

Aus dem Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Paclitaxel induziert akute und chronische Alterationen in der
intrazellulären Ca^{2+} Homöostase*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Wolfgang Böhmerle

aus Kirchheim unter Teck

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dietmar Schmitz
2. Prof. Dr. Andreas Draguhn
3. Prof. Dr. Diethelm Wolfgang Richter

Datum der Promotion: 28.01.2008

Inhalt

Abstract	4
Einleitung.....	5
Zielstellung	5
Methodik und Materialien	6
1. Zellkultur und Transfektion	6
2. Optische Ca ²⁺ Messungen in lebenden Zellen	6
3. Biochemie	7
4. Elektrophysiologie.....	8
5. Pharmakologie.....	8
6. Datenanalyse und Präsentation.....	8
Ergebnisse	9
1. NCS-1 moduliert die InsP ₃ R Aktivität.....	9
2. Akute Exposition zu Paclitaxel induziert langsame Ca ²⁺ -Oszillationen.....	9
3. Chronische Exposition mit Paclitaxel vermindert InsP ₃ vermittelte Ca ²⁺ Signale	10
Diskussion	12
1. Mögliche Bedeutung für Schizophrenie und bipolare Erkrankungen	12
2. Relevanz für die Pathogenese spezifischer Nebenwirkungen von Paclitaxel	12
Referenzen.....	14
Liste eigener Publikationen	16
Veröffentlichte Artikel, in chronologischer Reihenfolge	16
Zitierfähige Abstracts	16
Anteil an den eingereichten Publikationen	17
Lebenslauf.....	18
Selbstständigkeitserklärung	19
Danksagung	20
Anhang A: Hier vorgestellte Publikationen	21

Abstract

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten [1-3] wurde eine bisher unbekannte Interaktion zwischen dem Inositol-1,4,5-triphosphat - Rezeptor (InsP₃R) und dem Calcium (Ca²⁺) bindenden Protein „Neuronaler Calcium Sensor-1“ (NCS-1) beschrieben. Außerdem wurde untersucht, welche Bedeutung diese Interaktion für akute und chronische Effekte des antineoplastischen Medikaments Paclitaxel auf die intrazelluläre Ca²⁺ Homöostase neuronaler Zellen hat.

Die Analyse der Interaktion zwischen dem InsP₃R und NCS-1 ergab, dass die InsP₃R-Kanalaktivität durch NCS-1 sowohl Ca²⁺-abhängig als auch unabhängig erhöht wird. Interessanterweise konnte die Verstärkung der Kanalaktivität durch die Zugabe von Lithiumionen abgeschwächt werden. Dies ist vor dem Hintergrund erhöhter NCS-1 Konzentrationen im präfrontalen Kortex schizophrener und bipolarer Patienten von besonderem medizinischem Interesse.

Im Gegensatz dazu führte die akute Zugabe des Chemotherapeutikums Paclitaxel zu einer Verstärkung der Interaktion zwischen dem InsP₃R und NCS-1. Dabei stabilisiert Paclitaxel die Ca²⁺-gebundene Konformation von NCS-1. Diese Konformation bedingt eine vermehrte Bindung von NCS-1 an den InsP₃R, wodurch in einer neuronalen Zelllinie eine starke Zunahme InsP₃R vermittelter langsamer Ca²⁺-Oszillationen induziert wurde. Der beobachtete Effekt ist von hoher klinischer Relevanz, da er im Bereich therapeutischer Paclitaxel Konzentrationen beobachtet werden konnte. Diese langsamen oszillatorischen Schwankungen der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration eröffnen einen neuen Erklärungsansatz für häufige Nebenwirkungen dieses Medikaments, wie zum Beispiel kardiale Arrhythmien, anaphylaktische Reaktionen und vor allem insbesondere die periphere Polyneuropathie, eine häufige und Dosis limitierende unerwünschte Arzneimittelwirkung.

