Aus der Klinik für Neurologie mit experimenteller Neurologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

"Untersuchung der Suramin-induzierten Neurotoxizität im Zellmodell"

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

David von der Ahe aus Marburg a. d. Lahn

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1		Z	usammenfassung (Abstract)	7
	1.1	De	eutsch	7
	1.2	Er	nglisch	8
2		Ei	inleitung	10
	2.1	Di	ie Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie (CIPN)	10
	2.2	Ve	eränderungen der intrazellulären Calciumhomöostase im Rahmen der CIPN	12
	2.3	Su	ıramin-Hexanatriumsalz	14
	2.3	.1	Chemische Eigenschaften und Substanzursprung	14
	2.3	.2	Klinische Anwendung, unerwünschte Arzneimittelwirkungen und relevante pharmakokinetische Eigenschaften des Suramins	14
	2.3	.3	Wirk- und Pathomechanismen	17
	2.4	Re	elevante Ionenkanäle der zellulären Calciumhomöostase	18
	2.4	.1	Spannungsabhängige Calciumkanäle (VGCC)	19
	2.4	.2	Transient-Rezeptor-Potential- Kanäle (TRP-Kanäle)	19
	2.5	Zi	elsetzung der vorliegenden Arbeit	20
3		Μ	laterial und Methoden	22
	3.1	Μ	aterial	22
	3.2	Sp	vinalganglienzellkultur	26
	3.2	.1	Beschichtung der Zellkulturgefäße	26
	3.2.	.2	Präparation der Spinalganglien	26
	3.2.	.3	Aufarbeitung der Spinalganglien	26
	3.2	.4	Zellzählung	27
	3.2	.5	Anlegen der Zellkultur	27
	3.3	Μ	TT-Assay	28
	3.3	.1	Testprinzip	28
	3.3	.2	Durchführung	28

3.4 Cytotox-Fluor Cytotoxicity Assay TM
3.4.1 Testprinzip
3.4.2 Durchführung
3.5 Caspase-Assay
3.5.1 Testprinzip
3.5.2 Durchführung
3.6 Calcium-Imaging
3.6.1 Prinzip
3.6.2 Durchführung
3.7 Fluoreszenzbestimmung
3.7.1 Fluoreszenzeigenschaften von Suramin
3.7.2 Fluoreszenzeigenschaften des Suramins unter dem Fluoreszenzmikroskop
3.8 Statistische Auswertung
4 Ergebnisse
4.1 Suramin-Dosisfindung
4.2 Calciumeinstrom in Spinalganglienzellen unter Suraminbehandlung
4.2.1 Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum
4.2.2 Variable Dynamik des Calciumeinstroms
4.3 Untersuchung von membranständigen Ionenkanälen in Spinalganglienzellen unter Suraminbehandlung41
4.3.1 Auswirkungen von spezifischen Ionenkanalinhibitoren auf die metabolische Aktivität
4.3.2 Auswirkungen von spezifischen Ionenkanalinhibitoren auf den Calciumeinstrom46
4.4 Untersuchung der Apoptoseinduktion in Suramin behandelten Spinalganglienzellen47
4.4.1 Inhibition von Enzymen der Apoptosekaskade unter Suraminbehandlung47
4.4.2 Caspase-Aktivität nach Suraminbehandlung49
4.5 Untersuchung der Interaktion des Suramins mit Luminophoren
4.5.1 Absorptionsmessungen des Suramins

	4.5.2	Fluoreszenzbestimmung
5		Diskussion53
	5.1	Neurotoxische Wirkung des Suramins in-vitro53
	5.1.1	Die Spinalganglienzellkultur als Modell zur Messung der Neurotoxizität53
	5.1.2	MTT-Assay als Messinstrument der Toxizität55
	5.2	Der Suramin-induzierte Calciumeinstrom in Spinalganglienzellen
	5.2.1	Die Vermittler des Suramin-induzierten Calciumeinstroms
	5.2.2	Subpopulationen von Spinalganglienzellen und die unspezifische Wirkung des Suramins
	5.2.3	Spinalganglienzellen zwischen Calciumdyshomöostase und Zelltod
	5.3	Experimentelle Interaktionen des Suramins62
	5.3.1	Interaktion des Suramins mit Fluoreszenz- und Lumineszenz-Assays
	5.3.2	Suramin-Interaktion mit der Zellkulturbeschichtung
	5.4	Allgemeine Limitationen
	5.5	Schlussfolgerung und Ausblick67
6		Literaturverzeichnis
7		Eidesstattliche Versicherung77
8		Lebenslauf79
9		Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μl	Microliter
μM	micromolar
Abb.	Abbildung
AIDS	engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome – erworbenes Immundfizienzsyndrom
AIF	Apoptose-induzierender-Faktor
AM	Acetoxy-Methylester
ANOVA	engl. Analysis of variance - Varianzanalyse
Aq. dest.	destilliertes Wasser
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calcium Chlorid
Caspase-Assay	Caspase-Glo® 3/7 Assay
CIPN	Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTR	Kontrolle
Cytotox-Assay	Cytotox-Fluor Cytotoxicity Assay TM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxy-ribo-nukleinsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat. <i>et alii</i>
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
griech.	griechisch
h	Stunde
HBSS	engl. Hanks buffered salt solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
InsP ₃	Inositoltriphosphat
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kalium-Hydrogen-Phosphat
lat.	lateinisch
LM	Lösungsmittel
Max.	Maximum
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute(n)
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mM	millimolar

ms	Millisekunde(n)
MTT	3(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
MW	Mittelwert
Ν	Anzahl
NaCL	Natrium Chlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGF	engl. Nerve growth factor - Nervenwachstumsfaktor
nM	nanomolar
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PLL	Poly-L-Lysin
PNS	peripheres Nervensystem
R	Ratio
R _{max}	maximale Fluoreszenzratio
R _{min}	minimale Fluoreszenzratio
ROI	engl. Region of interest – Region von Interesse
RT	Raumtemperatur
SD	engl. Standarddiviation - Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TRP	Transient Rezeptor Potential
VGCC	engl. Voltage gated calcium channel – spannungsabhängige
	Calciumkanäle
VS.	lat. versus
z.B.	zum Beispiel
Δ	griech. Delta – Differenz

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Wirkmechanismen des Suramins	17
Tabelle 2:	Substanzen und Lösungen	
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 4:	Geräte	24
Tabelle 5:	Software	25
Tabelle 6:	HEPES Puffer	25
Tabelle 7:	Kriterien zur Gruppeneinteilung der Spinalganglienzellen anhand des Calciumprofils	40
Tabelle 8:	Inhibitoren membranständiger Ionenkanäle	42

1 Zusammenfassung (Abstract)

1.1 Deutsch

Einleitung: Die Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie (CIPN) ist eine der häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter Chemotherapie bei Tumorpatienten. Bisher sind die jeweiligen Pathomechanismen unzureichend geklärt. Folglich existieren keine adäquaten Therapieansätze. Betroffene Patienten leiden unter einer eingeschränkten Lebensqualität und können teilweise aufgrund dieser dosislimitierenden Nebenwirkung nicht optimal behandelt werden. Es sind verschiedene Substanzen bekannt, die das Auftreten einer CIPN bewirken können. Interessanterweise haben Studien gezeigt, dass der neurotoxische Effekt der Chemotherapeutika Salynomycin und Paclitaxel mit dem Auftreten einer Calciumdyshomöostase zusammenhängt. Bemerkenswert ist, dass auch die Neurotoxizität Suramins mit einer gestörten Calciumhomöostase in Verbindung gebracht wurde.

Suramin ist ein seit 1916 bekanntes Antiprotozoikum, das in tierexperimentellen und klinischen Studien auch im Rahmen verschiedener Tumorentitäten eingesetzt wurde. Insgesamt wurden zahlreiche Wirkmechanismen dieser Substanz beschrieben. Außerdem verursacht Suramin zahlreiche Nebenwirkungen. Häufig stellt eine zumeist periphere, axonale und sensomotorische Polyneuropathie einen dosislimitierenden Faktor dar.

Gegenstand dieser Arbeit war es, den zugrundeliegenden Pathomechanismus der Neurotoxizität Suramins zu untersuchen, um das Verständnis der Pathophysiologie der CIPN allgemein zu erweitern und spezifische therapeutische Ansatzmöglichkeiten zu beleuchten.

Methodik: Für die Untersuchungen wurden primäre Spinalganglienzellkulturen aus Ratten-Neonaten (P 0-3) gewonnen. Zur Messung des intrazellulären Calciumgehalts erfolgten Calcium-*Imaging* Experimente unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2. Des Weiteren untersuchten wir, unter Verwendung spezifischer Inhibitoren, die Bedeutung verschiedener spannungsabhängiger Calcium (VGCC)- sowie Transient-Rezeptor-Potential-(TRP) Kanäle im Rahmen der Suramin-vermittelten Neurotoxizität. Die Evaluation der Zellvitalität erfolgte mittels MTT-Assay.

Ergebnisse: Wir konnten zeigen, dass Suramin zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium in das Cytosol von Spinalganglienzellen führt. Der L-Typ VGCC-Inhibitor Nimodipin konnte diesen Calciumeinstrom signifikant vermindern und die zelluläre Vitalität signifikant steigern. Allerdings wurde die toxische und Calcium-induzierende Wirkung Suramins nicht vollständig durch Nimodipin antagonisiert. Die Inhibition des TRPV4 Kanals zeigte diesbezüglich uneindeutige Ergebnisse. Darüber hinaus traten experimentelle Interaktionen Suramins mit

Fluoreszenz und Lumineszenz-Assays auf. Dies führten wir am ehesten auf eine Interaktion mit den jeweiligen Luminophoren zurück. Außerdem zeigte sich unter Suramin eine verminderte zelluläre Adhäsion. Unter Berücksichtigung der Literatur machten wir eine Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen hierfür verantwortlich.

Schlussfolgerung: Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir die Bedeutung der Calciumhomöostase im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge der CIPN allgemein verdeutlichen. Im Speziellen ließen sich membranständige Ionenkanäle als Vermittler des Suramin-induzierten Calciumeinstroms und der dadurch bedingten Neurotoxizität identifizieren. Jedoch wird insgesamt deutlich, dass Suramin unspezifische Bindungseigenschaften besitzt und so pleiotrope Effekte auf verschiedenste Zielstrukturen ausübt. Dies bedingt eine äußerst komplexe Handhabung dieser Substanz sowohl im klinischen als auch im experimentellen Einsatz. Die dargestellten Interaktionen sollten insbesondere für die weitere experimentelle Verwendung Suramins genauer untersucht werden.

1.2 Englisch

Introduction: Chemotherapy induced polyneuropathy (CIPN) is one of the most frequent side effects of chemotherapy treated tumor patients. Pathomechanisms and consequently therapeutic strategies remain to be elucidated. Affected patients suffer from a reduced quality of life and might not be treated with the optimal treatment regimen because of this dose limiting side effect.

Several chemotherapeutic compounds are known to induce CIPN. Intriguingly studies have shown that the neurotoxic effect of Salinomycin and Paclitaxel is linked to a disturbance of cellular calcium homeostasis. In this context, it is of interest that Suramin induced neurotoxicity was proposed to be linked to calcium dyshomeostasis as well.

The antiprotozoic agent Suramin is known since 1916. Suramin was also shown to have diverse antitumor activities. It also causes various side effects. One of the most frequent dose limiting side effects being a predominantly axonal and peripheral sensorimotor neuropathy.

We investigated the pathomechanism of Suramin neurotoxicity in order to improve the understanding of CIPN pathophysiology in general and to elucidate specific therapeutic targets.

Methods: We used primary dorsal-root-ganglion cell (DRGC) cultures from rat neonates (P 0-3). Intracellular calcium levels were measured via Calcium-Imaging using the fluorescent dye Fura-2. Moreover, we investigated the impact of voltage gated calcium channels (VGCC) and Transient-Receptor-Potential-(TRP) channels on Suramin neurotoxicity using the MTT cell-viability assay.

Results: We were able to show that Suramin induces an influx of extracellular calcium into the cytosol of DRGCs. The L-type VGCC inhibitor Nimodipine reduced Suramin induced calcium

influx significantly and improved viability of Suramin treated cells. Nevertheless, Nimodipine could not reverse Suramin induced impairment of cell viability and calcium influx completely. The inhibition of the TRPV4 channel showed ambiguous results.

We also observed interactions of Suramin with fluorescence- and luminescence assays and hypothesized a direct interaction of Suramin with luminophores. Moreover, Suramin impaired cellular adhesion. With reference to the published literature we linked this phenomenon to interactions of Suramin with extracellular matrix proteins such as Laminin.

Conclusion: Altogether our experiments emphasize the relevance of a calciumdyshomeostasis in the pathophysiology of CIPN in general. Furthermore, we could identify ion channels in the plasma membrane as potential mediators of Suramin induced calcium influx and subsequent neurotoxicity. Nevertheless, it becomes clear that Suramin possesses unspecific binding properties which result in pleiotropic effects of this substance. This causes a very complex handling of Suramin in both experimental and clinical uses. For further experimental use of Suramin the described interactions should be investigated in more detail.

2 Einleitung

2.1 Die Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie (CIPN)

Die toxische Neuropathie ist nach hämatologischen Nebenwirkungen eine der häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter Chemotherapie bei Tumorpatienten. Da die Inzidenz von neoplastischen Erkrankungen im Zusammenhang mit dem demographischen Wandel eine ansteigende Tendenz aufweist, kommt einer optimalen sowie nebenwirkungsarmen Therapie eine besondere Bedeutung zu. Für typische Nebenwirkungen wie Myelosuppression oder Nausea sind mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren oder antiemetischen Medikamenten wirksame Therapieregime bekannt, sodass die CIPN zunehmend einen dosislimitierenden Faktor der antienoplastischen Therapie darstellt. Dies führt zu einer suboptimalen Tumortherapie mit einer ggf. konsekutiv geringeren Lebenserwartung der Patienten ^{1,2}.

Insgesamt ist es interessant, dass antineoplastische Substanzen, die vor allem auf sich schnell teilende Tumorzellen einen starken zytotoxischen Effekt ausüben, auch postmitotische Nervenzellen schädigen ³. Die Lage außerhalb der Blut-Hirn-Schranke und Versorgung durch fenestrierte Kapillaren ist ein wichtiger Aspekt für die Vulnerabilität der peripheren Nervenzellen. Des Weiteren sind periphere Nervenzellen, welche mit ihren Axonen die längsten Zellen des menschlichen Körpers darstellen, besonders anfällig für Substanzen, die den Energiemetabolismus und das axonale Transportsystem schädigen ¹. Auch eine schon vorher bestehende Polyneuropathie scheint das Auftreten der CIPN zu begünstigen. Aufgrund dessen stellen Vitaminmangelzustände oder Erkrankungen wie Diabetes mellitus prädisponierende Faktoren für das Auftreten einer CIPN dar. Außerdem wurden mittlerweile genetische Polymorphismen z.B. im Zusammenhang mit Vincristin oder Paclitaxel beschrieben, welche das Auftreten einer CIPN begünstigen ^{2,4,5}. Die genauen Pathomechanismen der CIPN sind jedoch substanzspezifisch und größtenteils nicht genau geklärt.

Bei den meisten Substanzen kommt es zu axonalen Schäden sowie einer Neuronopathie von Nervenzellkörpern, hierbei sind Spinalganglienzellen eine der häufigsten Zielstrukturen der verursachenden Substanzen^{2,6}.

So wie die zugrundeliegenden Pathomechanismen unterscheiden sich auch Prävalenz und die klinischen Manifestationen der CIPN je nach verwendeter Substanzklasse. Zu den Chemotherapeutika, welche häufig mit dem Auftreten einer Neuropathie assoziiert sind, zählen unter anderem Platinderivate, Taxane, Vinca-Alkalloide, Bortezomib oder Suramin^{2,7}. In einem systematischen *Review* (engl. Zusammenfassung) von 2014 wurde die Prävalenz der CIPN mit 68,1% einen Monat nach Chemotherapie sowie mit 30% sechs Monate nach Chemotherapie

angegeben⁸. Hierbei wurden ausschließlich Studien zu den obengenannten Substanzgruppen untersucht. Insgesamt sind die Angaben zur Prävalenz der CIPN allerdings sehr variabel.

Klinisch manifestiert sich die CIPN meistens in Form von einer distalen, strumpf- und handschuhförmigen, sensiblen Neuropathie. Dabei können "Negativ"- von "Positivsymptomen" unterschieden werden. Bei Auftreten einer "Negativsymptomatik" kommt es zu Hypästhesie, Hypalgesie oder Pallhypästhesie, also zum Ausfall sensibler Qualitäten. Zu den "Positivsymptomen" hingegen zählen das Auftreten von Schmerzen, Parästhesien, Dysästhesien und einer Allodynie ⁹. Des Weiteren kann es zur Beteiligung des motorischen und vegetativen Nervensystems kommen ^{1,7}. Insgesamt führt die Symptomatik zu Funktionsverlusten und einer herabgesetzten Lebensqualität. Je nach Dauer und Dosis der antineoplastischen Therapie kann sich die Symptomatik im Anschluss an die Behandlung wieder vollständig bessern. Häufig kommt es jedoch nur zu einer unvollständigen Reversibilität der Beschwerden ⁷.

Zwar liegen zahlreiche präklinische Untersuchungen zu Interventionsmöglichkeiten bei der CIPN vor. allerdings konnte bislang keine effektive, präventiv oder kausal wirkende Therapie zur routinemäßigen Anwendung etabliert werden. Insbesondere das unzureichende pathomechanistische Verständnis stellt hierbei ein Problem dar. Denn zusätzlich zum Nachweis der Wirksamkeit auf die neurologische Symptomatik ist die Frage relevant, ob sich eine Interventionsstrategie negativ auf die Effektivität der antineoplastischen Therapie auswirkt³. Für die symptomatische Behandlung von "Positivsymptomen" im Rahmen der CIPN wurden bislang ähnliche Therapieansätze wie bei schon etablierten Therapien für den z.B. im Verlauf eines Diabetes mellitus auftretenden neuropathischen Schmerz untersucht. Diesbezüglich konnten z.B. unter Verwendung von Duloxetin 10 positive Resultate erzielt werden. Insgesamt entbehrt aber auch die symptomatische Therapie einer in großem klinischem Umfang nachgewiesenen Wirksamkeit und zeigt zum Teil eine heterogene Datenlage. So beschrieben z.B. Durand et al. zunächst einen positiven Effekt von Venlafaxin im Rahmen der CIPN¹¹, wohingegen Zimmermann et al. diesen nicht nachweisen konnten¹².

Aufgrund der dargestellten Aspekte ist eine weitere Untersuchung möglicher Pathomechanismen und therapeutischer Ansätze der CIPN essentiell. Darüber hinaus bietet dieses Krankheitsmodell einmalige therapeutische Möglichkeiten für eine zeitlich limitierte Form der medikamentösen Intervention, da Schädigungszeitpunkt, -dauer und -intensität genau bekannt sind ¹³.

2.2 Veränderungen der intrazellulären Calciumhomöostase im Rahmen der CIPN

Wie in 2.1 beschrieben, sind die Mechanismen der CIPN substanzspezifisch und bisweilen größtenteils noch unzureichend verstanden. Interessanterweise konnte experimentell unter Einwirkung von Paclitaxel und Salinomycin eine veränderte Calciumhomöostase nachgewiesen werden.

Calcium ist ein ubiquitär vorkommendes Ion, welches in vielen Signalkaskaden eine wichtige Funktion als *second messenger* (engl. sekundärer Botenstoff) einnimmt. Nur durch sehr differentielle Signalunterschiede, die sich in Dauer, Amplitude und Lokalisation der Konzentrationsveränderungen unterscheiden, ist die Auslösung unterschiedlicher Signalkaskaden durch dasselbe Ion möglich. Calcium ist physiologischerweise zum Beispiel an Vorgängen wie Fertilisation, Proliferation sowie der neuronalen Signalverarbeitung beteiligt ¹⁴. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Dysregulation des zellulären Calciumhaushalts auf vielfältige Weise an einer Initiierung des Zelltods beteiligt sein kann (zusammengefasst in ¹⁵). Insbesondere der Vorgang der Apoptose wird in diesem Zusammenhang beschrieben. Hierbei handelt es sich um ein äußerst komplexes zelluläres Programm, welches zum geordneten enzymatischen Abbau der zelleigenen Strukturen und schlussendlich zur Phagozytose der Zellen führt. Die Protagonisten in diesem Vorgang sind die sogenannten Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7), Enzyme die durch proteolytische Spaltung die Dekonstruktion der Zelle ausführen ¹⁶. Darüber hinaus sind jedoch auch Caspase-unabhängige Apoptosemechanismen bekannt.

Die Regulation der Apoptose geschieht auf vielfältige Weise, deren Gesamtzusammenspiel noch nicht vollständig verstanden ist. Zum einen existieren Proteine z.B. aus der Bcl-2 Familie, die prooder antiapoptotisch regulierend eingreifen können, zum anderen kann die Initiierung der Apoptose durch diverse Signalwege erfolgen (zusammengefasst in ¹⁶). Oft sind hierbei die sogenannten Initiatorcaspasen 8, 9 und 12 involviert. Wie zuvor erwähnt, kann auch die Dysregulation der intrazellulären Calciumhomöostase eine zum Zelltod führende Signalkaskade auslösen. In diesem Zusammenhang scheinen sowohl dem endoplasmatischen Reticulum (ER) als auch den Mitochondrien Schlüsselstellungen zuzukommen. Das ER stellt den größten intrazellulären Calciumspeicher dar und steht unter anderem über Calciumströme mit den Mitochondrien, welche ebenfalls Calcium speichern können, in Verbindung. In diesem Bereich scheinen schon geringe Veränderungen der Calciumhomöostase zu Zelltod bedingenden Signalkaskaden führen zu können ¹⁷. Kommt es zu einer Stressreaktion des ER auf bestimmte Reize, kann Caspase 12 die Caspasekaskade initiieren ¹⁸. Pro-Caspase 12 ist ein cytosolseitiges, membranständiges und proteolytisch wirksames Enzym, welches auch durch Calpain gespalten

12

und so aktiviert werden kann ¹⁹. Die calciumabhängige Protease Calpain, welche insbesondere in den Isoformen μ- und m- Calpain ubiquitär in den Körperzellen vorkommt, spielt bei Calcium aktivierten Apoptoseformen eine wichtige Rolle (zusammengefasst in ^{15,20}). Neben der Aktivierung der Pro-Caspase 12 wurde ein weiterer Mechanismus der Apoptoseinitiierung durch Calpain über die Abspaltung des Apoptose-induzierenden-Faktors (AIF) aus der inneren Mitochondrienmembran beschrieben ²¹. Daraufhin kommt es zur Freisetzung des AIF in das Cytosol und anschließend zur Translokation in den Zellkern, wo Apoptose kennzeichnende Effekte wie Chromatinkondensation und DNS-Fragmentation beobachtet werden können. Trotz einer gleichzeitig beschriebenen Caspase 9 Freisetzung führt AIF auf diesem Weg Caspase-unabhängig zum programmierten Zelltod ²².

