienzellen von adulten Mäusen, die 6 h mit Paclitaxel behandelt wurden, zeigten analog zu den Befunden in der Zelllinie eine verminderte InsP_3R vermittelte Calcium Freisetzung sowie eine verminderte NCS-1 Expression.

Es wurde zuvor berichtet, dass Inhibition von Calpain, einer Calcium abhängigen Protease, protektiv auf Paclitaxel induzierte Polyneuropathie in Mäusen wirkt. Daher wurde der Einfluss von Calpain als nächstes untersucht. Dabei wiesen Paclitaxel behandelte Zellen eine erhöhte Calpain Aktivität auf. Es konnte ferner in vitro gezeigt werden, dass μ -Calpain NCS-1 enzymatisch spaltet. Die gleichzeitige Anwendung eines Calpain Inhibitors während der 6 h Inkubationszeit mit Paclitaxel verhinderte den Abbau von NCS-1 und damit die Verminderung in der InsP_3R vermittelten Calcium Freisetzung.

3. Paclitaxel erhöht InsP₃R vermittelt die Frequenz spontaner Calcium Oszillationen in Kardiomyozyten

Da Paclitaxel kardiale Arrhythmien verursacht und des Weiteren in Neuronen Auswirkungen auf die InsP₃R vermittelte Calcium Freisetzung gesehen worden sind, stand in dieser Arbeit die Calcium Signaltransduktion in Kardiomyozyten im Mittelpunkt der Untersuchungen. Im Live Cell Imaging Experiment zeigten isolierte neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten spontan einen Anstieg und Abfall der zytoplasmatischen Calciumkonzentration in Form von Oszillationen. Nach 6 h Inkubation mit 800 ng/ml Paclitaxel waren diese weiterhin zu beobachten, jedoch mit einer signifikant höheren Oszillationsfrequenz (141 ± 9 % normiert auf 100 ± 2 %). Etoposin B rief diese Veränderungen nicht hervor. Durch eine Blockade des InsP₃Rs mit Xestospongin D konnte der Unterschied in der Calcium Oszillationsfrequenz zwischen Paclitaxel behandelten und unbehandelten Zellen aufgehoben werden.

In ventrikulären Kardiomyozyten beruht Calcium Freisetzung aus dem SR in erster Linie auf der Integrität des Ryanodin Rezeptors (RyR). Dieser ebenfalls am SR zu findende Calciumionen-Kanal überwiegt deutlich in der Expression im Vergleich zum InsP₃R. Western Blot Analysen zeigten, dass Paclitaxel keine signifikanten Veränderungen in der RyR Expression bewirkt. Stimulation der Zellen mit Koffein, einem RyR Agonisten, bewirkten keinen Unterschied in der Calcium Freisetzung zwischen Paclitaxel behandelten und nicht behandelten Kardiomyozyten, so dass von einer direkten Wirkung des Paclitaxel auf den RyR nicht auszugehen war.

Basierend auf den in Neuronen gewonnenen Vorkenntnissen hinsichtlich der Interaktion zwischen Paclitaxel und NCS-1 wurde als nächstes die Rolle des NCS-1 untersucht. Es ergab sich hier im Gegensatz zu den Befunden in Neuronen eine Erhöhung der NCS-1 Expression. Die InsP₃R Expression war unverändert. Co-Immunopräzipitationen bestätigten eine Interaktion zwischen allen Subtypen des InsP₃Rs und NCS-1.

Stimulation der Kardiomyozyten mit Endothelin, welches über die Bindung an ETA-Rezeptoren eine InsP₃ Produktion und somit InsP₃R Aktivierung hervorruft, bewirkte eine verstärkte Calcium Freisetzung bei Paclitaxel behandelten Zellen (133 ± 3 %). Hingegen führte NCS-1 knock down mittels shRNA zu einer verminderten Calcium Freisetzung unter Endothelin Stimulation (73 ± 4 %).

Weiterhin erfolgten Untersuchungen auf der Ebene des Einzelkanals. Hierzu wurde der InsP₃R aus Gewebe isoliert und in eine künstlich erschaffene Doppellipidmembran (Lipid Bilayer) fusioniert. Anschließend wurden elektrophysiologische Messungen vorgenommen. Gabe von purifiziertem NCS-1 führte zu einer Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit des InsP₃Rs. Zusätzliche Gabe von Paclitaxel bewirkte eine ca. dreifache Steigerung der Öffnungshäufigkeit, die Öffnungsdauer blieb unbeeinträchtigt. Die Gabe von Paclitaxel allein ohne NCS-1 hatte keinen Effekt auf die Funktion des InsP₃Rs.