Um den zuletzt beschriebenen Aspekt der Polyneuropathie genauer zu untersuchen, wurden neuronale Zellen längere Zeit mit Paclitaxel im therapeutischen Konzentrationsbereich exponiert. Dies führte bei erhaltener zellulärer Integrität sowohl in einer neuronalen Zelllinie, als auch in einer Kultur primärer Spinalganglien zu einer verminderten InsP₃R vermittelter Ca²⁺-Freisetzung. Dieser im Vergleich zu den akuten Wirkungen scheinbar paradoxe Effekt, kann mit einer negativen Rückkoppelung durch den vermehrten Abbau von NCS-1 durch die Ca²⁺ aktivierte Protease Calpain erklärt werden.

Mit dem aus diesen Arbeiten resultierenden Modell eröffnet sich eine neue Perspektive für das Verständnis und die Behandlung substanzspezifischer Nebenwirkungen von Paclitaxel.

Einleitung

Zytoplasmatische Calcium (Ca^{2+}) - Signale sind an der Regulation einer Vielzahl physiologischer und pathologischer zellulärer Prozesse wie z. B. Wachstum, Differenzierung, Muskelkontraktion, aber auch Apoptose und Nekrose beteiligt. Für die Realisierung sowohl zeitlich als auch örtlich hoch aufgelöster Ca^{2+} Signale, können Calciumionen von extrazellulär, über Kanäle in der Plasmamembran in die Zelle gelangen aber auch aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Der wichtigste intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher ist das endoplasmatische Retikulum (ER), aus dem Ca^{2+} über die Inositol-1, 4,5-triphosphat - Rezeptor (InsP_3R)- und Ryanodin- Rezeptor (R YR)- Familien freigesetzt werden kann. Die Rolle des InsP_3R wurde in einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Situationen beschrieben [4-13]. Von besonderem Interesse sind dabei die vielfältigen Regulationsmöglichkeiten dieses Rezeptor gesteuerten Ionenkanals [14-18].

Im Mittelpunkt der hier vorgestellten Arbeiten [1-3] steht eine neu entdeckte Regulation des InsP_3R durch Interaktion mit dem Protein „Neuronaler Calcium Sensor-1“ (NCS-1). Von besonderem Interesse ist dabei die Frage, ob und gegebenenfalls welche Bedeutung dieser Mechanismus für die zelluläre Calcium-Homöostase in (Patho-) Physiologischen Situationen hat. Untersucht werden sollte dieser Prozess im Hinblick auf Nebenwirkungen des Medikaments Paclitaxel, einer in der Tumorthherapie solider Tumore etablierten Substanz [19-21]. Paclitaxel ist von besonderem Interesse, da es neben einer Stabilisierung von Mikrotubuli auch an NCS-1 bindet und wie beschrieben [22, 23] in hohen Konzentrationen Veränderungen der zellulären Calcium-Homöostase bewirkt.

Zielstellung

Ausgangspunkt für die vorliegenden Arbeiten [1-3] war die Frage, ob die bisher unbekannte Interaktion zwischen dem $\text{InsP}_3\text{R1}$ und NCS-1 relevant ist für die Pathogenese von spezifischen Nebenwirkungen des Chemotherapeutikums Paclitaxel. Zur Beantwortung dieser Frage sollte ein etabliertes in vitro Zellmodell, die humane Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y, verwendet werden. Mittels optischer Ca^{2+} Messungen in lebenden Zellen, sowie verschiedener Methoden der Biochemie, Pharmakologie und Molekularbiologie sollte die Klärung folgender Probleme möglich sein:

- Charakterisierung der Interaktion zwischen dem InsP_3R und NCS-1.
- Charakterisierung akuter Veränderungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase durch therapeutische Paclitaxel Konzentrationen und ihrer molekularen Ursachen.
- Charakterisierung chronischer Veränderungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase durch therapeutische Paclitaxel Konzentrationen und ihrer molekularen Ursachen.
- Identifikation potenziell protektiver Substanzen, ausgehend von einem neuartigen Modell, dass die aktuelle Literatur und die oben genannten Punkte inkorporiert.