Die hier dargestellten Mechanismen scheinen zum Teil auch im Kontext der CIPN eine wichtige Rolle zu spielen. In diesem Zusammenhang ist eine genauere Betrachtung der eingangs erwähnten Agenzien vorzunehmen.

Paclitaxel ist ein, bei verschiedenen soliden Tumorentitäten eingesetztes Chemotherapeutikum, welches als relevante Nebenwirkung zu einer peripheren sensiblen Neuropathie führt. Experimentell konnte unter Paclitaxel-Einwirkung eine gestörte Calciumhomöostase in Spinalganglienzellen nachgewiesen werden, welche durch die calciumbindenden Proteine NCS-1 und Calpain vermittelt wird. Es kommt insbesondere zur Beeinflussung des Inositoltriphosphat-(InsP₃) Signalwegs und so zur veränderten Freisetzung von Calcium aus dem ER^{23,24}.

Auch das experimentelle Chemotherapeutikum Salinomycin, welches hochwirksam Krebsstammzellen abtötet, bedingt als Nebenwirkung eine sensible Neuropathie. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es zu einer intrazellulären Störung des Calciumhaushalts in Spinalganglienzellen kommt. Salinomycin wirkt als Ionophor und transportiert so vor allem Natrium über die Plasmamembran in die Zelle. Dadurch kommt es zur Änderung der Transportrichtung des Natrium-Calcium Antiporters in der Plasmamembran und den Mitochondrien, was zu einem intrazellulären Calciumanstieg führt. In der Folge wird Calpain aktiviert. Konsekutiv kommt es durch Aktivierung der Caspase-12 zur Initiierung der Caspase-Kaskade ²⁵.

Des Weiteren wurde auch im Zusammenhang mit Suramin eine Veränderung der Calciumhomöostase in Spinalganglienzellen beschrieben. In diesem Fall wurde postuliert, dass die Calciumhomöostase durch den Einfluss von extrazellulärem Calcium beeinträchtigt wird ²⁶.

Die dargestellten Mechanismen zeigen, dass verschiedene Chemotherapeutika auf unterschiedliche Weise Alterationen des zellulären Calciumhaushalts bedingen können, was

letztendlich zur Zellschädigung und Degeneration peripherer Nervenzellen führen kann. Dies manifestiert sich klinisch in Form einer Neuropathie.

2.3 Suramin-Hexanatriumsalz

2.3.1 Chemische Eigenschaften und Substanzursprung



Suramin ist eine farblose, symmetrische und polysulfonierte Naphthylharnstoff-Verbindung (siehe Abbildung (Abb.) 1), welche sich gut in Wasser löst ²⁷.

Die Substanz wurde zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit entwickelt. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts kam es zu größeren Epidemien der afrikanischen Trypanosomiasis in den europäischen

Kolonien der Subsahara. Daraufhin untersuchten führende Wissenschaftler diese Erkrankung, welche durch Trypanosomen ausgelöst und durch die "Tsetse"- Fliege übertragen wird ²⁸. Da eine antitrypanosomale Aktivität von Azofarbstoffen wie Trypan rot oder blau beobachtet wurde,

analysierten Forscher der Firma Bayer und Co 1916 verschiedene, von diesen Stoffen abgeleitete, Verbindungen. Im Zuge dessen wurde die Substanz Bayer 205 synthetisiert, welche später als Germanin vertrieben und ab den 1920er Jahren zur Therapie und Prophylaxe der afrikanischen Trypanosomiasis im ehemaligen Deutsch-Ostafrika angewendet wurde ²⁹. Die Geschichte der Entwicklung des später in Suramin umbenannten Wirkstoffs fand zur Zeit des Nationalsozialismus unter anderem in dem Film "Germanin" auch in propagandistischer Weise Verwendung (siehe Abb. 2).



2.3.2 Klinische Anwendung, unerwünschte Arzneimittelwirkungen und relevante pharmakokinetische Eigenschaften des Suramins

Auch heute wird Suramin noch in der Therapie der afrikanischen Trypanosomiasis angewendet. Zusätzlich kommt es therapeutisch im Rahmen der durch den Wurm Onchocerca volvolus verursachten Onchozerkiasis zum Einsatz. Später wurde eine Inhibition der reversen Transkriptase verschiedener Retroviren durch Suramin beschrieben ³⁰ und *in-vitro* eine Wirksamkeit gegen das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) festgestellt³¹. Allerdings zeigte sich bei der Anwendung an HIV infizierten Patienten ein limitierter klinischer Nutzen ^{32,33}. Im Zuge der Untersuchungen Patienten, die am Acquired Immune Deficiency Syndrome (engl. erworbenes an Immundefizienzsyndrom (AIDS)) litten, konnte eine Wirkung Suramins auf HIV assoziierte maligne Erkrankungen wie das Kaposi-Sarkom oder Non-Hodgkin Lymphome beobachtet werden ³³. In der Folge wurden antiproliferative Wirkungen Suramins auf verschiedene Tumorzelllinien in-vitro festgestellt ³⁴⁻³⁷. Darüber hinaus kam es zur Translation in klinische Studien. Zunächst wurde Suramin bei metastasierten Tumoren eingesetzt, die einer konventionellen Chemotherapie nicht zugänglich waren ³⁸. Weitere Studien bei Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten, wie Prostata-, Nebennierenrinden- und Mammakarzinom folgten ³⁹⁻⁴¹. Das größte Interesse galt dem Einsatz im Rahmen des Prostatakarzinoms, da bei einigen Patienten unter palliativer Therapieindikation ein gutes Ansprechen auf Suramin beobachtet wurde ^{42,43}. Jedoch wurden unter der Behandlung mit Suramin zahlreiche Nebenwirkungen beobachtet. Insgesamt variieren die Angaben zur Verträglichkeit erheblich. Small et al. fanden in ihrer Untersuchung, dass die Suraminbehandlung gut tolerierbar und die Therapie leicht zu überwachen war⁴², wohingegen andere Studien aufgrund der Toxizität einen limitierten klinischen Nutzen in der Anwendung von Suramin sahen ⁴⁰. Es scheint, dass unter anderem die spezielle Pharmakokinetik Suramins mit einer hohen Proteinbindung und einer sehr langen Plasmahalbwertszeit von 44 bis 45 Tagen ³² sowie die Anwendung unterschiedlicher Therapieregime hierfür verantwortlich sind.

Zu den beschriebenen Nebenwirkungen, die unter Suramintherapie auftreten, zählen unter anderem allergische Hautreaktionen, Thrombopenien, corneale Schäden, das Auftreten von Proteinurie und Nephrotoxizität, Koagulopathien, einer reversiblen Hepatotoxizität sowie einer Nebennierenrindeninsuffizienz. Mit am häufigsten dosislimitierend ist jedoch die Suraminvermittelte Neurotoxizität ^{27,39}. Dabei zeigt sich die neurotoxische Wirkung nur im peripheren Nervensystem (PNS), da das Suraminmolekül aufgrund der starken negativen Ladungen die Blut-Hirnschranke nicht passieren kann ²⁹. Im PNS führt Suramin zum Auftreten einer Polyneuropathie. Diese präsentiert sich in zwei Formen. Häufig manifestiert sich eine distal symmetrische, axonale Neuropathie. Hierbei kommt es zu sensiblen Symptomen, wie strumpf- und handschuhförmige Hypalgesien, Pallhypästhesien sowie Dys-, Hyp- und Parästhesien. Die Motorik ist in Form von Paresen und abgeschwächten Muskeleigenreflexen betroffen ^{44,45}. Seltener wurde hingegen die Manifestation einer schwerwiegenden, inflammatorischen und demyelinisierenden Neuropathie beschrieben, welche dem Guillian-Barré Syndrom ähnelt ⁴⁶. Als Risikofaktor für das Auftreten einer Neuropathie identifizierten La Rocca et al. maximale Suraminplasmaspiegel von über 350 µg/ml. Auch weitere Studien konnten zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit, eine Neuropathie unter Suramin zu entwickeln, mit der Dosisintensität ansteigt ^{44,47}. Es scheint, dass sowohl die kumulative Dosis und Therapiedauer als auch die maximalen Plasmaspiegel einen Einfluss haben. Es wurde auch diskutiert, ob hohe Dosisregime eher mit der demyelinisierenden und niedrige eher mit der axonalen Form der Neuropathie einhergehen. Die Inzidenz der Suramin-induzierten Polyneuropathie ist je nach Therapieregime entsprechend variabel. In der klinischen Studie von Chaudhry et al. entwickelte sich bei 55% der Patienten eine axonale und bei 18 % eine demyelinisierende Polyneuropathie. Allerdings trat in den zwei Kohorten, die mit höheren Dosierungen behandelt wurden, insgesamt in 88% der Fälle eine Neuropathie auf, wohingegen in der Niedrigdosiskohorte kein Auftreten einer Neuropathie beobachtet wurde ⁴⁴. In einem Tiermodell von Russel et al. traten sowohl in der Niedrigdosis-, als auch in der Hochdosisgruppe fast ausschließlich eine axonale, längen-, dosis- und zeitabhängige sensomotorische Neuropathie auf. Histologisch ließen sich eine axonale Degeneration und Atrophie nachweisen ⁴⁸.

2.3.3 Wirk- und Pathomechanismen

2.3.3.1 Antineoplastische Wirkung

Der Wirkmechanismus von Suramin ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Unter Berücksichtigung der Literatur scheinen die Angriffspunkte von Suramin vielfältig und komplex. Es wurden zahlreiche Enzyme, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren beschrieben, auf die Suramin wirkt (siehe Die Tabelle (Tab.) 1). antineoplastische Wirkung von Suramin wurde insbesondere mit der Bindung essentielle an Wachstumsfaktoren in Verbindung gebracht. Außerdem wurde die Inhibition der Angiogenese durch Suramin beobachtet. (zusammengefasst in ²⁷). In der Tat legen verschiedene Untersuchungen nahe, dass die angiostatische Wirkung und die Hemmung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors zusammenhängen^{49,50}.

Enzyme/ Wachstumsfaktoren/Rezeptoren		
DNS Polymerase		
Reverse Transkriptase		
Topoisomerase-I und II		
ATPase		
Heperanase		
Protein Tyrosin Phosphatasen		
Protein Kinase C		
Phosphoglyceratkinase		
Diacylglycerolkinase		
NAD+ abhängige Histon Deacetylasen		
Phosphatidylinositolkinase		
G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen		
Purin		
P2X und P2Y Purinrezeptoren		
Phospholipase A2 aus Bothrops asper Gift		
Fibroblasten Wachstumsfaktor		
Plättchen Wachstumsfaktor		
Epidermaler Wachstumsfaktor		
Transformierender Wachstumsfaktor ß		
Insulin-like Wachstumsfaktor		
Androgen induzierender Wachstumsfaktor		
Nerven Wachstumsfaktor		
Heparin bindender Wachstumsfaktor Typ 2		
Follikel stimulierendes Hormon		
Interleukin 2		
Interleukin 6		
Tumor nekrose Faktor alpha		
Vaccinia virus Komplement Kontrollprotein		
Plasmodium falciparum Merozit Oberflächenprotein		

Tabelle 1: Wirkmechanismen des Suramins Enzyme, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, auf die Suramin in der Literatur beschriebene Effekte ausübt. (Nach McGeary 2008 ²⁷)

2.3.3.2 Antiretrovirale und antiparasitäre Wirkung

Die antiretrovirale Wirkung wurde schon in Abschnitt 2.3.2 dargestellt. Im Rahmen der antiparasitären Effekte wurde die Inhibition verschiedener Enzyme, die z.B. für die trypanosomale Glykolyse oder den Metabolismus der Filarien relevant sind, beschrieben. Ein eindeutiger Wirkmechanismus in Bezug auf die Therapie der afrikanischen Schlafkrankheit oder der Onchozerkiasis ist jedoch bis heute nicht identifiziert ^{29,51}.

2.3.3.3 Pathomechanismus der Neurotoxizität

Aufgrund der Vielzahl an Proteinen an die Suramin bindet, ist das Auftreten der diversen beobachteten Nebenwirkungen nicht verwunderlich. Allerdings sind die dafür verantwortlichen Pathomechanismen nicht geklärt. Aufgrund des dosislimtierenden Effekts ist insbesondere die neurotoxische Wirkung Suramins von Interesse. Es wurden bislang verschiedene Mechanismen hiermit in Zusammenhang gebracht. Sowohl in-vivo als auch in Spinalganglienzellkulturen wurde das Auftreten von intrazellulären lamellaren Einschlusskörperchen, bestehend aus Gangliosiden, beschrieben. Als Ursache wurde die Inhibition lysosomaler Enzyme vermutet ^{48,52}. Des Weiteren beschrieben Russel et al. die kompetitive Bindung von Suramin an den NGF-Rezeptor in Spinalganglienzellkulturen, was zu einem verminderten Neuritenwachstum führte. Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Inkubation mit NGF aufgehoben werden ⁵³. Weitere Untersuchungen beschrieben Suramin jedoch als Agonist am NGF-Rezeptor oder zeigten keinen protektiven Effekt von NGF auf Suramin behandelte Neurone ^{52,54}. Interessanterweise beschrieben Sun et al., wie in 2.2 erwähnt, einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Calciumhomöostase unter Suramin und der neurotoxischen Wirkung. Sie zeigten, dass Suramin zu erhöhten intrazellulären Calciumspiegeln in Spinalganglienzellen in-vitro führt. Hierbei erwies sich ein calciumfreies Extrazellularmedium sowie der Einsatz von Nimodipin als protektiv auf das Neuritenwachstum bzw. das Überleben der Spinalganglienzellen. Daraus leiteten Sun et al. ab, dass Suramin am ehesten zu einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum in die Neurone führt. Membranständige Ionenkanäle, wie zum Beispiel die durch Nimodipin geblockten L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanäle (engl. Voltage gated Calcium channels (VGCC)), könnten dafür relevant sein 26.

2.4 Relevante Ionenkanäle der zellulären Calciumhomöostase

In Anlehnung an die Ergebnisse von Sun und Windebank und die zuvor beschriebene Calciumdyshomöostase im Rahmen der Paclitaxel- und Salinomycin-induzierten Polyneuropathie scheint eine genauere Betrachtung von Mechanismen relevant, die zu einem erhöhten cytosolischen Calciumgehalt führen.

Physiologisch liegt eine niedrige Calciumkonzentration im Cytosol sowie eine um ein Vielfaches höhere im Extrazellularraum und in intrazellulären Speichern (ER, Mitochondrien) vor. Um dieses Gleichgewicht aufrechtzuerhalten ist ein komplexes Zusammenwirken von Proteinen mit Transduktions- oder Enzymfunktion, Calcium-Puffern, Pumpen und Ionenkanälen nötig. Ein cytosolischer Calciumanstieg kann entsprechend dem Konzentrationsgradienten durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder den Einstrom aus dem Extrazellularraum bewirkt werden. An der Freisetzung aus dem ER ist insbesondere der InsP₃-Rezeptor, ein ligandengesteuerter Ionenkanal, beteiligt. Des Weiteren existieren eine Vielzahl von Ionenkanälen in der Zellmembran. Diese können liganden- bzw. spannungsgesteuert oder aufgrund von weiteren Stimuli (siehe 2.4.2) für Calciumionen durchlässig werden ⁵⁵. Die Auswahl der untersuchten Ionenkanal-Familien wird in Abschnitt 5.2.1 diskutiert.

2.4.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle (VGCC)

VGCCs sind eine Familie von membranständigen Calciumkanälen, die sich durch Depolarisation der Zellmembran öffnen und einen, in die Zelle gerichteten, Calciumstrom ermöglichen. Anschließend werden durch Calcium als *second messenger* vielfältige zelluläre Prozesse, insbesondere in erregbaren Gewebetypen wie Muskelzellen und Neuronen, vermittelt (siehe 2.2). VGCCs sind komplexe Proteine, welche aus 4-5 Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die größte Untereinheit stellt der alpha-1 Komplex dar, welche die zentrale Kanalpore, den Spannungssensor und bekannte Inhibitor-Bindungsdomänen enthält. Pharmakologische und elektrophysiologische Eigenschaften werden maßgeblich durch die verschiedenen alpha-1 Subtypen bestimmt ⁵⁶. Dementsprechend lassen sich je nach Kanalöffnungspotential, der Öffnungsdauer und der Bindungspräferenz von spezifischen Inhibitoren verschiedene Kanaltypen unterscheiden. Diese werden als L-, N-, P/Q-, R- und T-Calciumkanaltypen bezeichnet und können den zehn verschiedenen, molekularbiologisch nachgewiesenen alpha-1 Varianten zugeordnet werden ⁵⁷.

Das Vorkommen der verschiedenen Klassen der VGCC ist gewebespezifisch. In Spinalganglienzellen konnten L-, N-, P/Q-, R- und T-Typ VGCC sowohl mittels molekularbiologischer Verfahren als auch durch elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchungen nachgewiesen werden. Allerdings ist der VGCC-Besatz der Spinalganglienzellen variabel und unterscheidet sich vor allem zwischen Spinalganglienzellen mit kleinem, mittlerem und großem Durchmesser ⁵⁸⁻⁶¹.

2.4.2 Transient-Rezeptor-Potential- Kanäle (TRP-Kanäle)

Die Entdeckung der TRP-Kanäle geht auf die Beschreibung einer Mutante von *Drosophila Melanogaster* im Jahr 1969 zurück. Cosens et al. stellten fest, dass diese Mutanten bei hellem Licht zeitweise erblindeten und die Aktivität im Elektroretinogramm bei Beleuchtung innerhalb einiger Sekunden abnahm⁶². Dieses vorübergehende – *transiente* - Phänomen war namensgebend für das 1989 sequenzierte Gen- und Proteinkorrelat⁶³. Im Verlauf konnte mit dem *Transient receptor potential* Kanal C1 (TRPC1) das erste menschliche Homolog des Drosophila trp-Gens nachgewiesen werden⁶⁴.

Mittlerweile sind 28 verschiedene TRP-Kanäle bekannt, welche anhand der Aminosäuresequenz sieben Untergruppen zugeordnet werden können. Sechs Untergruppen konnten in Säugetieren nachgewiesen werden: TRPC-, TRPM-, TRPV-, TRPA-, TRPP- und TRPML-Kanäle. Allen

gemeinsam sind sechs transmembranäre Abschnitte, eine zentrale Kanalpore sowie intrazelluläre C- und N- Aminosäuretermini ⁶⁵.

Darüber hinaus ist die TRP-Superfamilie eine sehr heterogene Gruppe an unselektiven Kationenkanälen. Ionenselektions- und Permeationseigenschaften variieren hierbei deutlich, sodass manche Kanäle z.B. hochselektiv Calcium leiten, wohingegen andere kaum für dieses Ion durchgängig sind. Insgesamt scheinen TRP- Kanäle direkt oder indirekt bedeutenden Einfluss auf die Calciumhomöostase zu haben ⁶⁶.

Die Diversität dieser Kanalfamilie setzt sich auch bei den potentiellen Aktivierungsmechanismen fort. Unter anderem können chemische, thermische, mechanische, nozizeptive, auditive und Lichtreize, aber auch Calciumspeicher-gesteuerte (*store-operated*) Mechanismen entsprechende Kanalproteine aktivieren. Bemerkenswert ist, dass die meisten TRP-Kanäle polymodalen Aktivierungsstimuli unterliegen. So reagiert z.B. der TRPV1-Kanal sowohl auf Hitze als auch auf Capsaicinbindung mit einer Porenöffnung.⁶⁷.

Entsprechend dieser Diversität nehmen TRP-Kanäle in zahlreichen Geweben und Zellen vielfältige Funktionen ein. Es wird jedoch deutlich, dass sie eine besondere Rolle in der sensorischen Physiologie spielen. Demzufolge sind eine Vielzahl von TRP-Kanälen als wichtige Vermittler der Somatosensation auch auf Spinalganglienzellen weit verbreitet ⁶⁸. Vandewauw et al. konnten die Expression von 17 für TRP-Kanäle codierende mRNAs in murinen Spinalganglien nachweisen. Allerdings scheint es je nach Spinalgangliensegment Unterschiede im TRP-Genexpressionsmuster zu geben ⁶⁹.

Insgesamt sind viele Eigenschaften und Funktionen der TRP-Kanäle noch nicht genau geklärt. Im Zusammenhang mit der Suramin-induzierten Polyneuropathie erscheint eine Bedeutung dieser Kanäle aufgrund der erläuterten Relevanz im Rahmen der Calciumhomöostase und der weiten Verbreitung in sensiblen Neuronen möglich.

2.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, den Pathomechanismus der Suramin-vermittelten Neurotoxizität genauer zu untersuchen. Konkret ist dies für die klinische Anwendung bei der afrikanischen Schlafkrankheit und der Onchozerkiasis von Interesse. Das Ziel dabei ist, durch eine spezifische Therapie eine bessere Verträglichkeit bezüglich der Neuropathie-induzierenden Nebenwirkungen zu erreichen. Außerdem ist es für die weitere Erprobung Suramins im Rahmen der Tumortherapie bedeutsam, eine der wichtigsten dosislimitierenden Nebenwirkungen behandeln und so ggf. effektivere Therapieregime nutzen zu können.