Da Paclitaxel in Neuronen zu einer Aktivierung von Calpain und konsekutiver Degradation von NCS-1 führte, untersuchten wir als nächstes die Calpain-Aktivität. Diese zeigte sich nicht signifikant verändert.

Diskussion

1. Mögliche Rolle der CGB/InsP₃R Interaktion im Rahmen der kardialen Hypertrophie

Wir beschreiben zum ersten Mal die Expression von CGB in neonatalen und adulten ventrikulären Kardiomyozyten sowie dessen Rolle in der Regulation der InsP₃R vermittelten Calcium Signaltransduktion sowie NF- κ B Aktivierung und BNP Produktion.

Die InsP₃R abhängige Calcium Signaltransduktion ist in ventrikulären Kardiomyozyten mit ETC in Verbindung gebracht worden [28]. Als multifunktionaler Second Messenger vermittelt Calcium seine Signalspezifität über eine Variation und Kombination von Dauer, Frequenz und Amplitude der Calcium Signale [29]. CGB modifiziert zwei Eigenschaften, nämlich die Amplitude und Freisetzungsgeschwindigkeit, und beeinflusst auf transkriptionaler Ebene die BNP Promoter Aktivität und damit BNP Produktion. Obwohl dem Calcineurin/NFAT Signalweg eine zentrale Rolle in InsP₃/Calcium vermittelter Hypertrophie zugeschrieben worden ist [30, 31], konnten wir hier keinen Einfluss feststellen. Interessanterweise jedoch fand sich ein Zusammenhang mit NF- κ B, einem anderen Calcium abhängigen Transkriptionsfaktor. Während CGB knock down InsP₃R abhängige Calcium Ausschüttung, NF- κ B Aktivität und BNP Produktion erniedrigte, verursachte CGB Überexpression das Gegenteil. Im Hypertrophie Mausmodell zeigte sich parallel zur BNP Erhöhung eine Überexpression von CGB.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass CGB im hypertrophierten Ventrikel überexprimiert die InsP₃R vermittelte Calciumausschüttung fördert und damit NF- κ B Aktivität und BNP Produktion steigert. Neben BNP, welches im klinischen Alltag bereits eine etablierte Rolle als Biomarker der Herzinsuffizienz spielt, ist zukünftig eine Bedeutung von CGB als neuer Biomarker denkbar.

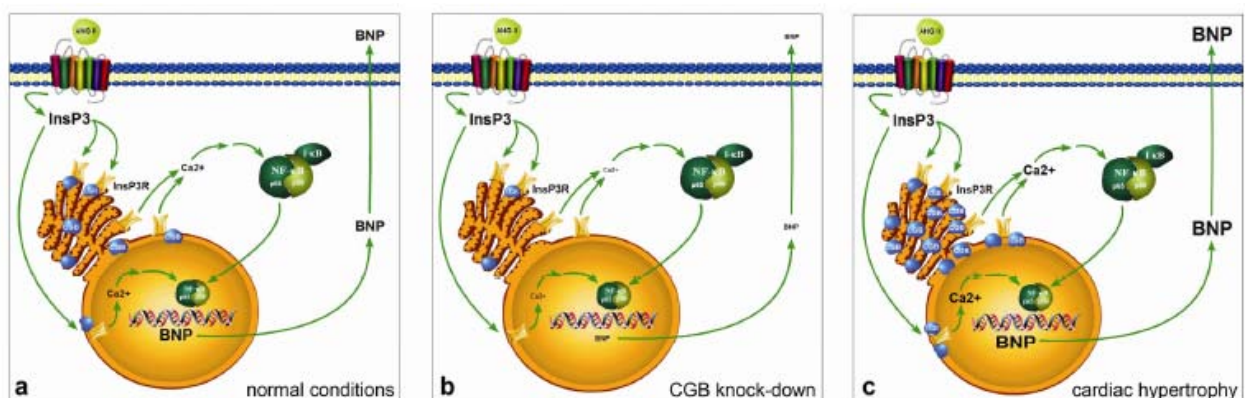


Abb. 1 Zusammenfassendes Modell [1]. A) CGB befindet sich im Lumen des SR und beeinflusst die Calcium Freisetzung aus dem SR über eine Modulation des InsP₃Rs. B) Verminderte Expression von CGB führt zu verminderter Calcium Freisetzung über den InsP₃R und erniedrigter NF- κ B Aktivität sowie BNP Produktion. C) Überexpression von CGB, zu beobachten bei Angiotensin II induzierter Hypertrophie, führt zu vermehrter Calcium Freisetzung und erhöhter NF- κ B Aktivität und BNP Produktion.