Methodik und Materialien

1. Zellkultur und Transfektion

PC12 Zellkultur: Die Ratten Phäochromozytom Zelllinie PC12 wurde nach Standard-Protokoll kultiviert und transfiziert [7].

SH-SY5Y Zellkultur: Die humane Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y (ATCC) wurde wie von Estrada et. al beschrieben, kultiviert und transfiziert [24].

Spinalganglien Zellkultur: Spinalganglien wurden von Neonaten (P1-3) der Sprague-Dawley Ratte isoliert und nach 18-24h für optische Calcium Messungen verwendet [3].

Plasmide: Zur transienten Verminderung der NCS-1 Expression wurde uns von Andreas Jeromin (University of Texas, Austin, TX) ein bicistronischer Vektor zur Verfügung gestellt, der grün fluoreszierendes Protein (GFP) und entweder NCS-1 shRNA oder, als Kontrolle, eine mutierte, gegen kein bekanntes Gen gerichtete shRNA exprimierte [2]. Durch die Expression von GFP können Experimente selektiv an Zellen mit NCS-1 knockdown durchgeführt werden.

2. Optische Ca^{2+} Messungen in lebenden Zellen

Für alle optischen Ca^{2+} Messungen wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert und für 30 Minuten mit dem zellpermeablen Acetoxymethylester des entsprechenden Ca^{2+} Indikators (s.u.) inkubiert. Messungen wurden in einer Puffer gefüllten Messkammer von Warner Instruments durchgeführt [2]. Pharmaka wurden entweder vorsichtig zum Bad zugegeben, oder die Zellen wurden mit Pharmaka haltigem HEPES Puffer perfundiert.

Fluo-4: Dieser nicht-ratiometrische fluoreszierende Ca^{2+} Indikator zeichnet sich durch exzellente Dynamik und hohe Sensitivität aus. Messprinzip bei diesem Indikator ist eine starke Erhöhung der Emissionsintensität bei konstanter Exzitation durch die Bindung von Ca^{2+} Ionen. Dieser Indikator wurde in den vorliegenden Arbeiten hauptsächlich für die Beobachtung von Calcium Oszillationen eingesetzt. Messungen erfolgten mit einem invertierten Laser basierten konfokalen Mikroskop (Zeiss, LSM510 Meta) mit einer Anregungswellenlänge von 488nm und einem 505nm Hochpass Filter [2].

Fura-2: Dieser ratiometrische Calcium Indikator ist besonders für quantitative Messungen von Ca^{2+} geeignet. Messungen erfolgten mit einem invertierten Epifluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) bei wechselnder Anregung mit 340nm und 380nm Wellenlänge. Messprinzip bei diesem Indikator ist eine Verschiebung des Exzitationsmaximums von 380nm nach 340nm durch die Bindung von Ca^{2+} Ionen, wobei die Emission bei 505nm gemessen wird. Die Berechnung der Calcium Konzentration aus der Emissionsratio E340/E380 und die Kalibrierung des Signals sind in [3] beschrieben.

Rhod-2: Dieser non-ratiometrische Calcium Indikator kann mit einer größeren Wellenlänge angeregt werden (543nm) und erlaubt so Calcium-Messungen in GFP exprimierenden Zellen. Messungen wurden mit dem selben System wie für Fluo-4 durchgeführt, mit einer Anregungswellenlänge von 543nm und einem 560nm Hochpassfilter [2, 3].

3. Biochemie

Immunfluoreszenz: Für die Analyse der subzellulären Lokalisation des InsP₃R Typ 1 und NCS-1 wurden Gewebe oder Zellen in Kultur gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Die Zielproteine wurden mit einem spezifischen Erstantikörper markiert und dieser mit einem gegen den Wirt des Erstantikörpers gerichteten Fluorophor konjugierten Zweitantikörper gekoppelt. Diese Antigen-Antikörper Komplexe wurden mithilfe eines invertierten Laser basierten konfokalen Mikroskops (Zeiss, LSM510 Meta) visualisiert [1].