Des Weiteren scheint ein besseres Verständnis von Suramin-induzierten Signalwegen, welche für den Untergang von Nervenzellen verantwortlich sind, auch im Gesamtkontext der CIPN relevant. Dies wird bei Betrachtung des Zusammenhangs von Calciumdyshomöostase und Neurotoxizität im Rahmen der Salinomycin und Paclitaxel-induzierten Neuropathie deutlich. In diesem Gesamtgefüge könnte ein genaueres Verständnis des durch Suramin gestörten Calciumhaushalts das komplexe Bild der pathophysiologischen Vorgänge erweitern und mögliche Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen beleuchten. Dies ist insbesondere aufgrund der bisweilen limitierten Therapiestrategien der CIPN von Bedeutung.

Abgeleitet von den Untersuchungen von Sun et al. überprüften wir folgende Hypothesen:

- 1. Suramin führt in entsprechenden Konzentrationen zum Untergang von Spinalganglienzellen.
- 2. Suramin-induziert einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum in die Spinalganglienzellen.
- Spezifische membranständige Ionenkanäle aus der Familie der VGCC oder TRP-Kanäle vermitteln den Suramin-induzierten Calciumeinstrom. Eine Inhibition des verantwortlichen Ionenkanals wirkt sich protektiv auf das neuronale Überleben unter Suramineinwirkung aus.
- Die Calciumdyshomöostase führt zur Aktivierung calciumabhängiger Signalkaskaden, die die Apoptose der neuronalen Zellen bewirken. Durch eine Inhibition der calciuminitiierten, Enzymkaskade kommt es ebenfalls zur Protektion der neuronalen Zellen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Substanzen und Lösungen

Substanz	Hersteller
• 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
• 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
• A 967079	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
AC DEVD CHO	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
• Amphotericin B (250µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
• B27® Supplement (50x), serum free	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Calcium Chlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
D-Glucose	Sigma- Aldrich®, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma- Aldrich®, St. Louis, USA
• Easycoll seperating solution 1,124mg/dl	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Efonidipin-hydrochlorid- monoethanolat	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
• Ethylenglycol-bis (aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
• fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
• Fura-2 AM	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hank's Balanced Salt solution (HBSS) (10x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
• HC 067047	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
• Ionomycin <i>free acid</i> (engl. Säure)	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
• Kaliumhydrogenphosphat(KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
• L- Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
• Liberase [™] DH Research Grade	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma- Aldrich®, St. Louis, USA
• MDL 28170	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
• Mouse Laminin (1mg/ml)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Natrium Chlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Hydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma- Aldrich®, St. Louis, USA

Neurobasal®-A Medium	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
• NGF 2.5 Protein, Maus	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nimodipin	Cayman Chemical, Michigan, USA
• Ononetin	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
• Penicillin/Streptomycin (1000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (10x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pluronic ® F-127 20% in DMSO	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
• Poly-L-Lysin (0,1mg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
• Pyr 3	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Ruthenium Rot	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
• Salzsäure (HCl) 25%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
• SNX 482	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Suramin Hexanatriumsalz	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Trypanblau 0,5%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
ω-Conotoxin MVIIC	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
•	

Tabelle 2: Substanzen und Lösungen

<u>Verbrauchsmaterialien</u>

Material	Hersteller
• µ-slide 8 Well	ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
(Mikrsokopiekammer)	
• 96 multiwell Platten (steril)	Falcon®, Corning, New York, USA
 Combitips advaced® (versch. Größen) 	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
• Corning [®] bottle top vacuum Filter system	Falcon®, Corning, New York, USA
• Eppendorgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland
• Kanülen BD Microlance 27G	Becton, Dickinson and Company, New Jersy, USA
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
• Pipettenspitzen (divers. Größen)	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland
• Spritzen (versch. Größen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland
• Spritzenvorsatzfilter (0,45µm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Stabpipetten	Falcon®, Corning, New York, USA
• Weiße 96 Multiwell Platte	Falcon®, Corning, New York, USA
• Zellsieb (70µM)	Falcon®, Corning, New York, USA
• Zentrifugenröhrchen (12ml, 50ml)	Falcon®, Corning, New York, USA

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Geräte

Gerät	t	Hersteller
•	Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
•	CCD-Kamera, Hamamatsu ORCA R2	Hamamatsu Coorporation, Bridgewater, USA
•	elektronische Analysenwaage A200S	Sartorius AG, Göttingen Deutschland
•	elektronische Mikrowaage M2P	Sartorius AG, Göttingen Deutschland
•	Fluorimeter Fluoromax-P	HORIBA Ltd., Kyoto, Japan
٠	Heißluftsterilisator	Heraeus instruments, Berlin, Deutschland
•	Integra Pipetboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
•	Inverses Kontrastmikroskop LEICA DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
•	Kolbenhubpipetten (divers. Größen)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
•	Kühlzentrifuge 30RF	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen Deutschland
•	Magnetrührer Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach, Deutschland
٠	Mikroskop Leica Zoom 2000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
٠	Mikrsokop DMI 3000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
•	Motorized inverted system Microscope IX 81	Olympus Corporation, Tokio, Japan
٠	Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
•	Objektiv UPlan FLN oil, 40x, NA 1,3	Olympus Corporation, Tokio, Japan
٠	pH-Meter FG2 FiveGo [™]	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
•	Plattenschüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen Deutschland
٠	Präparationsbesteck	Manufactures d'Outils Dumont SA, Montignez, Schweiz
٠	Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
•	Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
•	Standautoklav Systec V-100	Systec GmbH, Linden Deutschland
•	Zellkultur Sterilbank antair ZKB	Firma Mahl, Trendelburg-Langenthal
•	Tristar LB941 Multimode Microplate Reader	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
•	Ultraschall Bad, Bandelin SONOREX Digital 10P	Bandelin electronic GmbH&Co. KG, Berlin, Deutschland
•	Vortex MS2 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Deutschland

Tabelle 4: Geräte

Software

Programm	Unternehmen	
• Fluorimeter-P	Horiba Ltd., Kyoto, Japan	
Graphpad Prism 6	Graph Pad software Inc., La Jolla, USA	
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA	
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA	
Mikrowin 2000	Berthold Technologies GmbH & Co. KG,	
	Bad Wildbad, Deutschland	
• Olympus xcellence imaging software	Olympus Corporation, Tokio, Japan	
Tabelle 5: Software		

Puffer, Medien, Lösungen

Spinalganglienzellkultur-Medium

- Neurobasal®-A Medium
- Penicillin/Streptomycin 10µg/ml:
- B27® Supplement (50x), serumfrei: 2%
- L-Glutamin: 0,5mM

Nervenwachstumsfaktor (NGF)

• 50ng/ml in PBS (1x) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS)

<u>Zähllösung</u>

- Trypanblau 1:9 in PBS
 - \rightarrow anschließend filtriert: Porengröße 0,45µm

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

- 5mg/ml in PBS (1x)
 - \rightarrow anschließend filtriert: Porengröße 0,45µm

SDS (Natriumdodecylsulfat)

• 10% in H₂O und 0,01M (Endkonzentration) HCl

HEPES-Puffer (10x)

Tabelle 6: HEPES Puffer

	mit Calcium	ohne Calcium
NaCl	1,3 M	1,3 M
KCl	0,047 M	0,047 M
MgSO ₄	0,010 M	0,023 M
KH ₂ PO ₄	0,012 M	0,012 M
HEPES	0,20 M	0,20 M
CaCl ₂	0,0126 M	-
EGTA	-	0,1 M

 \rightarrow anschließend filtriert: Porengröße 0,45µm

HEPES-Puffer (1x)

- HEPES-Puffer (10x) 1:10 in Aqua bidest. verdünnt
- D-Glucose 5mM
- pH 7,4

Lösung von Feststoffen

Alle Feststoffe wurden eingewogen, in DMSO oder destilliertem Wasser (Aq.dest.) in höchstmöglicher Konzentration gelöst, aliquotiert und bis zum Verbrauch bei -20°C gelagert.

3.2 Spinalganglienzellkultur

3.2.1 Beschichtung der Zellkulturgefäße

Zur besseren Adhäsion der Spinalganglienzellen wurden die Zellkulturgefäße vor der Aussaat mit Poly-L-Lysin (PLL), 0,1mg/ml über Nacht präinkubiert und anschließend mit 10 μ g/ml Maus-Laminin in PBS für 2-3 Stunden beschichtet. Direkt vor der Aussaat der Zellen wurde Laminin abgesaugt und die Zellkulturgefäße zweimal mit PBS (1x) gewaschen. Für die Calcium-*Imaging*-Experimente (*Imaging* engl. Darstellung) wurden PLL beschichtete 8-*Well-ibidi* μ -slides (Well engl. Loch; slide engl. Objekträger) genutzt, sodass nur die Laminin-Beschichtung erfolgte.

3.2.2 Präparation der Spinalganglien

Es wurden 0-3 Tage alte Wistar-Ratten-Neonaten ohne Mutter bei der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité bestellt. Bis zur jeweiligen Präparation verblieben die Jungtiere im Wärmeinkubator. Die Präparation der Spinalganglien erfolgte nach vorheriger Dekapitation in einer Zellkultur Sterilbank mit Hilfe eines Auflichtmikroskops (Leica Zoom 2000) bei 10-12facher Vergrößerung. Der Wirbelkanal wurde von zervikal bis sakral eröffnet. Das anschließende Entfernen des Rückenmarks legte die Spinalganglien in den *Foramina Intervertebralia* frei. Die Spinalganglien wurden mit Hilfe von Pinzetten extrahiert, in mit HBSS (1x) gefüllten Eppendorfgefäßen auf Eis aufgefangen und so bis zum Ende der Präparation gelagert. Die Spinalganglien eines Jungtiers wurden in je einem Eppendorfgefäß gesammelt.

3.2.3 Aufarbeitung der Spinalganglien

Im Anschluss an die Präparation wurden die Spinalganglien zweimal mit PBS (1x) gewaschen. Um die Spinalganglienzellen aus dem Gewebeverband freizusetzen, wurden diese mit Kollagenase (Liberase[™] DH) in Medium versetzt. Die Enzymaktivität betrug 0,28 Wünsch-*units* (engl. Einheit). Es folgte die Inkubation für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad. Währenddessen wurden die Ganglien alle 15 Minuten resuspendiert. Nach der Verdauung mit Kollagenase wurde erneut zweimal mit PBS (1x) gewaschen. Nachfolgend wurden die Spinalganglien in Medium resuspendiert, jeweils 15-20 Mal trituiert, um die Zellen zu dissoziieren, durch ein 70µM Zellsieb gegeben und in einem 50 ml Röhrchen gesammelt.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation zur weiteren Aufreinigung der Spinalganglienzellen. Hierfür wurde eine untere Phase mit einer Dichte von 1,038 g/ml mit einer oberen Phase einer Dichte von 1,019 g/ml vorsichtig bei ca. 70° geneigtem 10 ml Zentrifugenröhrchen überschichtet. Beide Phasen setzten sich in entsprechenden Anteilen aus Spinalganglienzell-Medium und Percoll (Easycoll seperating solution 1,124 mg/dl) zusammen. Es wurden ebenso viele Dichtegradienten in Zentrifugenröhrchen hergestellt, wie Tiere präpariert wurden. Die durch das Zellsieb gegebene Zellsuspension wurde gleichmäßig auf die Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und vorsichtig an dessen Wand entlang aufpipettiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 10 Minuten bei 1000g und 4°C. Danach wurde der Überstand vorsichtig bis auf ca. 1 ml je Zentrifugenröhrchen abgesaugt, die Zellen resuspendiert und die Zellsuspension aus allen Röhrchen in einem Röhrchen gesammelt. Waren die Zellen für die Durchführung eines MTT- oder Caspase-Assays (Assay engl. chemisches Prüfverfahren) bestimmt, wurde nun erneut 5 Minuten bei 250g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen im Medium resuspendiert, um das mit der späteren Absorbtions- bzw. Lumineszenzmessung interferierende Percoll auszuwaschen. Waren Calcium-Imaging Messungen mit den Zellen geplant, fiel der letzte Zentrifugationsschritt weg.

3.2.4 Zellzählung

Im Anschluss an den jeweils letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen resuspendiert und für die Zellzählung im Verhältnis 1:1 mit Zähllösung verdünnt, um tote Zellen zu identifizieren. Anschließend wurden 20 µl dieser Zellsuspension in eine Fuchs–Rosenthal Zählkammer gegeben und 64 der 256 Kleinquadrate ausgezählt. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl berechnet:

$$\frac{Z * Q * V}{3,2 \ \mu l} = \frac{Zellen}{\mu l}$$

Z= gezählte Zellen; Q= Faktor durch anteilig ausgezählte Kleinquadrate; V= Verdünnungsfaktor

3.2.5 Anlegen der Zellkultur

Nach der Zellzählung wurde die Zellzahl auf 100/ μ l eingestellt und Amphotericin (2,5 μ g/ml) und Nervenwachstumsfaktor (engl. *Nerve-growth-factor* (NGF)) (0,1 ng/ml) hinzugefügt. Im Anschluss fand die Aussaat der aufbereiteten Spinalganglienzellen auf den jeweiligen Zellkulturmaterialien statt. Bis zur weiteren Verwendung inkubierten die Zellkulturen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank.

3.3 MTT-Assay

3.3.1 Testprinzip

Der MTT-*Assay* ist ein auf Kolorimetrie beruhendes Messverfahren zur Beurteilung der metabolischen Aktivität. Hierbei wird das wasserlösliche Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu wasserunlöslichen Formazankristallen reduziert. Dies geschieht vor allem durch Succinat-Dehydrogenasen, in der mitochondrialen Membran vitaler Zellen. Somit lässt sich durch eine anschließende Absorptionsmessung eine Aussage über die metabolische Aktivität und folglich die Vitalität der Zellen treffen ⁷⁰.

3.3.2 Durchführung

Zur Messung des MTT-*Assays* wurden die gewonnenen Spinalganglienzellen in einer Dichte von ca. 10.000 pro *Well* auf sterilen und beschichteten (siehe 3.2.1) 96-*Well*-Zellkulturplatten ausgesät. Um toxische und protektive Effekte von den zu untersuchenden Stoffen zu messen, wurden nach ca. 24 h Inkubation je 50µl der zu untersuchenden Substanzlösungen zu den *Wells* hinzupipettiert. Nun inkubierten die Zellen erneut für ca. 24h bei 37°C und 5% CO₂. Als erstes wurde die Auswirkung verschiedener Suraminkonzentrationen auf die metabolische Aktivität getestet, um eine Dosis-Wirkungskurve zu erhalten (siehe Abb. 4). In den folgenden Experimenten wurde der Effekt von verschiedenen Stoffen, in ansteigenden Konzentrationen, auf die metabolische Aktivität unter gleichzeitiger Inkubation mit Suramin untersucht. Folgende Kontrollen wurden in diesen Experimenten mitgeführt: Aq. dest. (Lösungsmittel von Suramin), zu untersuchende Substanz in entsprechenden Konzentrationen ohne Suramin, Suramin und Lösungsmittel der zu untersuchenden Substanz, unbehandelte Kontrolle. Vor Beginn jeder MTT-*Assay*-Untersuchung erfolgten mikroskopische Kontrollen, um die Intaktheit des Zellrasens zu kontrollieren. Es wurden keine Messungen an einem abgelösten Zellrasen durchgeführt.

Um den eigentlichen MTT-Assay zu starten, wurde ein Volumen des Farbstoffs MTT im Verhältnis 1:10 zu jedem Well hinzugefügt. Für die enzymatische Reaktion verblieben die Zellkulturen für 30 min. im Brutschrank. Um die Reaktion zu beenden, erfolgte die Zugabe von Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) in einem Volumenverhältnis von 1:1 pro Well. Dies lysiert die Zellen und solubilisiert die Formazankristalle. Um eine homogene Lösung zu erhalten, inkubierten die 96 Wellplatten über Nacht im Brutschrank und wurden anschließend im Tristar LB941 Multimode Microplate Reader (Reader engl. Lesegerät) durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 550 nm, einer Messdauer von 0,2 Sekunden und einer Lampenenergie von

10000 ausgelesen. Je 96 *Wellplatte* wurden drei Leerwerte, jeweils bestehend aus Medium, MTT und SDS zur späteren Subtraktion bestimmt.

3.4 Cytotox-Fluor Cytotoxicity AssayTM

3.4.1 Testprinzip

Im Rahmen der Neurotoxizitätsmessungen sollte auch der *Cytotox-Fluor Cytotoxicity Assay*TM (*Cytotox-Assay*) der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet werden. Hierbei wird die Aktivität einer bestimmten Protease (von Promega nicht genauer bezeichnet) im Zellkulturüberstand gemessen. Diese Protease wird nur von toten Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben, freigesetzt. Die Messung erfolgt über die Zugabe des Substrats bis-AAF-R110, welches Zellmembranen nicht penetrieren kann. bis-AAF-R110 wird von der Protease enzymatisch gespalten. Das entstehende Produkt besitzt fluoreszierende Eigenschaften. Das resultierende Fluoreszenzsignal korreliert mit der Menge des Substratumsatzes, wodurch auf die Protease-Aktivität und somit auf den Prozentsatz toter Zellen im Vergleich zur Kontrolle rückgeschlossen werden kann⁷¹.

3.4.2 Durchführung

Spinalganglienzellen wurden wie in 3.2 und 3.3.2 gewonnen, kultiviert und behandelt. Nach Abschluss der Zellkultur-Inkubation wurden aus jedem *Well* 50 µl Überstand entnommen und in ein korrespondierendes *Well* auf einer schwarzen 96-*Well*-Platte pipettiert. Zu jedem *Well* wurden 50 µl *Assay*-Reagenz, bestehend aus *Assay*-Substrat und *Assay*-Puffer im Verhältnis 1:100, hinzugefügt. Anschließend verblieb die 96-*Well*-Platte für 45 Minuten bei 37°C im Inkubator. Die Fluoreszenzmessung wurde im *Tristar LB941 Multimode Microplate Reader* bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm mit einer Lampenenergie von 30.000 und bei einer Messdauer von 0,2 Sekunden durchgeführt. Leerwerte bestehend aus Medium und *Assay*-Reagenz wurden von den Messwerten subtrahiert ⁷¹.

3.5 Caspase-Assay

3.5.1 Testprinzip

Zur Messung der Caspase-Aktivität wurde der *Caspase-Glo*® *3/7 Assay* (Caspase-*Assay*) der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet.

Hierbei wird die Aktivität der Caspasen als Korrelat eines Lumineszenzsignals gemessen. Zunächst werden die Zellen durch den Zusatz des Versuchsreagenzes lysiert. Dadurch werden die intrazellulär gelegenen Caspasen freigesetzt und spalten ein ebenfalls im Reagenz enthaltenes Substrat mit der Tetrapeptidsequenz DEVD. Das hierbei entstehende Spaltprodukt erzeugt nach erneuter Umsetzung durch Luciferase (im Versuchsreagenz enthalten) ein lumineszentes Signal. Dieses Signal kann in einem Luminometer ausgelesen werden und ist proportional zur Caspase-Aktivität in der entsprechenden Probe⁷². Da Caspasen als Effektorenzyme im programmierten Zelltod eine zentrale Rolle einnehmen (siehe 2.2), kann die, im beschriebenen *Assay* bestimmte Aktivität als Maß für den Apoptoseprozess angesehen werden.

3.5.2 Durchführung

Spinalganglienzellen wurden wie in 3.2 und 3.3.2 gewonnen, kultiviert und behandelt. Das Versuchsreagenz wurde im Volumenverhältnis 1:1 zu den Zellkulturen hinzupipettiert und dieser Ansatz für 30 Sekunden mittels eines Plattenschüttlers vermischt. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 60 Minuten. Anschließend wurden 90% der Volumina der einzelnen *Wells* auf eine weiße Multiwell-*Reader* platte umpipettiert und das Lumineszenzsignal im *Tristar LB941 Multimode Microplate Reader* bei einer Messdauer von 0,4 Sekunden ausgelesen. Für die Berechnung der Caspase-Aktivität wurde bei jedem Experiment der Leerwert von Medium und Reagenz bestimmt und von den generierten Werten subtrahiert⁷².

3.6 Calcium-Imaging

3.6.1 Prinzip

Calcium-*Imaging* basiert auf der Fluoreszenzmikroskopie. Mit Hilfe von Calciumindikatoren, die ihre Fluoreszenzeigenschaften bei Calciumbindung ändern, kann der Calciumgehalt einer Zelle oder eines Gewebes bestimmt werden. Als Calciumindikator wurde Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2 AM) verwendet. Dieser bildet Chelatkomplexe mit Calcium, wodurch das Anregungsmaximum des Moleküls von einer Wellenlänge von 380 nm hin zu 340 nm verschoben wird. Die Emissionswellenlänge liegt für beide Anregungsmaxima bei 510 nm. Durch die abwechselnde Anregung bei den zwei verschiedenen Anregungsmaxima ist es möglich, die wieder emittierte Lichtenergie als eine Ratio zu berechnen. Dadurch können Faktoren, wie Zelldicke, Farbstoffbeladung und Belichtungsenergie, die die Messung der Calciumkonzentration beeinflussen, herausgerechnet und absolute Werte für freies, intrazelluläres Calcium gemessen werden. Die Bindung von Fura-2 an AM ermöglicht die passive Diffusion des Farbstoffs durch die Zellmembran in die Zellen. Dort reichert sich Fura-2, nach Abspaltung des Acetoxymethylmoleküls durch endogene Esterasen, an. ⁷³⁻⁷⁵

3.6.2 Durchführung

Messaufbau

Gewonnene Spinalganglienzellen wurden auf beschichteten (siehe 3.2.1) 8-Well-ibidi μ -slides in einer Dichte von 20.000-30.000 Zellen pro Well ausgesät. Anschließend inkubierten die Zellkulturen über Nacht. Fura-2 AM wurde in *Pluronic* ® *F-127* 20% in DMSO gelöst und in HEPES-Puffer (1x) auf eine Zielkonzentration von 5 μ M verdünnt. Mit dieser Lösung wurden die Spinalganglienzellen für 30 Minuten im Inkubator (37°C, 5% CO₂) behandelt. Die Messungen erfolgten an einem invertierten Olympus IX 81 Mikroskop, mittels eines Uplan FLN oil Objektivs mit einer 40 fachen Vergrößerung und numerischen Apertur von 1,13. Eine gekühlte CCD-Kamera detektierte die Lichtsignale, die Datenverarbeitung erfolgte an einem Computer mittels Olympus xcellence imaging software. Vor Messbeginn wurden *Regions of interest* (engl. Region von Interesse (ROIs)) bestimmt. An diesen ROIs erfolgte die Fluoreszenzmessung als Ratio (R) von der Emission nach Anregung bei 340 nm für 400 ms zu der Emission nach Anregung bei 380 nm für 200 ms. Der Hintergrund wurde subtrahiert (siehe Abb.3).