2. Mögliche Rolle der NCS-1/InsP₃R Interaktion in der Pathogenese Paclitaxel induzierter Nebenwirkungen in Neuronen und im Herzen

Paclitaxel als Mikrotubulus stabilisierende Substanz findet sowohl in der Klinik als auch in der Grundlagenforschung seine Anwendung. Eingeschränkt wird seine klinische Anwendung vor allem durch eine Reihe von Nebenwirkungen. Vor diesem Hintergrund und der erst kürzlich entdeckten Interaktion des Paclitaxel mit NCS-1, einem Modulator des InsP₃Rs, zeigen unsere Ergebnisse, dass die NCS-1/InsP₃R Interaktion einen möglichen Erklärungsansatz für die Pathogenese spezifischer Nebenwirkungen des Paclitaxel bietet.

In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde eine kausale Rolle der intrazellulären Calcium Homöostase in Paclitaxel induzierter Polyneuropathie beschrieben [32-34]. Wir zeigen, dass eine prolongierte Inkubation mit einer therapeutischen Konzentration von Paclitaxel eine Aktivierung von μ -Calpain bewirkt, welches proteolytisch NCS-1 abbaut und damit in einem Negativ Feedback zu einer Verminderung der NCS-1 Expression und InsP₃R vermittelten Calcium Freisetzung aus dem ER führt. Die Anwendung eines Calpain Inhibitors konnte diesen Pathomechanismus verhindern. Im Einklang dazu zeigen die Ergebnisse von Wang et al., dass Calpain Inhibitoren präventiv bei Mäusen mit Paclitaxel induzierter Polyneuropathie wirken [35].

In Kardiomyozyten führte die Behandlung mit Paclitaxel zu einer Erhöhung der Frequenz spontaner Calcium Oszillationen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in Neuronen kam es hier zu einer Überexpression von NCS-1. Da μ -Calpain in Kardiomyozyten in der frühesten neonatalen Periode herunterreguliert wird [36], konnte hinsichtlich der Calpain Aktivität nach Paclitaxel Behandlung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Untersuchungen auf der Ebene eines einzelnen in eine Lipidmembran fusionierten Kanals demonstrierten, dass Paclitaxel über NCS-1 die Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors ca. dreifach steigert. In unserem Modell führen sowohl die direkte Interaktion des Paclitaxel mit NCS-1 als auch die erhöhte NCS-1 Expression dazu, dass es zu einer vermehrten Calcium Antwort auf InsP₃ kommt, welche vermutlich durch „calcium induced calcium release“ zu einer zusätzlichen Calcium Freisetzung über RyR Rezeptoren und damit erhöhten Frequenz spontaner Calcium Oszillationen führt. Eine arrhythmogene Potenz dieser Veränderungen ist denkbar [37, 38].

Zusammengefasst tragen diese Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Pathomechanismen Paclitaxel induzierter Nebenwirkungen bei und können den Weg zu neuen Behandlungsstrategien aufweisen.