Interaktionsstudie mit Bakteriophagen: Paclitaxel Bindungspartner wurden mit Hilfe von Bakteriophagen, die neuronale Proteine exprimierten, identifiziert. Die Bakteriophagen wurden durch Einklonierung einer kommerziellen cDNA Bibliothek, welche aus humanen Gehirnzellen gewonnen wurde, generiert. Dadurch entstand eine Phagenbibliothek für humane neuronale Proteine. Nach C7 Biotinylierung wurde Paclitaxel an eine Streptavidin Säule gebunden. Nachfolgend wurde die Phagenbibliothek über die Säule geleitet und gebundene Phagen eluiert. Die im Eluat befindlichen Bakteriophagen wurden in *E. coli* amplifiziert und wieder auf die Säule gegeben. Das erlaubte die Affinitätsselektion der Bakteriophagen, die mit Paclitaxel interagierende Proteine exprimieren [2].

Ko-immunopräzipitierung und Western Blot Analyse: Für alle Ko-immunopräzipitierungen wurde Lysat aus Maus-Cerebellum verwendet. Alle für die Immunopräzipitierung eingesetzten Antikörper waren polyklonal und wurden an Protein A Partikel adsorbiert. Nach Inkubation über Nacht und mehreren Waschschrritten erfolgte die Auftrennung mittels Standard Western Blot Methoden. In Kürze: Produkte der Immunopräzipitierung oder Zell- bzw. Gewebelysate wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf PVDF Membranen transferiert. Nach Blockade unspezifischer Bindungsstellen und Inkubation mit einem spezifischen Erstantikörper, gefolgt von einem gegen den Wirt des Erstantikörpers gerichteten Enzym konjugierten Zweitantikörper, erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz und lichtempfindlichem Film. Details in [1].

Messung der Calpain Aktivität und Verdau von NCS-1: Calpain Aktivität in Zelllysat von Paclitaxel bzw. mit Vehikel behandelten Zellen wurde mit einem kommerziellen Lumineszenz basierten Verfahren gemäß Protokoll gemessen (CalpainGlo™, Promega Corp) [3]. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Calpain Aktivität auf die Proteinmenge im eingesetzten Lysat.

Der Abbau von NCS-1 durch μ -Calpain wurde durch Inkubation von purifiziertem NCS-1 mit purifiziertem μ -Calpain in Calpain aktivierenden Konditionen durchgeführt (50 μ M freies Ca²⁺, 37°C). Zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Proben wurden mittels Western Blot analysiert. Siehe auch [3].

Messung der zellulären Integrität: Die zelluläre Integrität wurde mittels zweier Standardverfahren gemessen: Die metabolische Integrität der Mitochondrien wurde mittels eines kommerziell verfügbaren XTT-Tests gemäß Herstellerprotokoll bestimmt (Sigma Aldrich). Neben dem Verlust der metabolischen Integrität ist der Verlust der Plasmamembran Asymmetrie ein frühes Zeichen des apoptotischen, aber auch nekrotischen Zelltodes. Zur

empfindlichen Bestimmung dieses Vorgangs wurde ein kommerziell verfügbares Detektionssystem, basierend auf FITC konjugiertem Annexin V entsprechend Herstellerprotokoll (BD Biosciences), eingesetzt [3, 8].

4. Elektrophysiologie

Zur Messung der Einzelkanalaktivität des InsP₃R wurde aus Maus-Cerebellum isolierter InsP₃R1 in eine künstliche Lipidmembran inkorporiert. Details sind in [1, 16] aufgeführt.