Die zu Beginn durchgeführte Kalibrierung lieferte Werte für minimale (R_{min}) und maximale (R_{max}) Fluoreszenzratios. Hierbei wurde R_{min} in calciumfreiem HEPES-Puffer (1x) unter Zugabe von 5 μ M Ionomycin und R_{max} in calciumhaltigem HEPES-Puffer (1x) unter Zugabe von 5 μ M Ionomycin und 10 mM CaCl₂ bestimmt.

Intrazelluläre Calciumkonzentrationen wurden für alle Experimente mit folgender Formel berechnet: ⁷⁵

$$[Ca^{2+}]_{int}(nM) = K_d * Q * \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)}$$

K_d ist dabei die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Calcium bei Raumtemperatur (RT) und hat einen Wert von 225 nM. Q ist die Fluoreszenzratio der Emissionsintensität, bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm, in Abwesenheit von Calcium im Verhältnis zu der bei Calciumsättigung.

Die Fluoreszenzratio 340 nm/380 nm wurde bei allen Experimenten alle 1,5 Sekunden in 185 Wiederholungen bestimmt, sodass in jedem Experiment während 4,37 Minuten der intrazelluläre Gehalt freien Calciums bestimmt wurde.



Abbildung 3: Fura-2 beladene Spinalganglienzellen. Die dargestellten Spinalganglienzellen wurden im Olympus IX 81 Mikroskop bei einer Wellenlänge von 380 nm angeregt. Die Aufnahme erfolgte mittels CCD-Kamera. B: Anschließende Bestimmung der *Regions of interest* (ROI 2-10), jeweils im Bereich der Spinalganglienzellen sowie des ROI 1 zur Substraktion des Hintergrunds

Messungen

Die Messungen erfolgten, um die Veränderungen des Calciumgehalts der Spinalganglienzellen unter Zugabe von Suramin im Vergleich zur Kontrolle mit Aq. dest. zu beobachten. Hierfür wurde Suramin bzw. Aq. dest. ca. 20 Sekunden nach Messbeginn zugegeben. 30 Sekunden vor Ende der jeweiligen Messung wurde Ionomycin (5µM Zielkonzentration) hinzupipettiert, um einen Calciumeinstrom in die Zelle zu erzeugen. Dies diente als interne Kontrolle.

Experimente zur Testung der intrazellulären Calciumspeicher wurden in calciumfreiem HEPES-Puffer (1x) durchgeführt.

Testungen verschiedener Ionenkanalblocker wurden durchgeführt, indem die Zellen fünf Minuten mit der entsprechenden Substanz in HEPES-Puffer präinkubiert worden sind und die Messung direkt im Anschluss gestartet wurde.

Ausschlusskriterien

Nicht mit in die Datenanalyse aufgenommen wurden Zellen, deren Calcium-*Baseline (Baseline* engl. Grundlinie) zu Messbeginn, also vor Hinzufügen weiterer Substanzen, über 50 nM lag. Außerdem wurden Zellen ausgeschlossen, die einen ungenügenden Calciumanstieg nach Ionomycin-Zugabe zeigten (berechnet als Differenz (ΔCa^{2+})): $\Delta Ca^{2+} < 200$ nM in HEPES-Puffer mit Calcium und $\Delta Ca^{2+} < 80$ nM in calciumfreiem HEPES-Puffer. Zellen, die während der Messung anfingen ein Oszillationsprofil wie der Hintergrund zu zeigen, wurden als lysiert oder abgeschwommen erachtet und somit ebenfalls ausgeschlossen.

3.7 Fluoreszenzbestimmung

3.7.1 Fluoreszenzeigenschaften von Suramin

Suramin wurde bezüglich seiner Fluoreszenzeigenschaften bei verschiedenen Anregungswellenlängen charakterisiert. Hierfür wurde Suramin in einer Konzentration von $10 \,\mu M$ in PBS gelöst. Die Anregung erfolgte bei unterschiedlichen Wellenlängen im Fluorimeter Fluoromax-P (Horiba Ltd., Kyoto, Japan).

3.7.2 Fluoreszenzeigenschaften des Suramins unter dem Fluoreszenzmikroskop

Spinalganglienzellen wurden wie für Calcium-*Imaging*-Experimente gewonnen und ausgesät (siehe 3.6.2). Allerdings erfolgte keine Beladung der Spinalganglienzellen mit Fura-2. Mit Hilfe des Olympus IX 81 Mikroskop erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm. Die Messung wurde über 5 Minuten mit einer jeweiligen Belichtungszeit von 500 ms durchgeführt. Jeweils 20 Sekunden nach Messbeginn wurde Suramin in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben.

3.8 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Graphpad Prism Version 6.0 statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

MTT-Assays

Für die Berechnung der Dosis-Wirkungskurve wurden in zwei unabhängigen Experimenten jeweils sechs parallele Proben pro Kondition bestimmt. In den folgenden Versuchen wurden je Behandlungskondition drei parallele Proben in 3 unabhängigen Experimenten gemessen. Leerwert subtrahierte Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle mit Aqua dest. normalisiert und in Prozent dieser angegeben. Für Werte der mit Suramin behandelten Zellen fand ein zweiter Normalisierungsschritt statt. Es wurde für jeden Wert die Differenz zum Mittelwert (MW), der mit Suramin und Lösungsmittel (Aq. dest. oder DMSO) behandelten Konditionen gebildet.

Der MW und die Standardabweichung (engl. *Standarddiviation* (SD)) der generierten Werte wurden jeweils berechnet. Werte, die weiter als zwei SDs vom MW entfernt lagen, wurden als Ausreißer erachtet und ausgeschlossen.

Anschließend wurden die Daten mittels D'Agostino&Pearson-Omnibus-Test auf Normalverteilung getestet. Waren die Daten normalverteilt erfolgten die Gruppenvergleiche mittels *oneway ANOVA* (engl. *Analysis of Variance* – Einweg Varianzanalyse) und Holm's-Sidak

Test als PostHoc-Test. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde der Kruska-Wallis Test für diese multiplen Gruppenvergleiche genutzt. Als signifikant wurden Werte mit p < 0.05 angesehen.

Calcium-Imaging

Es wurde der absolute Calciumanstieg als Differenz des Calciumgehalts der Zellen bei Messende bzw. vor Ionomycinzugabe und des *Baseline* Calciumgehalts berechnet. Ebenso wie bei der Analyse der MTT-*Assays* wurden MW und SDs berechnet und Werte außerhalb von zwei SDs von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

Nach Testung auf Normalverteilung durch den D'Agostino-&-Pearson-Omnibus-Test wurden normalverteilte Daten mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test und nicht normalverteilte Daten mittels Mann-Whitney U Test auf Signifikanz geprüft. Als signifikant wurden Werte mit p < 0,05angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Suramin-Dosisfindung

Um den toxischen Effekt von Suramin auf Spinalganglienzellen zu evaluieren, wurde zu Beginn eine Dosis-Wirkungskurve bestimmt. Diese ist in Abb. 4 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die mittels MTT-*Assay* gemessene metabolische Aktivität in dem gewählten experimentellen Aufbau bei steigenden Suraminkonzentrationen absank. Die nichtlineare Regressionsanalyse ergibt eine kalkulierte mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) von 283,3 μ M mit einem 95% igen Konfidenzintervall von 226,4-354,5 μ M. In Anbetracht dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Experimente eine Suraminkonzentration von 400 μ M gewählt, da diese Konzentration im dynamischen Bereich der sigmoidalen Kurve liegt und so Zu- und Abnahme der metabolischen Zellaktivität gut detektierbar sind, insgesamt aber auch ein deutlich messbarer toxischer Effekt bewirkt wird.



Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurve des Suramins

Spinalganglienzellkulturen wurden auf einer 96-*Well* Zellkultur Platte für 24h mit ansteigenden Suraminkonzentrationen behandelt. Die metabolische Aktivität wurde mittels MTT-*Assay* gemessen. Die Werte sind auf die Kontrolle (CTR) mit Aq. dest. normalisiert. **Darstellung:** Mittelwert±Standardabweichung, Anzahl (N)=12 pro Datenpunkt aus zwei unabhängigen Experimenten; **Statistik:** nicht lineare Regressionsanalyse, IC 50: 283,5 µM Suramin; 95% Konfidenzintervall: 226,4-354,5µM Suramin
Ursprünglich sollte der MTT-Assay mit dem Cytotox-Fluor Cytotoxicity AssayTM kombiniert werden, um die Sensitivität der Zellvitalitäts-Messungen zu erhöhen. Jedoch kam es unter der Verwendung von Suramin zu einer Störung des Versuchsablaufs (diskutiert in 5.3.1).

In Abb. 5 lässt sich erkennen, dass zunehmende Suramin-Konzentrationen zu einer stetigen Abnahme des Fluoreszenzsignals führten. Dies würde bei korrekt funktionierendem *Assay* bedeuten, dass mit Suramin inkubierte Spinalganglienzellkulturen im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Anzahl an toten Zellen aufweisen.



Abbildung 5: *Cytotox-Fluor Cytotoxicity Assay*TM an Suramin-behandelten Spinalganglienzellkulturen Spinalganglienzellkulturen wurden auf einer 96-*Well* Zellkultur Platte für 24h mit ansteigenden Suraminkonzentrationen behandelt. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde auf die Lösungsmittel-Kontrolle mit Aq. dest. in Prozent normiert. Darstellung: Mittelwert±Standardabweichung; Anzahl (N)=6 pro Kondition

In Abb. 6 sind als morphologisches Korrelat, der mittels Dosis-Wirkungskurve beschriebenen Zellschädigung, lichtmikroskopische Aufnahmen von mit Suramin behandelten Spinalganglienzellen dargestellt. Spinalganglienzellen, die mit höheren Suraminkonzentrationen behandelt wurden, wiesen dabei eine deutlich stärkere Granulierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf (vor allem bei Konzentrationen von 400 μ M und 1000 μ M Suramin). Dies kann als Korrelat für den Verlust zellulärer Integrität angesehen werden.



Abbildung 6: Spinalganglienzellkulturen behandelt mit verschiedenen Suraminkonzentrationen über 24 h A: unbehandelte Kontrolle B: Suramin 10μM C: Suramin 100μM D: Suramin 400μM E: Suramin 1mM; lichtmikroskopische Aufnahmen, Vergrößerung: 20x, Leica DMI 3000

4.2 Calciumeinstrom in Spinalganglienzellen unter Suraminbehandlung

4.2.1 Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum

Wie in 2.3.3 beschrieben, deuten Ergebnisse von Sun und Windebank auf einen Einstrom von extrazellulärem Calcium in Spinalganglienzellen unter Suramineinwirkung hin. Um dies zu verifizieren und quantifizieren, wurden Calcium-*Imaging* Experimente in calciumhaltigem und calciumfreiem *Imaging*-Puffer durchgeführt.

Abb. 7 zeigt die Veränderungen des intrazellulären Calciumgehalts von Spinalganglienzellen nach Suraminzugabe in einer Endkonzentration von 1 mM im Vergleich zur Kontrolle mit Aq. dest. Die Messungen fanden in calciumhaltigem HEPES-Puffer statt. Abb. 7A stellt hierbei exemplarisch den Verlauf des Calciumanstiegs zweier beobachteter Zellen (Suramin-behandelt versus CTR) dar, wohingegen Abb. 7B die Höhe des absoluten Calciumanstiegs aller unter diesen Bedingungen gemessenen Zellen zusammenfasst. Der mediane Calciumanstieg unter Suramin betrug hierbei 56,37 nM \pm 41,16 nM im Vergleich zu 2,53 nM \pm 3,1 nM (jeweils Median \pm SD) unter Kontrollbedingungen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (p<0,0001; Mann-Whitney U Test).



Abbildung 7: Calcium-Imaging von Spinalganglienzellen in calciumhaltigem HEPES-Puffer A: intrazellulärer Calciumgehalt (Ca²⁺ Int) im Zeitverlauf über 4,37 Minuten von einer Zelle nach Suramin- und einer nach Aq. dest.- (CTR) Zugabe. Erster Pfeil: Suramin-/Aq.dest.-Zugabe, zweiter Pfeil: Ionomycinzugabe (interne Kontrolle). B: Höhe des Anstiegs, des intrazellulären Calciumgehalts (Δ Ca²⁺ Int) nach Suraminzugabe im Vergleich zur Kontrolle mit Aq.dest. Darstellung: Box-Plots mit Median, Interquartilabständen und 10.-90. Perzentile; Anzahl (N)=26 (CTR) vs. 31 (Sur), Median=2,53 (CTR) vs. 56,37 (Sur) nM, SD=3,1 (CTR) vs. 41,16 (Sur) nM; Statistik: Man-Whitney U Test (****=p<0,0001, Aq.dest.=destilliertes Wasser, CTR= Kontrolle, LM= Lösunsgmittel, nM=nanomolar, Sur= Suramin)

Im Anschluss an den beschriebenen Nachweis des Calciumeinstroms in die Spinalganglienzellen sollte der Ursprungsort der Calciumionen lokalisiert werden. Hierfür wurden Calcium-*Imaging* Experimente in Calcium freiem HEPES-Puffer durchgeführt (siehe Abb. 8). In Abb. 8A lässt sich erkennen, dass es im Messverlauf einer exemplarisch dargestellten Zelle, nach Suraminzugabe zu

einem leichten Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration kam. Abb. 8B zeigt die Höhe des Calciumabfalls von Suramin behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit Aq.dest.. Die mediane Veränderung des Calciumgehalts lag unter Suraminwirkung bei -0,355 nM \pm 1,687 nM im Vergleich zu -0,027 nM \pm 0,355 nM (jeweils Median \pm SD) nach Aq. dest.-Zugabe. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (p=0,0595; unabhängiger, zweiseitiger T-Test mit Welch-Korrektion).



Abbildung 8: Calcium-Imaging von Spinalganglienzellen in calciumfreiem HEPES Puffer A: intrazellulärer Calciumgehalt (Ca²⁺ Int) im Zeitverlauf über 4,37 min von einer Zelle nach Suraminzugabe. Erster Pfeil: Suraminzugabe 1 mM; zweiter Pfeil: Ionomycinzugabe (interne Kontrolle). B: Höhe des Anstiegs, des intrazellulären Calciumgehalts (Δ Ca²⁺ Int) nach Suraminzugabe im Vergleich zur CTR mit Aq.dest. **Darstellung:** Box-Plots mit Median, Interquartilabständen und 10.-90. Perzentile, Anzahl (N)=25 (CTR) vs. 24 (Sur), Median= -0,027 (CTR) vs. -0,692 (Sur) nM; SD=0,355 (CTR) vs. 1,687 (Sur) nM; **Statistik:** ungepaarter, zweiseitiger T-Test mit Welch-Korrektion; (Aq.dest.=destilliertes Wasser, CTR= Kontrolle, LM= Lösungsmittel, nM=nanomolar, ns=nicht signifikant, Sur= Suramin)

4.2.2 Variable Dynamik des Calciumeinstroms

Die Messungen des intrazellulären Calciumgehalts zeigten Unterschiede in der Dynamik des Suramin-induzierten Calciumeinstroms in Spinalganglienzellen. Aufgrund dessen definierten wir Kriterien, mit denen wir die Spinalganglienzellen anhand ihres intrazellulären Calciumprofils in Gruppen einteilten. Diese Kriterien sind in Tab. 7 dargestellt. Gruppe 1 repräsentiert dabei Zellen, die mit einem prompten Calciumanstieg auf die Suraminbehandlung reagierten, wohingegen Zellen der Gruppe 2 einen verzögerten anhaltenden Calciumeinstrom aufwiesen. Die Zellen, die der Gruppe 3 zugewiesen wurden, zeigten Charakteristika von beiden zuvor genannten Gruppen. In den Zellen aus Gruppe 4 führte Suramin nicht zu einem veränderten Calciumgehalt. Für diese Auswertung wurden alle durchgeführten Kontrollen der Calcium-*Imaging*-Experimente zusammengefasst. Neun Zellen zeigten ein stark abweichendes Calciumprofil, welches sich keiner der vier Gruppen zuordnen ließ. Diese wurden ausgeschlossen.

Gruppe(Gr.)	Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Gr. 1	 max. Anstieg des Ca²⁺ Int. in den ersten 10 Sek. nach Suraminzugabe: ≥ 20 nM (Max.1) Anschließend: Abfall des Ca²⁺ Int. in erster Min. nach Suraminzugabe um 80% des primären Anstiegs, mind. aber unter Ausgangswert + 20 nM 	 zweites Max. des Ca²⁺ int. mit ΔCa²⁺ int.(Max.2): ≥20 nM
Gr. 2	 max. Anstieg des Ca²⁺ Int. nach Suraminzugabe: ≥20nm 	1. Einschlusskriterium 1 von Gruppe 1
Gr. 3	 max. Anstieg des Ca²⁺ Int. in ersten 10 Sek. nach Suraminzugabe ≥ 20 nM zweites Einschlusskriterium von Gr.1 und Ausschlusskriterium Gr.1 erfüllt ODER zweites Einschlusskriterium von Gr.1 nicht erfüllt 	
Gr. 4		 Anstieg des Ca²⁺ Int. ≥20 nM

Tabelle 7: Kriterien zur Gruppeneinteilung der Spinalganglienzellen anhand des CalciumprofilsZur Zuteilung zu einer der Gruppen mussten jeweils alle Einschlusskriterien erfüllt sein. Sobald ein Ausschlusskriteriumerfüllt wurde, wurde die entsprechende Zelle nicht dieser Gruppe zugeteilt (Δ =Betrag, Ca²⁺ Int=intrazellulärerCalciumgehalt, nm=nanomolar, max.=maximal, Max.=Maximum, Min.=Minute, Sek.=Sekunde)

Abb. 9A zeigt exemplarisch den Verlauf des Suramin-induzierten Calciumanstiegs in Spinalganglienzellen, die den Gruppen 1-3 zugerechnet wurden.

Abb. 9B stellt das prozentuale Vorkommen der vier definierten Gruppen grafisch dar. Spinalganglienzellen, die den Gruppen 2 und 3 zugeteilt wurden, zeigten den Kriterien entsprechend einen verzögerten, aber anhaltenden Anstieg des intrazellulären Calciumgehalts. Somit lässt sich erkennen, dass dieser anhaltende intrazelluläre Calciumanstieg in 71,8% der Spinalganglienzellen nachzuweisen war (Gruppen 2 und 3).



Abbildung 9: Einteilung von Spinalganglienzellen in Gruppen 1-4 anhand der Dynamik des Calciumeinstroms unter Suraminbehandlung

A: zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf des intrazellulären Calciumgehalts (Ca^{2+} Int) von Suramin-behandelten Spinalganglienzellen, die den Gruppen 1-3 zugeordnet wurden. Die entsprechenden Kriterien zur Gruppeneinteilung sind in Tab. 7 dargestellt. **B** zeigt die prozentuale Aufteilung der untersuchten Spinalganglienzellen in die vier definierten Zellgruppen

4.3 Untersuchung von membranständigen Ionenkanälen in Spinalganglienzellen unter Suraminbehandlung

4.3.1 Auswirkungen von spezifischen Ionenkanalinhibitoren auf die metabolische Aktivität

In 4.2 wurde gezeigt, dass es unter Suramineinwirkung zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium in Spinalganglienzellen kommt. Um nun spezifische Kanäle zu identifizieren, welche unter Suraminbehandlung einen Calciumeinstrom ermöglichen, sollten membranständige Ionenkanäle untersucht werden. Dies erfolgte mittels Messung der metabolischen Aktivität durch den MTT-*Assay* nach Suramin Inkubation sowie gleichzeitiger Einwirkung eines spezifischen Ionenkanalinhibitors (siehe 3.3). Es wurden VGCC sowie TRP-Kanäle untersucht. Dafür wurden Inhibitoren der jeweiligen Subtypen verwendet. Diese sind in Tab. 8 dargestellt.

Inhibitor	Strukturformel	Beschreibung
Nimodipin		Inhibition von L- Typ VGCCs ⁷⁶
Efonidipin		Inhibitor an L- und T- Typ VGCCs 77
Ruthenium Rot	_(NH ₃)₄RuCRJ(NH-3₄ORu [NH-3₄] ^{6*} 8GT	unselektiver Inhibitor von verschiedenen VGCCs, Ryanodin Rezeptoren, mitochondrialen Calcium Kanälen und Capsaicin aktivierten Calciumkanälen ⁷⁸⁻⁸¹
SNX 482	Сарай айдары үз-Айа Сарабул-Алу-Түн-Май Рон-Сүн-Сүн-Сүн-Сүн-Али-Сарабул-Алу-Түн-Май Суз-Рас-Алу-Сун-Сун-Күн-Күн-Карабул-Карабул- Ser-Lyt-Сун-Кин-Түн-Арр-Цар-Гар-Мар	R-Typ VGCC Inhibitor ⁸²
ω- Conotoxin MVIIC	Cys-ys-Oly-Lys-Cly-Ala-Pin-Cys-Arg-Lys- In-Met-Tyr-Asp-Cys-Cys-Ser-Gy-Ser-Cys- GM:Arg-Arg-Shy-Lys-Cys-NHy	Aus der Zauberkegelschnecke (conus magnus) isoliertes Neurotoxin; Antagonist an N-, P- und Q- Typ VGCC ^{83,84}
HC 067047		TRPV4 Inhibitor ⁸⁵
A 967079	F OH	TRPA1 Inhibitor ⁸⁶
Pyr 3		TRPC3 Inhibitor ⁸⁷
Ononetin	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	TRPM3 Inhibitor ⁸⁸

Tabelle 8: Inhibitoren membranständiger IonenkanäleDie dargestellten Inhibitoren wurden zur Untersuchung der Suramintoxizität auf Spinalganglienzellen verwendet.