Referenzen

- [1] Heidrich FM, Zhang K, Estrada M, Huang Y, Giordano FJ, Ehrlich BE. Chromogranin B regulates calcium signaling, nuclear factor kappaB activity, and brain natriuretic peptide production in cardiomyocytes. *Circulation research*. 2008 May 23;102(10):1230-8.
- [2] Boehmerle W, Zhang K, Sivula M, Heidrich FM, Lee Y, Jordt SE, et al. Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Jun 26;104(26):11103-8.
- [3] Zhang K, Heidrich FM, DeGray B, Boehmerle W, Ehrlich BE. Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Nov;49(5):829-35.
- [4] Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 1998;395(6703):645-8.
- [5] Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews*. 2003 Jul;4(7):517-29.
- [6] Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich BE. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P3- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. 1991 Jun 27;351(6329):751-4.
- [7] Bezprozvanny I. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 2005;38(3-4):261-72.
- [8] Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993;361(6410):315-25.
- [9] Jacob SN, Choe CU, Uhlen P, DeGray B, Yeckel MF, Ehrlich BE. Signaling microdomains regulate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium transients in cultured neurons. *J Neurosci*. 2005 Mar 16;25(11):2853-64.
- [10] Johenning FW, Zochowski M, Conway SJ, Holmes AB, Koulen P, Ehrlich BE. Distinct intracellular calcium transients in neurites and somata integrate neuronal signals. *J Neurosci*. 2002;22(13):5344-53.
- [11] Tang TS, Tu H, Chan EY, Maximov A, Wang Z, Wellington CL, et al. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron*. 2003;39(2):227-39.
- [12] Estrada M, Varshney A, Ehrlich BE. Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Jun 27.
- [13] Du XJ, Anderson KE, Jacobsen A, Woodcock EA, Dart AM. Suppression of ventricular arrhythmias during ischemia-reperfusion by agents inhibiting Ins(1,4,5)P3 release. *Circulation*. 1995 Jun 1;91(11):2712-6.
- [14] Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1047-58.
- [15] Choe CU, Ehrlich BE. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE*. 2006 Nov 28;2006(363):re15.
- [16] Thrower EC, Choe CU, So SH, Jeon SH, Ehrlich BE, Yoo SH. A functional interaction between chromogranin B and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Dec 12;278(50):49699-706.
- [17] Yoo SH, Oh YS, Kang MK, Huh YH, So SH, Park HS, et al. Localization of three types of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca(2+) channel in the secretory granules and coupling with the Ca(2+) storage proteins chromogranins A and B. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Dec 7;276(49):45806-12.
- [18] Schlecker C, Boehmerle W, Jeromin A, DeGray B, Varshney A, Sharma Y, et al. Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1668-74. Epub 2006 May 11.
- [19] Boehmerle W, Splittgerber U, Lazarus MB, McKenzie KM, Johnston DG, Austin DJ, et al. Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18356-61. Epub 2006 Nov 17.
- [20] Rowinsky EK. Paclitaxel pharmacology and other tumor types. *Seminars in oncology*. 1997 Dec;24(6 Suppl 19):S19-1-S-2.
- [21] Woods TC, Marks AR. Drug-eluting stents. *Annual review of medicine*. 2004;55:169-78.
- [22] Mielke S, Sparreboom A, Mross K. Peripheral neuropathy: a persisting challenge in paclitaxel-based regimens. *Eur J Cancer*. 2006;42(1):24-30. Epub 2005 Nov 15.
- [23] Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*. 1993;20(4 Suppl 3):1-15.
- [24] Rowinsky EK, McGuire WP, Guarnieri T, Fisherman JS, Christian MC, Donehower RC. Cardiac disturbances during the administration of taxol. *J Clin Oncol*. 1991;9(9):1704-12.

- [25] Estrada M, Uhlen P, Ehrlich BE. Ca²⁺ oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 4):733-43. Epub 2006 Jan 31.
- [26] Uhlen P, Burch PM, Zito CI, Estrada M, Ehrlich BE, Bennett AM. Gain-of-function/Noonan syndrome SHP-2/Ptpn11 mutants enhance calcium oscillations and impair NFAT signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2160-5. Epub 006 Feb 3.
- [27] Uhlen P. Spectral analysis of calcium oscillations. *Sci STKE.* 2004;2004(258):pl15.
- [28] Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, et al. Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *The Journal of clinical investigation.* 2006 Mar;116(3):675-82.
- [29] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627):855-8.
- [30] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews.* 2006 Aug;7(8):589-600.
- [31] Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2004 Jan 9;94(1):110-8.
- [32] Siau C, Bennett GJ. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. *Anesth Analg.* 2006;102(5):1485-90.
- [33] Kidd JF, Pilkington MF, Schell MJ, Fogarty KE, Skepper JN, Taylor CW, et al. Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 2002;277(8):6504-10. Epub 2001 Nov 27.
- [34] Mironov SL, Ivannikov MV, Johansson M. [Ca²⁺]_i signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum in neurons is regulated by microtubules. From mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J Biol Chem.* 2005;280(1):715-21. Epub 2004 Oct 29.
- [35] Wang MS, Davis AA, Culver DG, Wang Q, Powers JC, Glass JD. Calpain inhibition protects against Taxol-induced sensory neuropathy. *Brain.* 2004;127(Pt 3):671-9. Epub 2004 Feb 4.
- [36] Ahuja P, Perriard E, Pedrazzini T, Satoh S, Perriard JC, Ehler E. Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy. *Experimental cell research.* 2007 Apr 1;313(6):1270-83.
- [37] Ter Keurs HE, Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiological reviews.* 2007 Apr;87(2):457-506.
- [38] Lakireddy V, Bub G, Baweja P, Syed A, Boutjdir M, El-Sherif N. The kinetics of spontaneous calcium oscillations and arrhythmogenesis in the in vivo heart during ischemia/reperfusion. *Heart Rhythm.* 2006 Jan;3(1):58-66.