5. Pharmakologie: siehe Tabelle 1

6. Datenanalyse und Präsentation

Resultate wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben oder als ein repräsentatives Experiment gezeigt. [n/N] beschreibt die Anzahl der untersuchten Zellen (n) in N unabhängigen Experimenten. Für die statistische Analyse der Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurde ein Einweg ANOVA (Dunnett) durchgeführt, für den Vergleich zweier Gruppen ein Standard t-Test (bei normal verteilten Werten). P-Werte < 0.05 wurden als signifikant betrachtet. Alle Graphen wurden mit Sigmaplot 10 erstellt. Oszillationsfrequenzen wurden mit einem von Per Uhlen geschriebenen Matlab Programm berechnet [25].

Tabelle 1: Pharmaka, die in den hier zusammengefassten Arbeiten verwendet wurden.

Pharmakon	Zielstruktur/Wirkung	Konzentration
2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB)	InsP ₃ R-Antagonist	20 μ M
Adenosintriphosphat (ATP)	P ₂ X/P ₂ Y-Rezeptor Agonist	5, 10, 200 μ M
AK295	Calpain Inhibitor	10 μ M
ALLN	Calpain Inhibitor	10 μ M
Cyclosporin A	Calcineurin Inhibitor / Inhibitor der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-Pore	5 μ M
Colchicine	Depolymerisation der Mikrotubuli	2.5 μ M
Epothilone B	Stabilisation/Polymerisation der Mikrotubuli	100 nM
FCCP	Entkoppler des mitochondrialen Protonengradienten	1, 10 μ M
Dantrolen	RYR- Antagonist	70 μ M
Paclitaxel	Stabilisation/Polymerisation der Mikrotubuli	0.8, 8, 80, 200, 800, 1600 ng/ml
Thapsigargin	SERCA-Antagonist	3, 5 μ M
U-73122	Inhibitor der Phospholipase C	5 μ M
Xestospongin C	InsP ₃ R-Antagonist	5 μ M

Ergebnisse

1. NCS-1 moduliert die InsP_3R Aktivität

Basierend auf der Beobachtung, dass in Immunfluoreszenz gefärbten Hirnschnitten des Ratten-Cerebellums das Signal des InsP_3R Typ 1 mit dem des NCS-1 kolokalisiert ist (Abb. 1 in [1]), erfolgte die genauere Untersuchung dieser potenziellen Interaktionspartner mittels elektrophysiologischer, biochemischer und zellbiologischer Methoden.

Die Interaktionsstudie mittels Ko-immunopräzipitierung ergab, dass NCS-1 und der InsP_3R Typ 1 nur in der Präsenz von freien Ca^{2+} Ionen nachweisbar aneinander binden (Abb. 2 in [1]). Zur Untersuchung, ob diese Interaktion funktionelle Konsequenzen auf die Aktivität des InsP_3R hat, erfolgte die genaue elektrophysiologische Charakterisierung anhand von Einzelkanalmessungen an in eine artefizielle Lipidmembran inkorporierte InsP_3 -Rezeptoren. Durch Zugabe von purifiziertem NCS-1 Protein, nicht aber einer mutierten Variante dieses Proteins, zur zytoplasmatischen Seite des InsP_3R Typ 1 erhöhte sich die Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals von $4 \pm 0.6\%$ ($n=3$) auf $21 \pm 1,7\%$ ($n=4$) und die mittlere Öffnungszeit von 2.5 ± 0.3 ms ($n=3$) auf 6 ± 0.6 ms ($n=4$) (Abb. 3 in [1]). Die weitere Charakterisierung ergab eine Calcium abhängige und eine Calcium unabhängige Komponente dieses Effekts (Abb. 4 in [1]). Da NCS-1 im präfrontalen Kortex von Patienten mit bipolaren Erkrankungen vermehrt exprimiert wird und Lithiumionen eine effektive Therapie dieser Erkrankung darstellen, wurde der Effekt von Li^+ auf die NCS-1 – InsP_3R 1 Interaktion untersucht. Interessanterweise reduzieren Lithiumionen die positive Modulation des InsP_3R durch NCS-1 mit einem IC_{50} von $350\mu\text{M}$ (Abb. 6 in [1]).