Abb. 10 und Abb. 11 zeigen die Ergebnisse der MTT-*Assays* nach ca. 24 stündiger Inkubation von Spinalganglienzellkulturen mit Suramin und verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Ionenkanalinhibitoren. Es lässt sich erkennen, dass die metabolische Aktivität bei Kontrollinkubation mit den verschiedenen Inhibitoren ohne gleichzeitige Suraminbehandlung bei folgenden Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle mit Aq. dest. signifikant verringert war: 10 μ M und 50 μ M Efonidipin (Abb. 10B) (90,07 % ± 8,83 % und 75,5 % ± 8,96 %; jeweils MW ± SD mit p<0,05; oneway ANOVA mit Holm's Sidak PostHoc-Test), 1 μ M Ruthenium Rot (Abb. 10C) (76,52 % ± 10,46 %; MW ± SD mit p<0,05; oneway ANOVA mit p<0,05; oneway ANOVA mit Holm's Sidak PostHoc-Test), sowie 100 nM HC067047 (Abb. 11A) (91,41 % ± 10,77 %; MW ± SD mit p<0,05; oneway ANOVA mit Holm's Sidak PostHoc-Test). Die übrigen Kontrollen der verschiedenen Ionenkanal-Antagonisten zeigten in keiner Konzentration eine signifikante Veränderung der metabolischen Aktivität (Abb. 10A-E und Abb. 11A-D).

Im Vergleich zu Aq. dest. behandelten Kontrollen war die metabolische Zellaktivität unter allen Suramin-koinkubierten Bedingungen signifikant erniedrigt (Abb. 10A-E und Abb. 11A-D).

In Abb. 10a ist unter Koinkubation Suramin-behandelter Zellen mit Nimodipin in Konzentrationen von 100 μ M und 150 μ M eine signifikante Erhöhung der metabolischen Zellaktivität im Vergleich zur Kontrolle mit Suramin und DMSO zu erkennen. Der Anstieg der metabolischen Aktivität lag für Nimodipin 100 μ M bei 15,10 % ± 8,756 % und für Nimodipin 150 μ M bei 19,05 % ± 6,35 % (jeweils MW ± SD und p < 0,0001; oneway ANOVA mit Holm's Sidak post hoc Test). Wie zuvor beschrieben war die metabolische Aktivität dieser Konditionen im Vergleich zur Kontrolle mit Aq. dest. jedoch immer noch signifikant erniedrigt (Abb 10A).

Im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle führte auch eine Koinkubation von Suraminbehandelten Zellen mit HC067047 in Konzentrationen von 10 nM und 100 nM zu einer signifikanten Erhöhung der metabolischen Aktivität um 7,193 % \pm 8,717 % und 7,131 % \pm 5,519%, wohingegen diese bei einer Konzentration von 1 nM mit -7,471 % \pm 9,108 % signifikant erniedrigt war (jeweils MW \pm SD und p< 0,05; oneway ANOVA mit Holm's Sidak post hoc Test) (Abb. 11a).

Des Weiteren zeigte eine Koinkubation von Suramin-behandelten Zellen mit folgenden Ionenkanalinhibitoren einen Trend hin zu einer erhöhten metabolischen Aktivität im Vergleich zur Suramin-behandelten Kontrolle, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen: Ruthenium Rot in Konzentrationen von 10 nM, 100 nM und 1000 nM (Abb. 10c), A967079 in einer Konzentration von 10 nM (Abb. 11b).



Abbildung 10: 24h Inkubation von Spinalganglienzellen mit 400μM Suramin, VGCC-Inhibitoren und jeweiligen CTR A-E metabolische Aktivität in Prozent normalisiert auf die LM-CTR mit Aq. dest (%CTR); **a-e** metabolische Aktivität der mit Suramin und Inhibitor koinkubierten Zellkulturen, als Differenz zur CTR mit Suramin und LM (Δ%CTR); **Darstellung:** MW±SD; N=8-9 aus 3 unabhängigen Experimenten, außer LM-Kontrollen: N=8-18 aus 3-6 unabhängigen Experimenten; LM ist das Lösungsmittel von Suramin (Aq. Dest.) bzw. der VGCC-Inhibitoren (Aq. dest. oder DMSO) **Statistik:** *oneway ANOVA* mit Holm's Sidak PostHoc-Test (****p<0,0001, ***p<0,001, CTR=Kontrolle, ns= nicht signifikant)



Abbildung 11: 24 h Inkubation von Spinalganglienzellen mit 400μM Suramin, TRP-Kanal-Inhibitoren und den CTR A-D: metabolische Aktivität in Prozent im Vergleich zur LM-CTR mit Aq. dest. (%CTR); **a-d:** metabolische Aktivität der mit Suramin inkubierten Zellkulturen, berechnet als Differenz zur CTR mit Suramin und LM (Δ%CTR); **Darstellung:** MW±SD; N=8-9 aus 3 unabhängigen Experimenten, außer LM-CTR: N=8-18 aus 3-6 unabhängigen Experimenten; LM ist das Lösungsmittel von Suramin (Aq. dest.) bzw. der TRP-Kanal-Inhibitoren (DMSO) **Statistik:** normalverteilte Daten *oneway ANOVA* mit Holm's Sidak Post Hoc-Test; nicht normalverteilte Daten - Kruska-Wallis-Test mit Dunn's post hoc Test (*p<0,05, ****p<0,0001, CTR=Kontrolle, nM=nanomolar, ns= nicht signifikant)

4.3.2 Auswirkungen von spezifischen Ionenkanalinhibitoren auf den Calciumeinstrom

Unter Beachtung der Ergebnisse aus 4.3.1 wurden nachfolgend die Auswirkungen einiger Ionenkanalantagonisten auf den Suramin-induzierten Calciumeinstrom in Spinalganglienzellen untersucht. In diesen Experimenten wurden jene Substanzen verwendet, die zuvor im MTT-*Assay* zu einer signifikanten Erhöhung der metabolischen Aktivität unter Suraminwirkung führten oder die zumindest einen in diese Richtung weisenden Trend zeigten.

Abb. 12A-D zeigen die Ergebnisse des Calcium-*Imagings* bei Zugabe von Suramin nach Präinkubation mit dem jeweils dargestellten Ionenkanalinhibitor.

In Abb. 12A ist zu erkennen, dass der mediane intrazelluläre Calciumanstieg unter vorheriger Inkubation mit 150 µM Nimodipin 54,75 ± 66,34 nM (Median ± SD) betrug, wohingegen dieser bei DMSO-Kontrolle einen Wert von 101,4 ± 57,43 nM annahm. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (p=0,023; Mann-Whitney U Test).

Bei Präinkubation mit 1 μ M Ruthenium Rot (Abb. 12B), 0,5 μ M A967079 (Abb. 12C) und 1 μ M HC067047 (Abb. 12D) zeigte sich im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den medianen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.



Abbildung 12: Calcium-Imaging von mit Suramin und Ionenkanal-Inhibitoren behandelten Spinalganglienzellen Dargestellt ist der die Differenz des intrazellulären Calciumanstiegs (Δ Ca²⁺ Int) unter Suraminzugabe nach fünf-minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Ionenkanal-Inhibitor bzw. LM als CTR (Aq. dest. oder DMSO) in calciumhaltigem HEPES-Puffer A: Nim (N=34) vs. CTR (N=35); Median±SD=54,75± 66,35 nM (Nim) vs.101,4 ± 57,43nM (CTR); B: RR (N=33) vs. CTR (N=36); Median±SD=99,54 ± 68,59 nM (RR) vs. 105,2 ± 93,27 nM (CTR) C: A (N=40) vs. CTR (N=43); Median±SD=46,55 ± 46,43 nM (A) vs. 44,89 ± 58,71 nM (CTR) D: HC (N=46) vs. CTR (N=18); Median±SD= 64,40 ± 49,63 nM (HC) vs. 63,86 ± 72,42 nM (CTR); Darstellung: Box-Plots mit Median, Interquartilabständen und 10.-90. Perzentile; Statistik: normalverteilte Daten: ungepaarter, zweiseitiger T-Test; nicht normalverteilte Daten: Mann-Whitney U Test; (*=p<0,05, A=A967079, CTR=Kontrolle, HC=HC 067047, LM=Lösungsmittel, Nim=Nimodipin, nM=nanomolar, ns=nicht signifikant, RR=Ruthenium Rot)

4.4 Untersuchung der Apoptoseinduktion in Suramin behandelten Spinalganglienzellen

4.4.1 Inhibition von Enzymen der Apoptosekaskade unter Suraminbehandlung

Wie in der Einleitung erläutert, kann eine veränderte Calciumhomöostase zu einer Induktion apoptotischer Prozesse führen, in welche Caspasen und Calpain involviert sind (siehe 2.2). Aufgrund dessen sollte untersucht werden, ob eine Inhibition dieser Kaskaden mit spezifischen Inhibitoren die metabolische Aktivität der Zellen im MTT-*Assay* unter Suramineinwirkung erhöht. Hierfür wurden Ac DEVD CHO, ein Caspase 3/7 Inhibitor ⁸⁹, sowie MDL 28170, ein selektiver Inhibitor von µ-Calpain (Calpain 1) und m-Calpain (Calpain 2) ⁹⁰ verwendet. Abb. 13 zeigt die

Ergebnisse der MTT-*Assays* nach ca. 24 stündiger Inkubation von Spinalganglienzellkulturen mit Suramin und den genannten Inhibitoren. Es lässt sich erkennen, dass die alleinige Inkubation mit Ac DEVD CHO sowie MDL 28170 im Vergleich zur Kontrolle mit Aq. dest. nicht zu einer signifikanten Veränderung der metabolischen Aktivität der Zellen führte (Abb. 13A und Abb. 13B). Unter gleichzeitiger Suramininkubation kam es jedoch bei allen Konditionen zu einer signifikanten Verminderung der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13A und Abb. 13B). Abb. 13a und Abb. 13b zeigen, dass die gleichzeitige Behandlung der Zellkulturen mit Suramin und dem jeweiligen Inhibitor in keiner der Konzentrationen eine signifikante Veränderung der metabolischen Aktivität im Vergleich zur Suramin behandelten Kontrolle bewirkte. Allerdings kam es im Vergleich zur Kontrolle bei Intervention durch Ac DEVD CHO in Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung der metabolischen Aktivität in Höhe von 6,01 % ± 9,50 % und 3,83 % ± 5,64 % (jeweils MW im Vergleich zur Kontrolle ± SD; nicht signifikant; oneway ANOVA mit Holm's Sidak PostHoc Test).

Ergebnisse



Abbildung 13: 24 h Inkubation von Spinalganglienzellen mit 400µM Suramin, Caspase 3/7 bzw. Calpain-Inhibitoren und jeweiligen Kontrollen:

A und B: metabolische Aktivität in Prozent normalisiert auf die LM-Kontrolle mit Aq. Dest (% CTR); a und b: metabolische Aktivität der mit Suramin und Inhibitor koinkubierten Zellkulturen als Differenz zur Kontrolle mit Suramin und LM (Δ % CTR) Darstellung: MW±SD; N=8-11 aus 3-4 unabhängigen Experimenten, LM ist das Lösungsmittel von Suramin (Aq. Dest.) bzw. der Inhibitoren (DMSO); Statistik: *oneway ANOVA* mit Holm's Sidak PostHoc-Test (****p<0,0001, CTR=Kontrolle, μ M=micromolar, nM=nanomolar, ns= nicht signifikant)

4.4.2 Caspase-Aktivität nach Suraminbehandlung

Unter Inhibition der Apoptosekaskade mit spezifische Inhibitoren kam es nicht zu einer Steigerung der metabolischen Aktivität von Suramin behandelten Spinalganglienzellen (siehe 4.4.1). Deshalb sollte mittels eines Caspase-*Assays* bestimmt werden, ob und in welchem Maße Suramin in Spinalganglienzellen zu einer Aktivierung spezifischer Enzymkaskaden der Apoptose führt. Die Hintergründe hierzu sind in 2.2 und 3.5 beschrieben.

Abb. 14A zeigt die gemessene Caspase-Aktivität als Prozent der Kontrolle mit Aq. dest. Auffällig ist, dass die gemessene Caspase-Aktivität zu den Zeitpunkten 0h, 6h und 12h unter der gemessenen Aktivität der Aq. dest. Kontrolle lag. Zu den Messzeitpunkten 18h und 24h stieg die Caspase-Aktivität bis auf 111,57 % \pm 14,31 % und 138,02 % \pm 8,37 % (jeweils MW \pm SD) der Aktivität der Aq. dest. Kontrolle an. Abb. 14B zeigt ein Folgeexperiment zur Klärung der Ursache des erniedrigten Signals unter Suraminbehandlung. Hierfür wurden drei Gruppen von Spinalganglienzellkulturen verglichen. Zwei Gruppen wurden für ca. 24h mit Aq. dest. und die

dritte mit 400 μ M Suramin behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den *Assay*-Reagenzien (siehe 3.5.2) Direkt vor Detektion des Signals im Luminometer wurde zu einer der beiden Aq. dest. Gruppen Suramin (Aq.dest.+Sur) in einer Endkonzentration von 400 μ M hinzugegeben.

Bei der Gruppe Sur+Aq.dest. wurde mit 191,67 % \pm 8,39 (MW \pm SD) eine signifikante erhöhte Caspase-Aktivität gemessen, wohingegen der *Assay* bei der Gruppe Aq. dest.+Sur mit 67,89 % \pm 3,31 % (MW \pm SD) eine signifikant erniedrigte Caspase-Aktivität detektierte. (p<0,0001; *oneway ANOVA* mit Holm-Sidak postHoc Test).



Abbildung 14: *Caspase 3/7 Glo*® *Assay* an Suramin-behandelten Spinalganglienzellkulturen A: zeigt die zu den dargestellten Zeitpunkten in Spinalganglienzellen gemessene Caspase-Aktivität unter Inkubation mit 400μM Suramin im Vergleich zur Aq. dest. Kontrolle; **Darstellung:** MW±SD, N=4 pro Kondition; **Statistik:** ungepaarter, zweiseitiger T-test B: Inkubation von Spinalganglienzellen mit Aq. dest. (Gruppe: CTR (Aq.dest.) und Aq.dest.+Sur) bzw. 400 μM Suramin (Gruppe: Sur+Aq.dest.) für 24h, Hinzufügen von Suramin zur Gruppe Aq.dest+Sur (Endkonzentration 400 μM) und Aq.dest zur Gruppe Sur+Aq.dest. direkt vor Lumineszenzmessung; **Darstellung:** MW±SD, N=4 pro Kondition; **Statistik:** *oneway-ANOVA* mit Holm's Sidak PostHoc-Test (***p<0,001; ****p<0,0001, Aq.dest.=destilliertes Wasser; CTR=Kontrolle; h=Stunde; LM=Lösungsmittel; Sur=Suramin)

4.5 Untersuchung der Interaktion des Suramins mit Luminophoren

4.5.1 Absorptionsmessungen des Suramins

Bei der Durchführung von Fluoreszenz- und Luminszenz-*Assays* zeigten sich unter Verwendung von Suramin Interaktionen (diskutiert in 5.3.1). Deshalb untersuchten wir einen möglichen Zusammenhang mit einer Lichtabsorption Suramins. Die Messung des Absorptionsspektrums von Suramin zeigte spezifische Absorptionsmaxima bei 238 nm und 315 nm (nicht dargestellt).

Bei dem genutzten Fluoreszenz-Assay wird die Emission bei 535 nm detektiert (siehe 3.4). Im Rahmen des verwendeten Lumineszenz-Assays sind Luciferasen für die Umsetzung des Luminophors verantwortlich, sodass ein Lichtsignal im Bereich von 500 nm emittiert und gemessen wird (siehe 3.5). Aufgrund dessen wurde im Tristar LB941 Multimode Microplate

Reader die Absorption einer Suraminprobe im Vergleich zu einer Kontrolle mit Aq. dest. bei Wellenlängen im Bereich von 500 nm gemessen. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Sowohl die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 485 nm, als auch bei 550 nm zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.



Abbildung 15: Absorptionsmessung im Tristar LB941 Multimode Microplate Reader

A und B stellen die Absorption von 400 μM Suramin in Aq. dest. gelöst im Vergleich zur Aq.dest. CTR bei Durchleuchtung mit Wellenlängen von 485 nm und 550 nm dar. Darstellung: MW+SD; N=6 pro Kondition; Statistik: zweiseitiger, ungepaarter T-Test; (%CTR=Prozent von der Kontrolle, Aq. dest.= destilliertes Wasser, CTR=Kontrolle, LM= Lösungsmittel, ns= nicht signifikant)

4.5.2 Fluoreszenzbestimmung

4.5.2.1 Fluoreszenzeigenschaften des Suramins

Da die Messung des Absorptionsspektrums von Suramin spezifische Absorptionsmaxima bei 238 nm und 315 nm zeigte erfolgte die Fluoreszenzmessung zunächst mit einer Anregung dieser Wellenlängen.

In Abb. 16A und Abb. 16B sind die entsprechenden Emissionsspektren dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass Suramin bei Anregung mit Wellenlängen von 238 nm und 315 nm fluoreszente Eigenschaften aufweist. Das Emissionsmaximum lag bei Anregung mit beiden Wellenlängen bei 400-405 nm.

Um Interferenzen der Fluoreszenzeigenschaften Suramins mit den Messungen des Calcium-*Imagings* zu detektieren bzw. auszuschließen wurde das Emissionsspektrum von Suramin ebenfalls bei Exzitationswellenlängen von 340 nm und 380 nm bestimmt, da diese Wellenlängen zur Anregung von Fura-2 in den Calcium-*Imaging*-Experimenten genutzt wurden (Abb. 16C und Abb. 16D). Bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm zeigt sich ebenfalls ein Emissionssignal mit einem Maximum um 400- 405 nm. Bei Anregung mit einer Wellenlänge von 380 nm wurde kein Suramin-spezifisches Signal gemessen.



Abbildung 16: Fluoreszenzintensität von 10 µM Suramin bei verschiedenen Anregungswellenlängen Messung am Fluorimeter Fluoromax-P.

4.5.2.2 Fluoreszenzeigenschaften des Suramins unter dem Fluoreszenzmikroskop



Abbildung 17: Änderung der Fluoreszenzintensität im Fura-340 Kanal unter Suraminzugabe

Zunahme der Fluoreszenzintensität in Prozent unter Suraminzugabe im Vergleich zur vorher bestimmten *Baseline*. Messung am Fluoreszenzmikroskop IX-80 bei Zugabe von Suramin in verschiedenen Konzentrationen im Fura 340 Kanal ohne vorherige Beladung der Spinalganglienzellen mit Fura-2; Darstellung: MW±SD; N=5-7 pro Kondition Da fluoreszente Eigenschaften von Suramin bei Exzitation mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden konnten, sollte die Fluoreszenz. für in einem die Calciumexperimente genutzten Messaufbau, getestet werden. Abb. 17 stellt die Änderung der Fluoreszenzintensität, an definierten ROIs, unter Zugabe von Suramin in verschiedenen Konzentrationen zu Spinalganglienzellkulturen, die nicht mit Fura-2 beladen waren, dar. Die Anregung erfolgte bei 340 nm und die Detektion bei 510 nm. Es zeigt sich im Durchschnitt ein geringer Anstieg der Fluoreszenzintensität von ca 0,3-2,75% nach Suraminzugabe, je nachdem welche Konzentration verwendet wurde.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die neurotoxische Wirkung Suramins im Zellkulturmodell untersucht, da verschiedene klinische und experimentelle Untersuchungen das Auftreten einer Suramin-induzierten Neuropathie beschrieben (siehe 2.3.2).

5.1 Neurotoxische Wirkung des Suramins in-vitro

So führten z.B. Chaudhry et al. elektrophysiologische Untersuchungen an mit Suramin behandelten Patienten durch. Insgesamt wiesen die meisten betroffenen Patienten verringerte sensible und motorische Nervenaktionspotentiale verschiedener peripherer Nerven als Korrelat eines primär axonalen Schadens auf. In selteneren Fällen stand eine verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeit als Hinweis auf eine demyelinisierende Neuropathie im Vordergrund ⁴⁴. In Übereinstimmung mit diesem klinisch nachgewiesenen primär axonalen bzw. neuronalen Schaden konnte in der vorliegenden Arbeit eine dosisabhängige, toxische Wirkung Suramins auf Spinalganglienzellen in-vitro nachgewiesen werden (siehe Abb. 4). Spinalganglienzellen stellen eine Untergruppe von primär sensiblen Neuronen und somit dem sensiblen Nervensystem dar. Die Ergebnisse bestätigen zuvor publizierte in-vitro-Untersuchungen an Suramin-behandelten Spinalganglienzellkulturen ^{26,53}. In diesen wurde mit 300 µM Suramin eine sehr ähnliche Konzentration wie in der hier vorliegenden Arbeit (400 µM Suramin) genutzt. Des Weiteren lässt sich die hier gezeigte Schädigung von Spinalganglienzellen mit den Ergebnissen aus Tiermodellen zur Suramin-induzierten Neuropathie vereinbaren. Russel et al. wiesen eine vornehmlich axonale Polyneuropathie sowohl in einer Niedrigdosis- als auch in einer Hochdosisgruppe nach. In der Hochdosisgruppe trat die Neuropathie jedoch schneller auf, was ebenfalls einen dosisabhängigen Effekt nahelegt. Die mittleren Spitzenplasmaspiegel lagen bei 245 µM in der Niedrigdosis- und bei 749 μ M in der Hochdosisgruppe ⁴⁸.