Die Promovendin hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1:

Heidrich FM, **Zhang K**, Estrada M, Huang Y, Giordano FJ, Ehrlich BE. Chromogranin B regulates calcium signaling, NF- κ B activity and BNP production in cardiomyocytes. *Circ Res.* 2008 May 23;102(10):1230-8.

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung von Luciferase Experimenten sowie Western Blots und deren Auswertung. Mitarbeit bei der Revision des Manuskripts.

Publikation 2:

Boehmerle W, **Zhang K**, Sivula M, Heidrich FM, Lee Y, Jordt SE, Ehrlich BE. Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 26;104(26):11103-8.

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung von Western Blots sowie aller Experimente im Anhang und deren Auswertung. Mitarbeit bei der Revision des Manuskripts.

Publikation 3:

Zhang K, Heidrich FM, DeGray B, Boehmerle W, Ehrlich BE. Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Nov; 49(5):829-35.

90 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung aller Experimente, bis auf die Injektion adulter Mäuse und Teile der Bilayer Experimente. Auswertung aller Daten und ihre graphische Aufbereitung sowie Schreiben und Revision des Manuskripts.

Berlin, den 01.08.2011 _____

(Kun Zhang)

Publikation 1

Publikation 2

Publikation 3

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Veröffentlichte Artikel

Apfel CC, **Zhang K**, George E, Jalota L, Heidrich FM, Pergolizzi JV, Cakmakkaya OS, Kranke P. Transdermal Scopolamine for the Prevention of Postoperative Nausea and Vomiting: A Systematic Review and Meta-analysis. Clin Ther. 2010 Nov; 32(12):1987-2002.

Zhang K, Heidrich FM, DeGray B, Boehmerle W, Ehrlich BE. Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R. J Mol Cell Cardiol. 2010 Nov; 49(5):829-35.

Heidrich FM, **Zhang K**, Estrada M, Huang Y, Giordano FJ, Ehrlich BE. Chromogranin B regulates calcium signaling, NF- κ B activity and BNP production in cardiomyocytes. Circ Res. 2008 May 23;102(10):1230-8.

Boehmerle W, **Zhang K**, Sivula M, Heidrich FM, Lee Y, Jordt SE, Ehrlich BE. Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jun 26;104(26):11103-8.

Abstracts

Zhang K, Heidrich FM, Cakmakkaya OS, Shi S, Apfel CC. Transdermal scopolamine for the prevention of postoperative nausea and vomiting: A meta-analysis. ASA 2009 annual meeting.

Heidrich FM, **Zhang K**, Cakmakkaya OS, Stader A, Apfel CC. Risk Factors for Postoperative Nausea and Vomiting (PONV): A Meta-Analysis of Independent Predictors. ASA 2009 annual meeting.

Heidrich FM, **Zhang K**, Estrada M, Huang Y, Giordano FJ, Ehrlich BE. Chromogranin B impacts calcium dependent and NF- κ B mediated cardiac hypertrophy. 2008 Biophysical Society Meeting Abstracts. Biophysical Journal. 2008 94: 455-Pos.

Zhang K, Heidrich FM, Ehrlich BE. NCS-1 is a Potential Therapeutic Target for Avoiding Bradycardia and Optimizing Cancer Chemotherapy with Paclitaxel. Circulation. 2007; 116:II_281.

(Stand 01.08.2011)

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Kun Zhang, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

*„Die pathophysiologische Rolle des Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptors
und seiner Modulatoren“*

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 01.08.2011 _____
(Kun Zhang)

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Barbara Ehrlich bedanken für die Ermöglichung eines in vielerlei Hinsicht lehrreichen Forschungsaufenthaltes in New Haven.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dietmar Schmitz für seine äußerst kompetente und konstruktive Betreuung bedanken.

Mein spezieller und innigster Dank geht an meine Familie. Auch möchte ich mich bei allen Freunden und Kollegen bedanken, die mir unterstützend zur Seite standen.

Nicht zuletzt danke ich der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle Unterstützung.