Um die Relevanz dieses Effekts für die Physiologie lebender Zellen zu charakterisieren, wurde die Calcium Freisetzung aus dem ER durch den InsP_3R mittels ATP in PC12 Zellen induziert. Die Messung der intrazellulären Calcium Signale erfolgte durch Beladen der Zellen mit einem fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator (Fluo-4) und die Detektion des Signals mittels Fluoreszenz-Mikroskopie. Dabei wurde in Zellen, die NCS-1 überexprimierten ein Anstieg der normalisierten Fluoreszenz-Intensitäts-Ratio (F/F_0) von $280 \pm 50\%$ ($n=22$) gegenüber dem unstimulierten Ausgangswert gemessen. In der Kontrollgruppe wurde mit dem gleichen Stimulationsprotokoll hingegen nur ein Anstieg von $50 \pm 6\%$ ($n=37$) beobachtet. Auch in lebenden Zellen konnte der attenuierende Effekt von Li^+ nachgewiesen werden, allerdings nur in NCS-1 überexprimierenden Zellen. In diesen Zellen wurde ein Abfall der ATP stimulierten Ca^{2+} Freisetzung von $280 \pm 56\%$ vor der Inkubation mit 10mM Li^+ auf $90 \pm 10\%$ ($n=18$) beobachtet (Abb. 5 in [1]). Dagegen zeigte sich keine signifikante Veränderung in Lithium behandelten Kontrollzellen.

2. Akute Exposition zu Paclitaxel induziert langsame Ca^{2+} -Oszillationen

Es ist bekannt, dass das Chemotherapeutikum Paclitaxel in hohen Konzentrationen eine Veränderung der zytoplasmatischen Calcium-Homöostase bewirkt [22, 23], der Bereich therapeutischer Spiegel wurde jedoch bislang nicht untersucht. Um diesen Bereich, der zwischen 85 und 850ng/ml (100nM - $1\mu\text{M}$) liegt [26], zu charakterisieren, wurde der Effekt von 800ng/ml Paclitaxel auf, mit dem fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 beladenen,

humanen Neuroblastom Zellen (SH-SY5Y) beobachtet. Nach Zugabe von Paclitaxel wurde mit geringer zeitlicher Latenz (<40s) der Beginn von langsamen Calcium-Oszillationen (12.8 ± 0.9 mHz, [191/7]) in $52.6 \pm 3.5\%$ [357/7] aller Zellen beobachtet (Abb. 1A in [2]). Dies war hochsignifikant ($p < 0.01$) verschieden von nur mit dem Trägermedium behandelten Zellen ($3.2 \pm 1.7\%$; [169/5]). Die Bestimmung der EC_{50} für die Induktion von zytosolischen Ca^{2+} Oszillationen ergab 83ng/ml (Abb. 2B in [2]).

Um die Quelle des zytoplasmatischen Ca^{2+} Einstroms zu identifizieren, wurden verschiedene pharmakologische Interventionen vorgenommen, die eine Rolle extrazellulärer und mitochondrialer Ca^{2+} -Freisetzung für die Initiierung dieses Effekts ausschließen konnten. Das ist interessant, da vorhergehende Untersuchungen mit supra-therapeutischen Konzentrationen (10 μ M) eine Freisetzung von Ca^{2+} aus den Mitochondrien zeigen konnten [22, 23]. Depletion des ER verhinderte hingegen die Initiierung dieser oszillatorischen Schwankungen der zytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration, genauso wie die Blockade des $InsP_3R$ und der $InsP_3$ generierenden Phospholipase C. Blockade des RYR resultierte in einer verminderten Amplitude des Ca^{2+} -Signals, was für eine Verstärkung des über den $InsP_3R$ initiierten Ca^{2+} Signals durch Calcium induzierte Calcium Freisetzung spricht. (Abb. 1+2 in [2]).