Wie schon in 2.3.2 dargestellt, wurde auch in klinischen Studien das Risiko für das Auftreten einer Suramin-induzierten Neuropathie mit maximalen Plasmaspiegeln von mehr als 350 µg/ml bzw. 245 µM in Verbindung gebracht. Insgesamt zeigt sich also zwischen unserer Arbeit und anderen *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen sowie klinischen Studien eine starke Vergleichbarkeit bezüglich der Dosisabhängigkeit der Suramin-induzierten Neuropathie.

5.1.1 Die Spinalganglienzellkultur als Modell zur Messung der Neurotoxizität

In der vorliegenden Arbeit wurde die Spinalganglienzellkultur aus postnatalen Ratten als Modell zur Untersuchung neurotoxischer Wirkungen genutzt. Diese primäre, neuronale Zellkultur stellt Originalgewebe mit entsprechenden Merkmalen und Funktionen dar. Das Gewebe differiert nicht, wie z.B. immortalisierte Zelllinien, geno- und phänotypisch von ihren Ursprungszellen. Dies lässt eine bessere Übertragbarkeit auf Vorgänge *in-vivo* zu ⁹¹. Ein Nachteil, den eine primäre Zellkultur gegenüber der Verwendung von Zelllinien jedoch birgt, ist die Kontamination durch *unerwünschte* Zellen. In der hier diskutierten Zellkultur sind dies nicht-neuronale Zellen, wie z.B. Fibroblasten oder Schwann-Zellen. In einer neuronalen Zellkultur ist dieses Problem von besonderer Bedeutung, da die nicht-neuronalen Zellen im Gegensatz zu den postmitotischen Nervenzellen zur Teilung fähig sind und so die Zellkultur überwachsen können. In den durchgeführten Experimenten stand dieses Problem jedoch, aufgrund der Kürze der Kultivierung (max. 48h) der einzelnen Zellkultur, im Hintergrund.

Insgesamt handelt es sich bei der Spinalganglienzellkultur um ein etabliertes Modell, welches experimentelle routinemäßig für Untersuchungen der CIPN verwendet wird (zusammengefasst in ⁹²). Durch die Verwendung einer dissoziierten Zellkultur konnten die direkten, schädigenden Effekte Suramins bzw. die möglichen protektiven Effekte anderer Substanzen auf die Nervenzellen gut untersucht werden. In-vivo sind die Degeneration von Axonen und Nervenendigungen ein häufiges Korrelat der CIPN. In der Spinalganglienzellkultur liegen diese langen Axone und Nervenendigungen zwar nicht vor, allerdings konnte in diversen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Nervenzellsomata von sensiblen Neuronen den Nervenendigungen in vielen Eigenschaften ähneln. Dies schließt auch den Rezeptor und Ionenkanalbesatz in der Plasmamembran mit ein 93,94 (zusammengefasst in 95,96). Dies ist von besonderer Bedeutung, da der Ionenkanal- und Rezeptorbesatz für unsere Fragestellung von speziellem Interesse war.

Effekte Suramins auf die markscheidenbildenden Schwann-Zellen konnten mit dem genutzten Zellmodell nicht evaluiert werden. Da jedoch in Anbetracht der Literatur die direkte axonalneuronale Schädigung unter Suramin im Vordergrund steht (s.o.), galt unser Interesse den Nervenzellen des PNS. Zu diesen gehören neben den Spinalganglienzellen auch die motorischen und vegetativen Neurone. Wie in 2.3.2 erwähnt, führt die Anwendung von Suramin neben sensiblen auch zu motorischen Defiziten. Die Aussagen der Untersuchungen des hier verwendeten Modells des sensiblen Nervensystems sind in diesem Zusammenhang nur bedingt auf Motoneurone übertragbar. Mit Blick auf unsere Hypothese ist hierbei insbesondere der wahrscheinlich andersartige Besatz mit Rezeptoren und Ionenkanälen dieser Neuronenpopulation zu nennen. Andererseits sind sowohl Motoneurone als auch die primären, sensiblen Spinalganglienzellen Teile des PNS mit teilweise ähnlichen Eigenschaften, sodass von einer gewissen Homologie der Schädigungsmuster ausgegangen werden kann. Es lässt sich resümieren, dass die Spinalganglienzellkultur ein valides Modell des somatosensiblen Nervensystems darstellt und sich insbesondere im Rahmen unserer Hypothese als biologisches Korrelat eignet um die neuronale Schädigung unter Suramin abzubilden.

5.1.2 MTT-Assay als Messinstrument der Toxizität

Innerhalb der Spinalganglienzellkultur wurde das neuronale Überleben unter Intervention mit spezifischen Wirkstoffen gemessen und somit auf die Neurotoxizität zurückgeschlossen. Wie in 3.3.1 beschrieben, wurde die Vitalität der Zellen als Äquivalent der mittels MTT-Assay gemessenen metabolischen Aktivität angesehen. Der MTT-Assay stellt hierbei ein etabliertes Messinstrument dar, um die Zytotoxizität von spezifischen Wirkstoffen in der Zellkultur zu detektieren (zusammengefasst in ⁹⁷). Da der Enzymmetabolismus vitaler Zellen gemessen wird, stellt der MTT-Assay ein indirektes Maß des Zelltods und somit der Toxizität dar. Die enzymatische Reaktion wird allerdings nicht nur davon beeinflusst, ob tote Zellen nicht mehr an der Farbstoffumsetzung teilnehmen, sondern auch durch die Höhe der enzymatischen Aktivität der vitalen Zellen. Das heißt, auch der Aktvierungszustand der Zellen beeinflusst das Testergebnis und so den Rückschluss auf die Anzahl der vitalen Zellen⁹⁸. Darüber hinaus spielt die schon weiter oben erwähnte Reinheit der Zellkultur eine Rolle. Denn der durchgeführte MTT-Assay misst den Metabolismus aller, in der Zellkultur vorhandenen Zellen, sodass sich die Ergebnisse nicht ausschließlich auf den Zustand der Spinalganglienzellen beziehen. Wir verwendeten eine etablierte Methode zur Kultivierung von Spinalganglienzellen, die es ermöglicht, Zellkulturen mit einem Anteil von ca. 90% an neuronalen Zellen zu generieren.

Weitere Parameter, die einen Einfluss auf die Farbstoffreduktion im Rahmen des MTT-*Assays* und somit auf die Test-Sensitivität haben, sind die Glucose-Konzentration, der pH-Wert, aber auch die Mitochondrienanzahl in den Zellen ^{99,100}. Außerdem wurde die Interaktion einiger Substanzen mit dem MTT-*Assay* beschrieben ¹⁰¹. Im Zusammenhang mit der Wirkung Suramins wurde auch die Inhibition der mitochondrialen ATPase nachgewiesen ¹⁰². Da die Reduktion des Tetrazoliumsalzes unter anderem in Mitochondrien erfolgt, könnte auch Suramin über die Mitochondrienschädigung direkte Auswirkungen auf den Farbstoffumsatz haben. Dies ist allerdings eher als Argument für die Verwendung des MTT-*Assays* in diesem Zusammenhang zu werten, da so exakt am Ort der Schädigung gemessen wurde.

Um den Einfluss der angesprochenen Faktoren zu minimieren, führten wir entsprechende Kontrollen immer innerhalb einer Messeinheit (in diesem Fall eine 96-*Well* Platte) durch und vermieden den Vergleich von Ergebnissen zwischen zwei Messeinheiten, wenn dies möglich war. Des Weiteren kann es zum Ausgleich der Messungenauigkeiten sinnvoll sein, verschiedene, biochemische Messverfahren zu kombinieren. In der hier vorliegenden Arbeit war geplant, den *Cytotox-Assay* als zusätzliches Messinstrument zu nutzen. Dieser misst im Gegensatz zum *MTT-Assay* die Freisetzung von Proteasen aus toten Zellen. Allerdings kam es bei der Verwendung von Suramin zu experimentellen Interaktionen, sodass auf die Anwendung des *Cytotox-Assays* verzichtet werden musste (diskutiert in 5.3.1).

Insgesamt kann bei Betrachtung der Dosis-Wirkungskurve festgehalten werden, dass der MTT-*Assay* in dem genutzten experimentellen Kontext ein adäquates Messinstrument zu sein scheint, da erhöhte Suraminkonzentrationen gut mit einer Verringerung der metabolischen Aktivität korrelierten (Abb. 4).

5.2 Der Suramin-induzierte Calciumeinstrom in Spinalganglienzellen

Wie in 2.3.3.3 dargelegt, wurden verschiedene Wirkmechanismen als Ursache für die Neurotoxizität Suramins diskutiert. Sun und Windebank legten anhand ihrer Untersuchungen nahe, dass der Einstrom von Calcium in das Cytosol aus dem Extrazellularraum und nicht aus intrazellulären Kompartimenten die Suramin-Neurotoxizität vermittelt ²⁶.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einstrom von extrazellulärem Calcium in Spinalganglienzellen unter Suramineinwirkung nachgewiesen werden. Dieser Rückschluss ergibt sich aus der Beobachtung, dass es lediglich während der Calciummessungen in calciumhaltigem Extrazellularmedium zu einem signifikanten Suramin-vermittelten Calciumeinstrom kam (siehe Abb. 7). Dahingegen führte die Suraminzugabe in calciumfreiem Medium nicht zu einem intrazellulären Calciumanstieg (siehe Abb. 8). Wären intrazelluläre Speicher, wie das ER, für den Suramin-vermittelten Calciumanstieg verantwortlich, müsste die Messung des Calciumgehalts in calciumfreiem Medium ebenfalls einen Calciumanstieg bei der Zugabe von Suramin detektieren. Bei der Durchführung dieser Messung konnte jedoch im Gegenteil ein leichtes Absinken des intrazellulären Calciumgehalts beobachtet werden (siehe Abb. 8). Dies repräsentiert wahrscheinlich den Fluss von intrazellulärem Calcium durch Suramin-aktivierte Ionenkanäle in den Extrazellularraum. Denn in diesem Fall liegt intrazellulär eine höhere Calciumkonzentration als extrazellulär vor, sodass Calcium, dem Konzentrationsgefälle folgend, ausströmt.

Somit wird deutlich, dass der Suramin-induzierte Calciumeinstrom über die Plasmamembran der Spinalganglienzellen vermittelt wird.

5.2.1 Die Vermittler des Suramin-induzierten Calciumeinstroms

5.2.1.1 Membranständige Ionenkanäle – die potentiellen Kandidaten

Wie in 4.3 beschrieben, wurden spezifische Ionenkanalinhibitoren verwendet, um in dem in 5.1 diskutierten Messsystem die Vermittler des Suramin-induzierten Calciumeinstroms zu identifizieren.

Insbesondere in Neuronen existieren zahlreiche membranständige Kanalproteine, die den Fluss von Calciumionen über die Plasmamembran ermöglichen. In Anlehnung an die Erkenntnisse von Sun und Windebank, dass sich der L-Typ Calciumkanalinhibitor Nimodipin protektiv auf das neuronale Überleben und Neuritenwachstum unter Suramininkubation auswirkt ²⁶, führten wir eine systematische Untersuchung der verschiedenen VGCC durch.

Weitere Rezeptorfamilien, die einen Calciumeinstrom vermitteln können, sind zum Beispiel ionotrope P2X-Purinrezeptoren sowie TRP-Kanäle. An P2X- und P2Y-Purinrezeptoren wurde eine antagonistische Wirkung Suramins beschrieben, sodass wir diese Kanalproteine nicht als Mediatoren des Suramin-vermittelten Calciumeinstroms in Betracht zogen ^{103,104}. Bemerkenswert ist jedoch, dass Purine, wie Adenosintriphosphat (ATP), welche P2X-Rezeptoren aktivieren können, der chemischen Struktur Suramins in gewisser Weise ähneln. Beide Moleküle enthalten aromatische Ringstrukturen und negativ geladene Seitengruppen. Diese Homologie könnte eine Interaktion von Suramin mit Purinrezeptoren erklären. Auch Agonisten und Antagonisten an TRP-Kanälen weisen diese aromatischen Ringstrukturen und negativ geladenen Seitengruppen auf (siehe Tab. 8). Außerdem spielt die TRP-Kanalfamilie, wie in 2.4.2 beschrieben, eine große Bedeutung in der Reizwahrnehmung des somatosensiblen Nervensystems. Aufgrund dieser Aspekte sahen wir die TRP-Kanäle als weitere potentielle Vermittler des Suramin-induzierten Calciumeinstroms in Spinalganglienzellen an. Eine Untersuchung aller 28 bislang identifizierten TRP-Kanäle war im Rahmen des experimentellen Aufbaus nicht zielführend. Deswegen führten wir Experimente zur Untersuchung von vier Vertretern aus jeweils verschiedenen TRP-Kanal Subgruppen durch. Hierbei wählten wir die Antagonisten nach entsprechender Molekülstruktur, aber auch nach der, in der Literatur beschriebenen, klinischen Relevanz und dem Vorkommen der jeweiligen TRP-Kanäle in Spinalganglienzellen aus. Im Fokus der Untersuchungen standen die Kanäle TRPV4 und TRPA1, da diese bereits im Zusammenhang der CIPN beschrieben wurden. TRPV4 scheint eine Rolle in der Paclitaxel-induzierten Neuropathie zu spielen ¹⁰⁵, wohingegen TRPA1 im Rahmen der Neuropathie durch Oxaliplatin beschrieben wurde ¹⁰⁶. Die Kanäle TRPM3 und TRPC3 gehören zu zwei weiteren Subgruppen der TRP-Kanäle und besitzen Funktionen im Rahmen der Thermo- und Mechanosensation. Außerdem konnte eine starke Expression in sensiblen Neuronen nachgewiesen werden ^{69,107,108}.

5.2.1.2 TRP- und spannungsabhängige Calciumkanäle im Blick

Spannungsabhängige Calciumkanäle

In den Zellvitalitätsmessungen konnten wir einen protektiven Effekt von Nimodipin in Konzentrationen von 100 μ M bzw. 150 μ M auf Suramin-behandelte Spinalganglienzellen nachweisen (siehe Abb. 10a). Die hohe Reproduzierbarkeit bei nahezu identischen Konzentrationen validiert hierbei die Wirkung Nimodipins und bestätigt die Ergebnisse von Sun und Windebank teilweise²⁶. Allerdings zeigen unsere Resultate, dass die Inkubation mit Suramin trotz Intervention mittels Nimodipin weiterhin eine deutliche Reduktion des neuronalen Überlebens zur Folge hat (siehe Abb. 10A). Insofern wird deutlich, dass Nimodipin den neurotoxischen Effekt Suramins teilweise, aber nicht vollständig aufheben kann. Unter Berücksichtigung des zuvor beschriebenen Calciumeinstroms aus dem Extrazellularraum in die Spinalganglienzellen, ließ sich daraus schließen, dass der L-Typ VGCC, der durch Nimodipin inhibiert wird, zumindest einen Teil des Calciumeinstroms unter Suramin vermittelt.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in der Calciumdarstellung in Spinalganglienzellen eine signifikante Verringerung, aber bei weitem keine vollständige Inhibition des Suramin-induzierten Calciumeinstroms durch Nimodipin (siehe Abb. 12A). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen gaben Sun und Windebank an, dass sich der unter Suramin erhöhte intrazelluläre Calciumgehalt durch die Verwendung von Nimodipin wieder vollständig normalisieren würde. Diese Differenz lässt sich möglicherweise auf die unterschiedlichen Versuchsdurchführungen zurückführen. Sun und Windebank maßen den Calciumgehalt nach einer viertägigen Behandlung mit Suramin und Nimodipin, wohingegen wir die akuten Veränderungen des Calciumgehalts unter Einwirkung dieser beiden Substanzen detektierten ²⁶.

Von unseren Ergebnissen lässt sich ableiten, dass neben L-Typ VGCC weitere Suramin-aktivierte und für Calcium permeable Ionenkanäle in der Plasmamembran von Spinalganglienzellen existieren. Diese scheinen zur Calciumdyshomöostase und folglich zur Neurotoxizität unter Suramin beizutragen. Beobachtungen des Calciumprofils der Spinalganglienzellen nach Suraminzugabe unterstützten diese These. Es zeigte sich, dass einige Zellen mit einem frühzeitigen kurzen Calciumanstieg, weitere mit einem späteren tonischen und wieder andere mit einem Calciumanstieg der beiden Charakteristika entspricht, auf die Behandlung mit Suramin reagierten (siehe Abb. 9). Dies könnte auf das Vorkommen verschiedener Suramin-sensibler und Calciumleitender Ionenkanäle mit jeweils unterschiedlichen Eigenschaften hindeuten. Unsere weiteren Untersuchungen mittels MTT-*Assay* ergaben keine Hinweise auf die Beteiligung anderer VGCC im Rahmen der Suramin-induzierten neuronalen Schädigung. Auch Efonidipin und Ruthenium Rot verbesserten die durch Suramin eingeschränkte zelluläre Vitalität nicht. Zunächst scheint dies verwunderlich, da Efonidipin und Ruthenium Rot unter anderem auch L-Typ VGCC inhibieren. Dementsprechend würde man eine ähnlich protektive Wirkung wie unter Nimodipin erwarten. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der MTT-*Assays* (siehe Abb. 10B und Abb. 10C), lässt sich erkennen, dass sowohl Efonidipin als auch Ruthenium Rot in höheren Konzentrationen per se eine toxische Wirkung auf Spinalganglienzellen haben. Somit wird wahrscheinlich der, über die Inhibition von L-Typ VGCC vermittelte protektive Effekt dieser Substanzen durch die stoffeigene Toxizität wieder aufgehoben.

TRP-Kanäle

Bei der Untersuchung der vier Vertreter der TRP-Kanal Superfamilie zeigte sich, dass sich die Inhibition des TRPV4-Kanals durch HC067047 in den Konzentrationen von 10 nM und 100nM in geringem Maße protektiv auf die Suramin-behandelten Spinalganglienzellen auswirkt (siehe Abb. 11a). Verwunderlich war jedoch, dass es zu einer signifikanten Verminderung der Zellvitalität unter der Koinkubation von Spinalganglienzellen mit Suramin und 1nM HC067047 sowie unter der alleinigen Behandlung mit 100 nM HC067047 kam (siehe Abb. 11a und Abb. 11A). Dies ließ sich nicht auf eine Toxizität des Inhibitors HC067047 zurückführen, da dieser in höheren Konzentrationen keine Verminderung der neuronalen Vitalität bewirkte. Am ehesten basieren diese Ergebnisse auf Ungenauigkeiten des genutzten Messsystems, welche in 5.1 diskutiert wurden. Diese heterogene Ergebnislage schwächt die Aussagekraft der detektierten protektiven Wirkung von HC067047 auf die mit Suramin behandelten Neurone.

In nachfolgenden Messungen des Calciumgehalts in Spinalganglienzellen führte eine Inhibition des TRPV4-Kanals nicht zu einer Verminderung des Suramin-vermittelten Calciumeinstroms, sodass eine Interaktion von Suramin mit dem TRPV4-Kanal nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 12D). Aus den Untersuchungen der weiteren drei TRP-Kanäle ließ sich keine Bedeutung im Rahmen der Suramin-vermittelten Neurotoxizität ableiten.

Folglich konnten wir die Beteiligung von TRP-Kanälen durch unsere Untersuchungen nicht eindeutig nachweisen. Da jedoch nur ausgewählte TRP-Kanäle analysiert wurden und die Ergebnisse wie zuvor diskutiert eine gewisse Heterogenität aufwiesen, kann eine Bedeutung dieser Kanäle im Rahmen der Suramin-induzierten Neurotoxizität auch nicht ausgeschlossen werden.

5.2.2 Subpopulationen von Spinalganglienzellen und die unspezifische Wirkung des Suramins

Mit Blick auf die diskutierten Ergebnisse bleibt zu bedenken, dass diverse Subpopulationen von Spinalganglienzellen existieren. Usoskin et al. teilten zum Beispiel 622 murine Spinalganglienzellen anhand von Expressionsmarkern in elf verschiedene Subtypen ein. Anschließend untersuchten sie die Expressionsmuster verschiedener Rezeptoren und Ionenkanäle in diesen Subtypen. Auf diese Weise wurden den verschiedenen Subtypen unterschiedliche Modalitäten wie z.B. Mechano- oder Thermosensation zugewiesen, da der unterschiedliche Rezeptorenbesatz erst ermöglicht, dass Zellen auf verschiedene Reize reagieren ¹⁰⁹.

Wie in 2.4 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass sich auch die Expressionsmuster von VGCC und TRP-Kanälen von Spinalganglienzelle zu Spinalganglienzelle unterscheiden. Beachtet man die Heterogenität des Rezeptoren- und Ionenkanalbesatzes auf der einen und die zuvor diskutierte Interaktion von Suramin mit verschiedenen dieser Kanalproteine auf der anderen Seite, wird deutlich, dass die Reaktion einer einzelnen Spinalganglienzelle auf die Behandlung mit Suramin sehr unterschiedlich ausfallen kann. Exprimiert die Zelle eine Vielzahl von Suramin-aktivierten Ionenkanälen, kann es zu einem starken Calciumeinstrom und den entsprechenden Konsequenzen kommen. Im Gegensatz dazu würden Zellen, in deren Plasmamembran nur wenige bzw. gar keine, durch Suramin-aktivierten Kanäle lokalisiert sind, nur einen geringen bzw. keinen Calciumeinstrom aufweisen. Auch die Dynamik des Calciumeinstroms wird durch die Eigenschaften der exprimierten und durch Suramin-aktivierten Calciumkanäle bestimmt, sodass manche Spinalganglienzellen, wie in Abb. 9 dargestellt z.B. einen prompten kurzzeitigen und andere einen späten tonischen Calciumeinstrom aufweisen.

Da in den durchgeführten Experimenten die Gesamtpopulationen der Spinalganglienzellen untersucht wurden, könnten die dargestellten Aspekte die Variabilität und somit die hohen Standardabweichungen der im Calcium-*Imaging* gemessenen Calciumsignale erklären. Um eine möglichst hohe und schnelle Rezeptorsättigung zu gewährleisten und so die Reaktions-Variabilität gering zu halten, nutzten wir für die intrazellulären Calciummessungen höhere Suraminkonzentrationen, als im Rahmen der Zellvitalitätsmessungen (1mM im Vergleich zu 400µM).

Im Kontext der aufgeführten Überlegungen könnte es sein, dass die verwendeten Inhibitoren lediglich protektiv auf einzelne Subpopulationen der Spinalganglienzellen wirken. Somit werden möglicherweise in der Gesamtanalyse der Spinalganglienzellkultur nur geringe oder keine protektiven Effekte dargestellt, obwohl eine toxische Wirkung Suramins auf Subpopulationen der Spinalganglienzellen zu einem hohen Maße antagonisiert wird. Betrachtet man die heterogenen

Ergebnisse der Untersuchungen des TRPV4-Kanals in diesem Kontext, scheint eine Beteiligung im Rahmen der Suramin-vermittelten Neurotoxizität möglich. So könnte der entsprechende Inhibitor (HC067047) insbesondere auf eine Subpopulation von Spinalganglienzellen einen protektiven Effekt ausüben, die einen hohen Anteil an TRPV4-Kanälen und einen geringen Anteil anderer Suramin-aktivierter Ionenkanäle in der Plasmamembran aufweisen. Ebenso könnte dies den unvollständigen, protektiven Effekt Nimodipins auf die Gesamtpopulation der Spinalganglienzellen erklären.

Zur genaueren Detektion der jeweiligen Auswirkungen auf das zelluläre Überleben und den Calciumgehalt wären Untersuchungen an Subgruppen von Spinalganglienzellen sinnvoll.

Des Weiteren ist festzuhalten, dass Suramin im Zusammenhang mit der induzierten Calciumdyshomöostase unspezifische Bindungs- und Wirkmechanismen aufzuweisen scheint.

5.2.3 Spinalganglienzellen zwischen Calciumdyshomöostase und Zelltod

In 2.2 wurde der Zusammenhang zwischen der zellulären Calciumhomöostase und Zelltodmechanismen ausführlich beschrieben. Da wir die Suramin-induzierte Dysregulation des Calciumhaushalts in Spinalganglienzellen nachweisen konnten, war die Untersuchung der dadurch initiierten Signalkaskaden von besonderem Interesse. In Anlehnung an die Ausführungen von Böhmerle et al. ^{24,25} zu den Zusammenhängen zwischen der Calciumdyshomöostase unter Paclitaxel und Salinomycin betrachteten wir zunächst die Beteiligung von Calpain und Caspasen im Rahmen der Neurotoxizität unter Suramin. Interessanterweise übten weder die Calpain-Inhibitoren noch ein Inhibitor der Caspasen- 3 und -7 einen im MTT-*Assay* messbaren, protektiven Effekt auf Suramin-behandelte Spinalganglienzellen aus (siehe Abb. 13a und Abb. 13b). Im Gegensatz dazu beschrieben Sun und Windebank einen protektiven Effekt des Calpain-Inhibitors auf das Überleben und axonale Wachstum von Spinalganglienzellen. Hierbei ist anzumerken, dass Sun und Windebank mit der Quantifizierung des axonalen Wachstums andere Methoden zur Beurteilung der Neurotoxizität Suramins nutzten, als die von uns durchgeführten Messungen der metabolischen Aktivität ²⁶.

Unsere Ergebnisse des MTT-Assays legen nahe, dass Suramin Caspase- und Calpain-unabhängig zum neuronalen Zelltod führt. Allerdings ließ sich der Ablauf der zum Zelltod führenden, Suramin-induzierten und Calcium-vermittelten Signalkaskade auf diese Weise nicht genauer aufklären.

In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, dass eine inhibitorische Wirkung Suramins auf Caspasen beschrieben wurde. Eichhorst et al. konnten zeigen, dass Suramin die Initiator- Caspasen 8, 9 und 10 in der T-Zell-Lymphom-Zellinie *Jurkat* hemmt und so antiapoptotisch auf diesen Zelltyp wirkt. Demhingegen induzierte Suramin in der Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP apoptotische Vorgänge entsprechend der in 2.3.2 dargestellten Verwendung Suramins im Rahmen des Prostatakarzinoms. Folglich scheint die Wirkung Suramins auf apoptotische Vorgänge vom Zelltyp abhängig zu sein (¹¹⁰).

Den Beschreibungen der antiapoptotischen Effekte Suramins folgend, könnte es möglich sein, dass Suramin in Spinalganglienzellen gleichzeitig antiapoptotisch über eine Caspase-Inhibition und proapoptotisch über eine Dysregulation der Calciumhomöostase wirkt. Dies verdeutlicht die Komplexität der Suramin-vermittelten zellulären Effekte.

Der von uns durchgeführte Caspase-*Assay* sollte die Beteiligung der Caspase-Kaskade in durch Suramin geschädigten Spinalganglienzellen klären. Allerdings zeigten sich Interaktionen im experimentellen Ablauf, welche in 5.3.1 diskutiert werden. Nach einer 24 stündigen Behandlung von Spinalganglienzellen wurden dennoch erhöhte Messwerte detektiert, die unter Vorbehalt auf eine durch Suramin erhöhte Caspaseaktivität hinweisen. Auch immunhistochemische Verfahren zur Detektion möglicher Zelltodkaskaden unter Suramin, wie die Färbung von Annexin V oder des Apoptose-induzierenden-Faktors konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden, da Suramin mit der Zellkulturbeschichtung interagierte (diskutiert in 5.3.2).

Letztendlich konnte durch die, in 5.2.1 diskutierte, protektive Wirkung Nimodipins auf mit Suramin behandelte Spinalganglienzellen ein Zusammenhang zwischen Calciumdyshomöostase und neuronalem Zelltod hergestellt werden. Ein weiteres Indiz für die Initiierung von Zelltodmechanismen ergibt sich aus der Beobachtung, dass Suramin bei 71,8% (Gruppen 2 und 3 in Abb. 9B) der Spinalganglienzellen zu einem anhaltenden Anstieg des intrazellulären Calciumgehalts führte. Dies weist auf eine ausgedehnte Calciumdyshomöostase hin. Norberg et al. beschrieben zum Beispiel, dass insbesondere langandauernde und nicht kurzzeitige Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration, in einer *Non-small-cellular-lung-cancer*-Zellinie, zur Apoptose-Induktion führten²¹.

Insgesamt ist eine Beteiligung von Caspasen im Rahmen der Suramin-induzierten Neurotoxizität wahrscheinlich. Ein Zusammenhang mit der gestörten Calciumhomöostase konnte jedoch ebenso wenig dargestellt werden, wie der genaue Ablauf der Signalkaskade.

5.3 Experimentelle Interaktionen des Suramins

Wie zuvor angedeutet, führte die Verwendung Suramins zu Interaktionen im Rahmen von verschiedenen Versuchsdurchführungen.

5.3.1 Interaktion des Suramins mit Fluoreszenz- und Lumineszenz-Assays

Für die Evaluation der Suramin-vermittelten Toxizität sollten ursprünglich der MTT-Assay und der auf Fluoreszenz basierende *Cytotox-Assay* kombiniert werden (siehe 3.4 und 4.1). Bei der Durchführung des *Cytotox-Assays* fiel jedoch auf, dass höhere Suraminkonzentrationen zu erniedrigten Fluoreszenz-Signalen führten (siehe Abb. 5). Dies würde bedeuten, dass die Behandlung von Spinalganglienzellen mit Suramin zu einer Verminderung von toten Zellen führen würde. Diese Schlussfolgerung war weder mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen der Zellmorphologie noch mit den Ergebnissen des MTT-*Assays* vereinbar (siehe Abb. 4 und Abb. 6). In Verbindung mit der stetigen Abnahme des Fluoreszenzsignals bei zunehmenden Suramin-Konzentrationen deutete dies auf eine Interaktion zwischen Suramin und dem Versuchsablauf hin. Ein ähnliches Phänomen zeigte sich im Rahmen des Lumineszenz-basierten Caspase-*Assays*. Zu Beginn der Messung der Caspase-Aktivität zeigte sich ein, im Vergleich zu den Kontrollen, erniedrigtes Signal der Suramin-behandelten Spinalganglienzellkulturen (Abb. 14A). Als ursächliche Mechanismen für die Signalabschwächung zogen wir drei verschiedene Möglichkeiten in Betracht:

- Suramin hemmt die Enzyme, deren Aktivität gemessen werden soll direkt und führt so zu einer verminderten Produktion des fluoreszierenden bzw. lumineszierenden Spaltprodukts. Im Falle des Lumineszenz-Assays wären dies die Caspasen 3 und 7. Dies wäre aufgrund der oben diskutierten Beschreibung einer Suramin-vermittelten Caspase 8-, 9- und 10-Inhibition generell denkbar.
- 2. Suramin absorbiert die vom Fluorophor/Luminophor emittierte Lichtenergie und führt so dazu, dass es zu einer verminderten Detektion des Lichtsignals kommt.
- Suramin interagiert direkt mit dem fluoreszierenden bzw. lumineszierenden Molekül, sodass dieses nicht angeregt werden kann bzw. die entsprechende chemische Reaktion unter Emission eines Lichtphotons nicht ablaufen kann.

In einem Folgeexperiment des Lumineszenz-basierten Caspase-*Assays* konnten wir zeigen, dass das Zusetzen Suramins, nach abgelaufener enzymatischer Produktumsetzung zu einer signifikanten Abschwächung des Lumineszenzsignals führt (Abb. 14B). Im Gegensatz dazu führte eine primäre Inkubation von Spinalganglienzellen mit Suramin nach 24h zu einer signifikanten Erhöhung des Lumineszenzsignals (Abb. 14A und Abb. 14B). Daraus lässt sich ableiten, dass Suramin eine Caspase-3/7-Induktion und keine Inhibition in Spinalganglienzellen bewirkt. Gleichzeitig schwächt Suramin jedoch das resultierende Lichtsignal aufgrund der oben dargestellten Hypothesen zwei oder drei ab.

Interessanterweise zeigt das Absorptionsspektrum Suramins lediglich Maxima bei 238 nm und 315 nm. Auch im *Tristar LB941 Multimode Microplate Reader* konnte im direkten Vergleich zur Kontrolle (Aq.dest.) keine stärkere Absorption einer Suraminlösung im Wellenlängenbereich von 485-550 nm detektiert werden (Abb. 15). In diesem Wellenlängenbereich findet die Lichtemission bei den genutzten Fluoreszenz- und Lumineszenz-*Assays* statt. Auch die Fluoreszenzspektren Suramins zeigen keine relevanten Signale in diesem Bereich (Abb. 16). Folglich erscheint eine Interaktion Suramins mit dem emittierten Lichtsignal nicht wahrscheinlich. Insofern könnte Suramin direkt über eine chemische Reaktion mit den jeweiligen Luminophoren interagieren und so die Photonenabgabe inhibieren.

Insgesamt vermindert die beschriebene Interaktion die Aussagekraft des Assays, was Folgeexperimente mit den zuvor im MTT-Assay untersuchten Inhibitoren nicht als sinnvoll erscheinen ließ.

Auch im Rahmen des Calcium-Imagings spielt die Fluoreszenzmessung, wie in 3.6 erläutert, eine wichtige Rolle. Aufgrund des in Abb. 16 dargestellten Fluoreszenzspektrums Suramins erschien eine Interaktion mit den Calciummessungen bei einer Wellenlänge von 340 nm möglich. Außerdem wäre natürlich auch in diesem experimentellen Ablauf eine direkte Interaktion Suramins mit dem genutzten Fluorophor (hier *Fura-2*) denkbar. Wir haben eine gewisse Signalveränderung im genutzten Messaufbau unter Suraminzugabe gemessen. Die genauen Auswirkungen im experimentellen Ablauf konnten jedoch nicht quantifiziert werden, da keine *Ratio* von Lichtsignalen bestimmt und unter Abwesenheit von *Fura-2* gemessen wurde, um einen Suramin-spezifischen Effekt erkennen zu können. Folglich ließ sich auch keine Aussage über eine potentielle direkte Interaktion Suramins mit *Fura-2* treffen. Der minimale Intensitätsanstieg des Lichtsignals nach Suraminzugabe bei Anregung mit einer Wellenlänge von 340 nm deutete aber darauf hin, dass Suramin die dargestellten Calciummessungen nicht maßgeblich beeinflusst (Abb. 17).

5.3.2 Suramin-Interaktion mit der Zellkulturbeschichtung

Zur genaueren Untersuchung der apoptotischen Vorgänge in mit Suramin behandelten Spinalganglienzellen sollten, wie zuvor erwähnt, Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt werden. Jedoch führten die zahlreichen Waschschritte dazu, dass sich der Suramin-behandelte Zellrasen ablöste, was folglich keine Zellfärbungen zuließ. Zellkulturen, die als Kontrollen dienten und lediglich mit dem Lösungsmittel behandelt wurden, zeigten hingegen keine verstärkte Tendenz sich abzulösen. Die Zellkulturgefäße wurden, wie in 3.2.1 beschrieben, anhand eines etablierten Protokolls mit PLL und Laminin beschichtet.

Es ist bekannt, dass neuronale Zellen im Allgemeinen schlechte Adhäsionseigenschaften besitzen. Eine Beschichtung mit extrazellulären Matrixproteinen ermöglicht jedoch ein besseres Anhaften der Zellen und fördert das axonale Wachstum (dargestellt in ¹¹¹).

Die Beobachtung des sich ablösenden Zellrasens unter Suramin-Inkubation deutete auf eine Interaktion von Suramin mit der Beschichtung hin. Interessanterweise beschrieben Prigozhina et al. in ihrem Versuchsablauf ebenfalls eine Interaktion zwischen Suramin und Laminin. Suramin führte dabei zur Auflösung von Matrigel, welches zur Herstellung von dreidimensionalen Zellverbänden genutzt wird. Matrigel besteht zu 61 % aus Laminin. Von ihren Folgeexperimenten leiteten Prigozhina et al. ab, dass insbesondere die negativ geladenen Sulfatgruppen Suramins für die Interaktion verantwortlich sind und die Bindungen von Laminin auflösen ¹¹².

In diesem Kontext ist ebenfalls zu beachten, dass Suramin in der Literatur als Analogon von Heparan-Sulfaten beschrieben wird und so u.a. die Enzyme Heparanase und Iduronat-Sulfatase hemmt ^{113,114}. Diese sind am Abbau von Heparan-Sulfaten beteiligt (dargestellt in ^{113,115}). Heparan-Sulfate sind Bestandeile der Zell-Glykokalix, aber auch der extrazellulären Matrix. Sie können an die extrazellulären Matrixproteine Laminin und Kollagen binden ^{116,117}. Diesbezüglich beschrieben Zabrenetzky et al., dass Suramin die Bindung zwischen sulfatierten Glykokonjugaten (hierzu gehören Heparan-Sulfate) auf Melanomzellen und Lamininmolekülen der Extrazellulärmatrix inhibiert ¹¹⁸. Diese Wirkung wurde ebenso wie die Hemmung der Heparanase mit der Antitumoraktivität Suramins in Verbindung gebracht. Es wurde geschlussfolgert, dass Suramin hierdurch die Migration von Tumorzellen unterbindet und nachfolgend eine Metastasierung hemmt ¹¹⁴.

Unter Betrachtung der dargestellten Ergebnisse von Prigozhina et al., dass Suramin mit Laminin interagiert und der Analogie Suramins zu Heparan-Sulfaten, ist eine Interaktion mit der Zellkulturbeschichtung wahrscheinlich. Scheinbar bindet Suramin, wie Heparan-Sulfate über seine Sulfatgruppen an Laminin. Suramin würde also Heparan-Sulfat-Bindungsstellen der Lamininmoleküle besetzen. Folglich könnten Heparan-Sulfate als Bestandteile der Zell-Glykokalix nicht mehr an diese Stellen binden und so keine Zelladhäsion vermitteln. Außerdem könnten auch die Lamininbindungen und so die Struktur der Zellkulturbeschichtung in sich gestört werden. Insgesamt wäre das entsprechende Korrelat die mangelnde Adhäsion der Spinalganglienzellkultur.

Als alternative Beschichtung von Zellkulturoberflächen im Zusammenhang mit der Kultivierung von Spinalganglienzellen kann Kollagen verwendet werden. Dies soll sogar den Vorteil einer stärkeren Adhäsionskraft bieten. Dennoch kam es auch nach einer Beschichtung mit PLL und Kollagen zu einem Abschwimmen des Spinalganglien-Zellrasens. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen leiteten Prigozhina et al. von ihren Versuchen keine Interaktion von Suramin mit Kollagen ab. Allerdings ist zu beachten, dass Kollagen, wie zuvor beschrieben, ebenfalls mit Heparan-Sulfaten interagieren kann. Folglich könnte Suramin die Adhäsion der Spinalganglienzellen an eine kollagene extrazelluläre Matrix auf ähnliche Weise stören, wie dies im Zusammenhang von Laminin diskutiert wurde (s.o.).

Des Weiteren ist zu beachten, dass die beschriebene gestörte Zelladhäsion unter Suramin auch für die Messung der Zellvitalität der mit Suramin behandelten Spinalganglienzellen bedeutsam ist. Denn ein gutes Anhaften von neuronalen Zellkulturen ist für die zelluläre Vitalität relevant ¹¹¹. Somit könnte eine verminderte zelluläre Vitalität unter Suramin auch zum Teil auf eine gestörte Zelladhäsion zurückzuführen sein. Um diesen Einflussfaktor zu minimieren, erfolgten, wie in 3.3.2 beschrieben, mikroskopische Kontrollen der Spinalganglienzellkulturen vor allen Zellvitalitätsmessungen. Außerdem zeigen die in 5.2.1.2 diskutierten Ergebnisse unter dem Einfluss von Nimodipin, dass weitere Ursachen der Suramin vermittelten Toxizität in diesem Modell detektierbar sind.

5.4 Allgemeine Limitationen

Im Rahmen dieser experimentellen Laborarbeit wurden primäre Spinalganglienzellkulturen generiert. Das Protokoll zur Gewinnung dieser Zellen ist im Verhältnis zum Ertrag sehr aufwändig. Dies limitierte die Anzahl "N" an Wiederholungen der Einzelexperimente. Dadurch erhöhte sich die Anfälligkeit der Ergebnisse für Fehler im Versuchsablauf. Zu diesen möglichen Fehlern zählen u.a. Pipettierfehler, eine unterschiedliche Zelldichte der Zellkulturen in verschiedenen *Wells*, die Kontamination der Zellkulturen durch nicht neuronale Zellen sowie Konzentrationsschwankungen der eingewogenen Substanzen. Durch das Vorgehen nach einem standardisierten und etablierten Protokoll sollte die Fehlerzahl geringgehalten werden. Außerdem erfolgte z.B. die Aussaht der Zellen meanderförmig um mögliche Schwankungen der Zellzahl pro Milliliter gleichmäßig auf die *Wells* zu verteilen.

Limitationen bezüglich der Zellkultur, der genutzten *Assays* oder des Calcium-*Imagings* wurden schon zuvor diskutiert.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Calciumhomöostase für die Suramininduzierte Neuropathie im Zellkulturmodell untersucht. Hierbei konnten wir den Nachweis eines durch Suramin gestörten Calciumhaushalts erbringen. In Rückbezug auf die eingangs besprochenen Substanzen Salinomycin und Paclitaxel verdeutlicht dies die Rolle von Calcium als möglichem Vermittler der CIPN. Interessant ist hierbei, dass alle drei dargestellten Substanzen über unterschiedliche Mechanismen zu einer Dysregulation der Calciumhomöostase führen. Wir konnten zeigen, dass Suramin einen Einstrom von extrazellulärem Calcium bewirkt. Insbesondere den L-Typ VGCC konnten wir als Mediator des Calciumeinstroms identifizieren. Da jedoch deutlich wurde, dass Suramin wahrscheinlich unspezifisch an verschiedenen membranständigen Kanälen ansetzt, wären diesbezüglich differentielle Untersuchungen der Calciumströme an Subpopulationen von Spinalganglienzellen hilfreich.

Insgesamt fügen sich diese Ergebnisse in das Bild der diversen Wirkmechanismen Suramins ein, die während der 100 Jahre seit der Entdeckung dieser Substanz beschrieben wurden (siehe 2.3). Ob Paul de Kruif diese besonderen und vielfältigen Eigenschaften im Jahr 1926 schon erahnte, als er sagte: *"It [Suramin] does outlandish things to the cells and fluids of the human body…*"(engl.: *"Es [Suramin] hat sonderbare Auswirkungen auf die Zellen und Flüssigkeiten des menschlichen Körpers…*")¹¹⁹. Aus heutiger Sicht ist dies eine treffende Beschreibung, da Suramin offensichtlich unspezifische Bindungseigenschaften besitzt und so pleiotrope Effekte auf verschiedenste Zielstrukturen ausübt.

In diesen Kontext lässt sich auch das Auftreten der dargestellten Interaktionen Suramins während der experimentellen Abläufe einordnen. Die von uns detektierten Auswirkungen Suramins auf die Durchführungen von Lumineszenz- und Fluoreszenz-*Assays* sowie die Beeinträchtigung von Zellkulturbeschichtungen ist von besonderer Relevanz für die weitere experimentelle Verwendung dieser Substanz. Im Rahmen von Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Messungen in Suramin-haltigen Medien könnte es zu veränderten Messergebnissen kommen, die zu Fehlinterpretationen führen würden. So wäre es z.B. möglich, dass eine Signalabschwächung in entsprechenden *Assays* fälschlicherweise auf eine verminderte Enzymaktivität zurückgeführt würde. Des Weiteren sollte der Einfluss von Suramin auf Zellkulturbeschichtungen beachtet werden. Dies ist, wie zuvor diskutiert, insbesondere im Rahmen von neuronalen Zellen relevant, da die Adhäsion sowohl die Vitalität dieser Zellen als auch das axonale Wachstum beeinflusst. Insgesamt lässt sich das beobachtete Phänomen wahrscheinlich auf die Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen wie Laminin zurückführen, sodass diese Wirkweise auch *in-vivo* bedeutsam ist. Eine tiefergehende

Untersuchung der beobachteten Interaktionsmechanismen Suramins wäre für den weiteren experimentellen Umgang von großem Interesse.