Da der $InsP_3R$ nicht direkt mit Tubulin, der pharmakologischen Zielstruktur von Paclitaxel, interagiert (Abb. 3A in [2]), wurde mittels C7-biotinyliertem Paclitaxel und einer Bakteriophagen-Bibliothek, die neuronale Proteine exprimiert, nach unbekanntem Interaktionspartnern von Paclitaxel gesucht. Nach 3 Runden der Affinitätsselektion wurde von 8 aus 16 zufällig ausgewählten Phagen-Klonen das Protein NCS-1 exprimiert. Analyse der Bindungsaffinität der NCS-1 exprimierenden Bakteriophagen ergab einen EC_{50} -Wert von 728 ± 44 ng/ml (557 ± 34 nM; Abb. 3B in [2]).

Die Interaktionsstudie mittels Ko-immunopräzipitierung mit und ohne Paclitaxel zeigte eine vermehrte Bindung von NCS-1 an den $InsP_3R$ in der Anwesenheit von Paclitaxel (Abb. 3C in [2]). Um die funktionelle Bedeutung dieser vermehrten Bindung zu untersuchen, wurde die NCS-1 Expression mittels eines shRNA exprimierenden Vektors transient vermindert. Dabei zeigte sich, dass in Zellen mit geringer NCS-1 Expression keine zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen mit Paclitaxel mehr induzierbar waren. ATP induzierte Oszillationen unterschieden sich jedoch nicht von der Kontrollgruppe (Abb. 3E,F in [2]).

3. Chronische Exposition mit Paclitaxel vermindert $InsP_3$ vermittelte Ca^{2+} Signale

Auf die Beobachtung aufbauend, dass akute Exposition mit Paclitaxel Ca^{2+} -Oszillationen induziert, stellte sich die Frage, ob auch die chronische Exposition mit dieser Substanz eine Veränderung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase bewirkt. Um das zu untersuchen, wurden SH-SY5Y Zellen 6h entweder mit 800ng/ml Paclitaxel oder mit Vehikel behandelt und anschließend ihre Spontanaktivität mit dem Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 beobachtet. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Um Veränderungen in der stimulierten Ca^{2+} Freisetzung aus dem ER zu untersuchen, wie sie z. B. bei der diabetischen Polyneuropathie (PNP) beschrieben sind [27], wurde das durch ATP induzierte InsP_3R vermittelte Ca^{2+} -Signal in den für 6h mit Paclitaxel inkubierten Zellen untersucht. In Paclitaxel behandelten Zellen stieg durch Stimulation mit ATP die zytoplasmatische Ca^{2+} Konzentration um $321 \pm 30\text{nM}$ [136/6], was hochsignifikant ($p < 0.001$) niedriger war als in der Kontrollgruppe ($733 \pm 48\text{nM}$; [156/7]; Abb. 1A,B in [3]).

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die Vitalität der Zellen, genauso wie die InsP_3R Typ 1 Expression, sowie die im ER gespeicherte Ca^{2+} -Menge und P2Y -Rezeptorexpression untersucht. Dabei ergab sich in keinem der erwähnten Punkte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Um die Frage der Bedeutung des mikrotubulären Zytoskeletts für diesen Effekt zu klären, wurde dasselbe Experiment mit anderen Mikrotubuli stabilisierenden (Epothilon B) oder destabilisierenden (Colchicin) Pharmaka wiederholt, wobei sich hierbei keine signifikanten Veränderungen der Ca^{2+} Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle zeigten (Abb. 1E in [3]).

Da Paclitaxel die InsP_3R -NCS-1 Interaktion modifiziert, wurde die NCS-1 Proteinmenge mittels Western Blot bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verminderung ($57 \pm 12\%$) von NCS-1 in Paclitaxel behandelten Zellen (Abb. 2A,B in [3]).