Insbesondere für die Untersuchung der durch Suramin initiierten und über Calcium als *second-messenger* vermittelten Zelltodkaskade wäre dies relevant. Denn aufgrund der dargestellten Beeinflussungen der Versuchsabläufe konnte die Signalkaskade nicht genau analysiert werden. Eine Aktivierung von Caspasen ist jedoch aufgrund der Messergebnisse wahrscheinlich. Die Anwendung anderer Methoden wie *Western-Blot* oder Durchflusszytometrie zur Darstellung der entsprechenden zellulären Abläufe war aufgrund der limitierten Ausbeute der, durch Präparation gewonnenen, primären Spinalganglienzellen nicht möglich. Nichtsdestotrotz ist die Aufklärung der Calcium-vermittelten Signalkaskade im Rahmen der Suramin-induzierten Neuropathie von besonderer Bedeutung, um die pathophysiologischen Abläufe und damit mögliche Therapiestrategien zu beleuchten.

Insgesamt lässt sich jedoch festhalten, dass ein verstärkter klinischer Einsatz Suramins insbesondere im Rahmen von malignen Erkrankungen nicht absehbar ist. Denn die zuvor diskutierten unspezifischen Wirkungen Suramins bedingen die in 2.3.2 dargestellten, vielfältigen Nebenwirkungen. Dies führt zu einer äußerst komplexen Handhabung dieser Substanz sowohl im klinischen als auch im experimentellen Einsatz.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Windebank AJ, Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. Journal of the peripheral nervous system : JPNS 2008;13:27-46.
- 2. Miltenburg NC, Boogerd W. Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. Cancer treatment reviews 2014;40:872-82.
- 3. Boehmerle W, Huehnchen P, Endres M. Chemotherapy-induced neuropathy. Nervenarzt 2015;86:156-60.
- 4. Postma TJ, Reijneveld JC, Heimans JJ. Prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a matter of personalized treatment? Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 2013;24:1424-6.
- 5. Diouf B, Crews KR, Lew G, Pei D, Cheng C, Bao J, Zheng JJ, Yang W, Fan Y, Wheeler HE, Wing C, Delaney SM, Komatsu M, Paugh SW, McCorkle JR, Lu X, Winick NJ, Carroll WL, Loh ML, Hunger SP, Devidas M, Pui CH, Dolan ME, Relling MV, Evans WE. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. Jama 2015;313:815-23.
- 6. Argyriou AA, Kyritsis AP, Makatsoris T, Kalofonos HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature. Cancer management and research 2014;6:135-47.
- 7. Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Journal of neurology 2002;249:9-17.
- 8. Seretny M, Currie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, Colvin LA, Fallon M. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. Pain 2014;155:2461-70.
- 9. Geber C, Boehmerle W, Lehmann HC, Hagenacker T. Assessment and Therapy of Chemotherapy-Induced Polyneuropathy: Update 2016. Aktuelle Neurol 2016;43:171-8.
- 10. Smith EM, Pang H, Cirrincione C, Fleishman S, Paskett ED, Ahles T, Bressler LR, Fadul CE, Knox C, Le-Lindqwister N, Gilman PB, Shapiro CL. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. Jama 2013;309:1359-67.
- 11. Durand JP, Deplanque G, Montheil V, Gornet JM, Scotte F, Mir O, Cessot A, Coriat R, Raymond E, Mitry E, Herait P, Yataghene Y, Goldwasser F. Efficacy of venlafaxine for the prevention and relief of oxaliplatin-induced acute neurotoxicity: results of EFFOX, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 2012;23:200-5.
- 12. Zimmerman C, Atherton PJ, Pachman D, Seisler D, Wagner-Johnston N, Dakhil S, Lafky JM, Qin R, Grothey A, Loprinzi CL. MC11C4: a pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study of venlafaxine to prevent oxaliplatin-induced neuropathy. Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer 2016;24:1071-8.
- Windebank AJ. Chemotherapeutic neuropathy. Current opinion in neurology 1999;12:565-71.
- 14. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. Nature 1998;395:645-8.

- 15. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nature reviews Molecular cell biology 2003;4:552-65.
- 16. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nature reviews Molecular cell biology 2008;9:231-41.
- 17. Demaurex N, Distelhorst C. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. Science (New York, NY) 2003;300:65-7.
- 18. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell death and differentiation 2004;11:372-80.
- 19. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. The Journal of cell biology 2000;150:887-94.
- 20. Croall DE, Demartino GN. CALCIUM-ACTIVATED NEUTRAL PROTEASE (CALPAIN) SYSTEM STRUCTURE, FUNCTION, AND REGULATION. Physiol Rev 1991;71:813-47.
- 21. Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlen P, Orrenius S, Zhivotovsky B. An increase in intracellular Ca2+ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. Cell death and differentiation 2008;15:1857-64.
- 22. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosisinducing factor. Nature 1999;397:441-6.
- 23. Boehmerle W, Splittgerber U, Lazarus MB, McKenzie KM, Johnston DG, Austin DJ, Ehrlich BE. 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;103:18356-61.
- 24. 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;104:11103-8.
- 25. Boehmerle W, Endres M. Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death. Cell Death Dis 2011;2:e168.
- 26. Sun X, Windebank AJ. Calcium in suramin-induced rat sensory neuron toxicity in vitro. Brain research 1996;742:149-56.
- 27. McGeary RP, Bennett AJ, Tran QB, Cosgrove KL, Ross BP. Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. Mini reviews in medicinal chemistry 2008;8:1384-94.
- 28. Headrick DR. Sleeping Sickness Epidemics and Colonial Responses in East and Central Africa, 1900–1940. PLoS Neglected Tropical Diseases 2014;8:e2772.
- 29. Voogd TE, Vansterkenburg EL, Wilting J, Janssen LH. Recent research on the biological activity of suramin. Pharmacological reviews 1993;45:177-203.
- 30. De Clercq E. Suramin: a potent inhibitor of the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. Cancer letters 1979;8:9-22.
- 31. Mitsuya H, Popovic M, Yarchoan R, Matsushita S, Gallo RC, Broder S. Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. Science (New York, NY) 1984;226:172-4.

- 32. Collins JM, Klecker RW, Jr., Yarchoan R, Lane HC, Fauci AS, Redfield RR, Broder S, Myers CE. Clinical pharmacokinetics of suramin in patients with HTLV-III/LAV infection. Journal of clinical pharmacology 1986;26:22-6.
- 33. Cheson BD, Levine AM, Mildvan D, Kaplan LD, Wolfe P, Rios A, Groopman JE, Gill P, Volberding PA, Poiesz BJ. Suramin therapy in AIDS and related disorders. Report of the US Suramin Working Group. Jama 1987;258:1347-51.
- 34. Kim JH, Sherwood ER, Sutkowski DM, Lee C, Kozlowski JM. Inhibition of prostatic tumor cell proliferation by suramin: alterations in TGF alpha-mediated autocrine growth regulation and cell cycle distribution. The Journal of urology 1991;146:171-6.
- 35. Vignon F, Prebois C, Rochefort H. Inhibition of breast cancer growth by suramin. Journal of the National Cancer Institute 1992;84:38-42.
- 36. La Rocca RV, Stein CA, Danesi R, Jamis-Dow CA, Weiss GH, Myers CE. Suramin in adrenal cancer: modulation of steroid hormone production, cytotoxicity in vitro, and clinical antitumor effect. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1990;71:497-504.
- 37. Spigelman Z, Dowers A, Kennedy S, DiSorbo D, O'Brien M, Barr R, McCaffrey R. Antiproliferative effects of suramin on lymphoid cells. Cancer research 1987;47:4694-8.
- 38. Stein CA, LaRocca RV, Thomas R, McAtee N, Myers CE. Suramin: an anticancer drug with a unique mechanism of action. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 1989;7:499-508.
- 39. Eisenberger MA, Reyno LM, Jodrell DI, Sinibaldi VJ, Tkaczuk KH, Sridhara R, Zuhowski EG, Lowitt MH, Jacobs SC, Egorin MJ. Suramin, an active drug for prostate cancer: interim observations in a phase I trial. Journal of the National Cancer Institute 1993;85:611-21.
- 40. Arlt W, Reincke M, Siekmann L, Winkelmann W, Allolio B. Suramin in adrenocortical cancer: limited efficacy and serious toxicity. Clinical endocrinology 1994;41:299-307.
- 41. Woll PJ, Ranson M, Margison J, Thomson Y, van der Water L, George N, Howell A. Suramin for breast and prostate cancer: a pilot study of intermittent short infusions without adaptive control. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 1994;5:597-600.
- 42. Small EJ, Meyer M, Marshall ME, Reyno LM, Meyers FJ, Natale RB, Lenehan PF, Chen L, Slichenmyer WJ, Eisenberger M. Suramin therapy for patients with symptomatic hormone-refractory prostate cancer: results of a randomized phase III trial comparing suramin plus hydrocortisone to placebo plus hydrocortisone. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2000;18:1440-50.
- 43. Dawson NA, Figg WD, Cooper MR, Sartor O, Bergan RC, Senderowicz AM, Steinberg SM, Tompkins A, Weinberger B, Sausville EA, Reed E, Myers CE. Phase II trial of suramin, leuprolide, and flutamide in previously untreated metastatic prostate cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 1997;15:1470-7.
- 44. Chaudhry V, Eisenberger MA, Sinibaldi VJ, Sheikh K, Griffin JW, Cornblath DR. A prospective study of suramin-induced peripheral neuropathy. Brain : a journal of neurology 1996;119 (Pt 6):2039-52.
- 45. Peltier AC, Russell JW. Recent advances in drug-induced neuropathies. Current opinion in neurology 2002;15:633-8.
- 46. La Rocca RV, Meer J, Gilliatt RW, Stein CA, Cassidy J, Myers CE, Dalakas MC. Suramininduced polyneuropathy. Neurology 1990;40:954-60.
- 47. Bitton RJ, Figg WD, Venzon DJ, Dalakas MC, Bowden C, Headlee D, Reed E, Myers CE, Cooper MR. Pharmacologic variables associated with the development of neurologic toxicity in patients treated with suramin. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 1995;13:2223-9.
- 48. Russell JW, Gill JS, Sorenson EJ, Schultz DA, Windebank AJ. Suramin-induced neuropathy in an animal model. Journal of the neurological sciences 2001;192:71-80.
- 49. Pesenti E, Sola F, Mongelli N, Grandi M, Spreafico F. Suramin prevents neovascularisation and tumour growth through blocking of basic fibroblast growth factor activity. British journal of cancer 1992;66:367-72.
- 50. Gagliardi A, Hadd H, Collins DC. Inhibition of angiogenesis by suramin. Cancer research 1992;52:5073-5.
- 51. Babokhov P, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF, Iriemenam NC. A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. Pathog Glob Health 2013;107:242-52.
- 52. Gill JS, Hobday KL, Windebank AJ. Mechanism of suramin toxicity in stable myelinating dorsal root ganglion cultures. Experimental neurology 1995;133:113-24.
- 53. Russell JW, Windebank AJ, Podratz JL. Role of nerve growth factor in suramin neurotoxicity studied in vitro. Annals of neurology 1994;36:221-8.
- 54. Gill JS, Connolly DC, McManus MJ, Maihle NJ, Windebank AJ. Suramin induces phosphorylation of the high-affinity nerve growth factor receptor in PC12 cells and dorsal root ganglion neurons. Journal of neurochemistry 1996;66:963-72.
- 55. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nature reviews Molecular cell biology 2003;4:517-29.
- 56. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacological reviews 2005;57:411-25.
- 57. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. Neuron 2000;25:533-5.
- 58. Yusaf SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K. Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience letters 2001;311:137-41.
- 59. Scroggs RS, Fox AP. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. The Journal of physiology 1992;445:639-58.
- 60. Acosta CG, Lopez HS. delta opioid receptor modulation of several voltage-dependent Ca(2+) currents in rat sensory neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 1999;19:8337-48.
- 61. Fang Z, Hwang JH, Kim JS, Jung SJ, Oh SB. R-type Calcium Channel Isoform in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology 2010;14:45-9.

- 62. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. Nature 1969;224:285-7.
- 63. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron 1989;2:1313-23.
- 64. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:9652-6.
- 65. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. Science's STKE : signal transduction knowledge environment 2005;2005:re3.
- 66. Gees M, Colsoul B, Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca2+ signaling. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2010;2:a003962.
- 67. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. Annual review of biochemistry 2007;76:387-417.
- 68. Jordt SE, McKemy DD, Julius D. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. Current opinion in neurobiology 2003;13:487-92.
- 69. Vandewauw I, Owsianik G, Voets T. Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. BMC neuroscience 2013;14:21.
- 70. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
- 71. Technical Bulletin CytoTox-Fluor[™] Cytotoxicity Assay. Promega Corporation, 2012. (Accessed 16.05.2017, 2017, at <u>https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/cytotox-fluor-cytotoxicity-assay-protocol.pdf</u>.)
- 72. Technical Bulletin Caspase-Glo® 3/7 Assay. Promega Corporation, 2015. (Accessed 30.05.2017, 2017, at <u>https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf</u>.)
- 73. Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE. Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. Journal of visualized experiments : JoVE 2009.
- 74. Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons. Neuron 2012;73:862-85.
- 75. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. The Journal of biological chemistry 1985;260:3440-50.
- 76. Towart R, Kazda S. The cellular mechanism of action of nimodipine (BAY e 9736), a new calcium antagonist [proceedings]. British journal of pharmacology 1979;67:409p-10p.
- 77. Masumiya H, Shijuku T, Tanaka H, Shigenobu K. Inhibition of myocardial L- and T-type Ca2+ currents by efonidipine: possible mechanism for its chronotropic effect. European journal of pharmacology 1998;349:351-7.
- Amann R, Maggi CA. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. Life sciences 1991;49:849-56.
- 79. Cibulsky SM, Sather WA. Block by ruthenium red of cloned neuronal voltage-gated calcium channels. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 1999;289:1447-53.

- 80. Moore CL. Specific inhibition of mitochondrial Ca++ transport by ruthenium red. Biochemical and biophysical research communications 1971;42:298-305.
- 81. Xu L, Tripathy A, Pasek DA, Meissner G. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca(2+) release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. The Journal of biological chemistry 1999;274:32680-91.
- 82. Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula Hysterocrates gigas. Biochemistry 1998;37:15353-62.
- 83. Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich G, Azimi-Zoonooz A, McIntosh JM, Cruz LJ. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca2+ channels. Neuron 1992;9:69-77.
- 84. McDonough SI, Swartz KJ, Mintz IM, Boland LM, Bean BP. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by omega-conotoxin MVIIC. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 1996;16:2612-23.
- 85. Everaerts W, Zhen X, Ghosh D, Vriens J, Gevaert T, Gilbert JP, Hayward NJ, McNamara CR, Xue F, Moran MM, Strassmaier T, Uykal E, Owsianik G, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Fanger CM, Voets T. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:19084-9.
- 86. McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, Didomenico S, Kort ME, Kym PR. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. Molecular pain 2010;6:14.
- 87. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:5400-5.
- 88. Straub I, Mohr F, Stab J, Konrad M, Philipp SE, Oberwinkler J, Schaefer M. Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3. British journal of pharmacology 2013;168:1835-50.
- 89. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 1995;376:37-43.
- 90. Mehdi S. Cell-penetrating inhibitors of calpain. Trends Biochem Sci 1991;16:150-3.
- 91. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. Molecular & cellular proteomics : MCP 2009;8:443-50.
- 92. Melli G, Hoke A. Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. Expert opinion on drug discovery 2009;4:1035-45.
- 93. Baccaglini PI, Hogan PG. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1983;80:594-8.
- 94. Cesare P, McNaughton P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:15435-9.

- 95. Kress M, Reeh PW. More sensory competence for nociceptive neurons in culture. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:14995-7.
- 96. Gatchel RJ, Peng YB, Peters ML, Fuchs PN, Turk DC. The biopsychosocial approach to chronic pain: scientific advances and future directions. Psychological bulletin 2007;133:581-624.
- 97. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, Bejcek B, Chung TDY, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Hass JV, Inglese J, Iversen PW, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Trask OJ, Jr., Weidner JR, Xia M, Xu X, eds. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- 98. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth regulation 1995;5:69-84.
- 99. Jabbar SA, Twentyman PR, Watson JV. The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. British journal of cancer 1989;60:523-8.
- 100. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. Cancer research 1991;51:2515-20.
- 101. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC research notes 2015;8:47.
- 102. Calcaterra NB, Vicario LR, Roveri OA. Inhibition by suramin of mitochondrial ATP synthesis. Biochemical pharmacology 1988;37:2521-7.
- 103. Dunn PM, Blakeley AG. Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. British journal of pharmacology 1988;93:243-5.
- 104. Light AR, Wu Y, Hughen RW, Guthrie PB. Purinergic receptors activating rapid intracellular Ca increases in microglia. Neuron glia biology 2006;2:125-38.
- 105. Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, Parada CA, Reichling DB, Levine JD. 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;24:4444-52.
- 106. Nassini R, Gees M, Harrison S, De Siena G, Materazzi S, Moretto N, Failli P, Preti D, Marchetti N, Cavazzini A, Mancini F, Pedretti P, Nilius B, Patacchini R, Geppetti P. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. Pain 2011;152:1621-31.
- 107. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. Neuron 2011;70:482-94.
- 108. Elg S, Marmigere F, Mattsson JP, Ernfors P. Cellular subtype distribution and developmental regulation of TRPC channel members in the mouse dorsal root ganglion. The Journal of comparative neurology 2007;503:35-46.
- 109. Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lonnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggstrom J, Kharchenko O, Kharchenko PV, Linnarsson S, Ernfors P. Unbiased

classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. Nature neuroscience 2015;18:145-53.

- 110. Eichhorst ST, Krueger A, Muerkoster S, Fas SC, Golks A, Gruetzner U, Schubert L, Opelz C, Bilzer M, Gerbes AL, Krammer PH. Suramin inhibits death receptor-induced apoptosis in vitro and fulminant apoptotic liver damage in mice. Nature medicine 2004;10:602-9.
- 111. He Y, Baas PW. Growing and working with peripheral neurons. Methods in cell biology 2003;71:17-35.
- 112. Prigozhina NL, Heisel AJ, Seldeen JR, Cosford ND, Price JH. Amphiphilic suramin dissolves Matrigel, causing an 'inhibition' artefact within in vitro angiogenesis assays. International journal of experimental pathology 2013;94:412-7.
- 113. Constantopoulos G, Rees S, Cragg BG, Barranger JA, Brady RO. Experimental animal model for mucopolysaccharidosis: suramin-induced glycosaminoglycan and sphingolipid accumulation in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A 1980;77:3700-4.
- 114. Nakajima M, DeChavigny A, Johnson CE, Hamada J, Stein CA, Nicolson GL. Suramin. A potent inhibitor of melanoma heparanase and invasion. The Journal of biological chemistry 1991;266:9661-6.
- 115. Vreys V, David G. Mammalian heparanase: what is the message? Journal of cellular and molecular medicine 2007;11:427-52.
- 116. Sakashita S, Engvall E, Ruoslahti E. Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. FEBS letters 1980;116:243-6.
- 117. Koda JE, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Basal extracellular proteoglycan binds specifically to native type I collagen fibrils. The Journal of biological chemistry 1984;259:11763-70.
- 118. Zabrenetzky VS, Kohn EC, Roberts DD. Suramin inhibits laminin- and thrombospondinmediated melanoma cell adhesion and migration and binding of these adhesive proteins to sulfatide. Cancer research 1990;50:5937-42.
- 119. De Kruif PH. Paul Ehrlich: The Magic Bullet. Microbe Hunters: Harcourt Brace Jovanovich, Publishers; 1926:S. 174.

7 Eidesstattliche Versicherung

"Ich, David von der Ahe versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Untersuchung der Suramin-induzierten Neurotoxizität im Zellmodell" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE *-www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

David von der Ahe hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Zitierfähige Abstracts:

Publikation 1: Wolfgang Böhmerle, P. Huehnchen, D. von der Ahe, H. Muenzfeld, Matthias Endres, Neue Ansätze zur Prävention Chemotherapie-induzierter Polyneuropathien, Abstract-Nummer: MS82088, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie - Abstracts - Düsseldorf, 23.-26. September 2015, 2015 Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung und Auswertung aller Suramin-bezogenen Experimente

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers (PD Dr. Wolfgang Böhmerle)

Unterschrift des Doktoranden (David von der Ahe)

8 Lebenslauf

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

9 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Böhmerle für seine ausgezeichnete und sehr fachkompetente Anleitung im Rahmen meines Doktorarbeitprojekts ganz herzlich danken. Durch seine Denkanstöße und die stetige Möglichkeit der Diskussion auftretender Probleme machte er mir die Durchführung dieser Arbeit erst möglich.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Endres für seine Unterstützung und die Möglichkeit als medizinischer Doktorand in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten sowie Herrn Prof. Ulrich Dirnagl dafür, dass ich mein Forschungsprojekt in der experimentellen Neurologie realisieren konnte.

Darüber hinaus bin ich Frau Petra Loge überaus dankbar für die ausgezeichnete Einarbeitung in zahlreiche experimentelle Techniken und die dabei stets verbreitete gute Atmosphäre.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Petra Hühnchen danken, die immer ein offenes Ohr für Anliegen und Fragen meinerseits hatte.

Ich danke auch Frau Dr. Dorette Freyer, Herrn Dipl.-Ing. Ingo Presdzing und Herrn Dr. Dirk Megow für die Einweisung und Einarbeitung in Ihre Fachbereiche Zellkultur, Histologie und Biochemie und Ihre hilfreiche und fachkundige Unterstützung.

Auch allen weiteren Mitarbeitern der AG Endres und der experimentellen Neurologie danke ich für Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich auch Nehle und meinen Eltern. Sie und auch meine engen Freunde hatten immer Zeit für meine Anliegen und konnten, durch ihre bedingungslose Unterstützung und lieben Worte, stets wieder die Motivation in mir wecken, wenn dies nötig war.