Messung der ATP stimulierten Ca^{2+} -Freisetzung in Zellen, in denen mittels shRNA transient die NCS-1 Expression vermindert war, ergab eine Reduktion der Signalamplitude in derselben Größenordnung wie in Paclitaxel behandelten Zellen ($54.5 \pm 4.7\%$; Abb. 2C in [3]). Dies unterstützt die Interpretation, dass die verminderte Ca^{2+} Freisetzung in Paclitaxel behandelten Zellen auf eine verminderte NCS-1 Proteinmenge zurückzuführen ist.

Analog zu rückläufigen Symptomen in Patienten mit milder PNP [28], konnte interessanterweise in für 6h mit Paclitaxel behandelten Zellen, 26h nach Ende der Exposition, eine komplette Normalisierung der InsP_3 vermittelten Ca^{2+} -Signale und der NCS-1 Proteinmenge beobachtet werden (Abb. 2D,E in [3]). Um diese Beobachtungen zu validieren, wurden die wichtigsten Experimente an Kulturen primärer Spinalganglien und in Gewebe von Paclitaxel behandelten Mäusen wiederholt, wobei die Befunde aus der Zellkultur reproduziert werden konnten (Abb. 3 in [3]).

Es wurde berichtet, dass Inhibition der Ca^{2+} -aktivierten Protease Calpain protektiv gegen Paclitaxel induzierte PNP bei Mäusen wirkt [29]. Die Messung der Calpain-Aktivität in für 6h mit Paclitaxel behandelten SH-SY5Y Zellen ergab eine signifikante Erhöhung der Calpain Aktivität um $21 \pm 4\%$. Inhibition von Calpain mittels eines zellpermeablen Inhibitors während der Exposition mit Paclitaxel, blockierte den Abbau von NCS-1 und bei der Stimulation mit ATP zeigte sich entsprechend eine normale Ca^{2+} -Amplitude. Mittels eines in vitro Verdaus mit aufgereinigtem μ -Calpain und NCS-1 konnte ferner gezeigt werden, dass μ -Calpain NCS-1 rasch abbaut (Abb. 4 in [3]).

Diskussion

Die hier vorgestellten Arbeiten [1-3] charakterisieren die $\text{InsP}_3\text{R-NCS-1}$ Interaktion auf molekularer und zellulärer Ebene in verschiedenen Modellsystemen und die daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen für die intrazelluläre Ca^{2+} Homöostase. Die klinische Relevanz dieser Befunde ergibt sich aus der hohen Prävalenz der studierten Pathologien und der bis jetzt unbefriedigenden therapeutischen Optionen, wie im Einzelnen dargestellt:

1. Mögliche Bedeutung für Schizophrenie und bipolare Erkrankungen

Verschiedene Quellen deuten darauf hin, dass eine dysregulierte Ca^{2+} -Homöostase in der Pathogenese bipolarer und schizophrener Störungen eine Rolle spielt [30, 31]. Vor dem Hintergrund erhöhter NCS-1 Konzentrationen im präfrontalen Kortex dieser Patienten [32] und unserer Ergebnisse [1], erscheint es möglich, dass die beschriebene Dysregulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase durch eine übersteigerte positive Modulation des InsP_3R durch NCS-1 bedingt ist. Diese Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass in unserer Studie Lithiumionen, welche seit Jahrzehnten erfolgreich in der Therapie bipolarer Störungen eingesetzt werden, eine Normalisierung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase herbeiführen konnten, ohne jedoch die Ca^{2+} -Homöostase in Zellen mit normalen NCS-1 Konzentrationen zu beeinträchtigen. Dies unterstreicht die mögliche Bedeutung der Ca^{2+} -Dysregulation in psychiatrischen Erkrankungen und eröffnet neue Forschungs- und Therapieansätze.

2. Relevanz für die Pathogenese spezifischer Nebenwirkungen von Paclitaxel

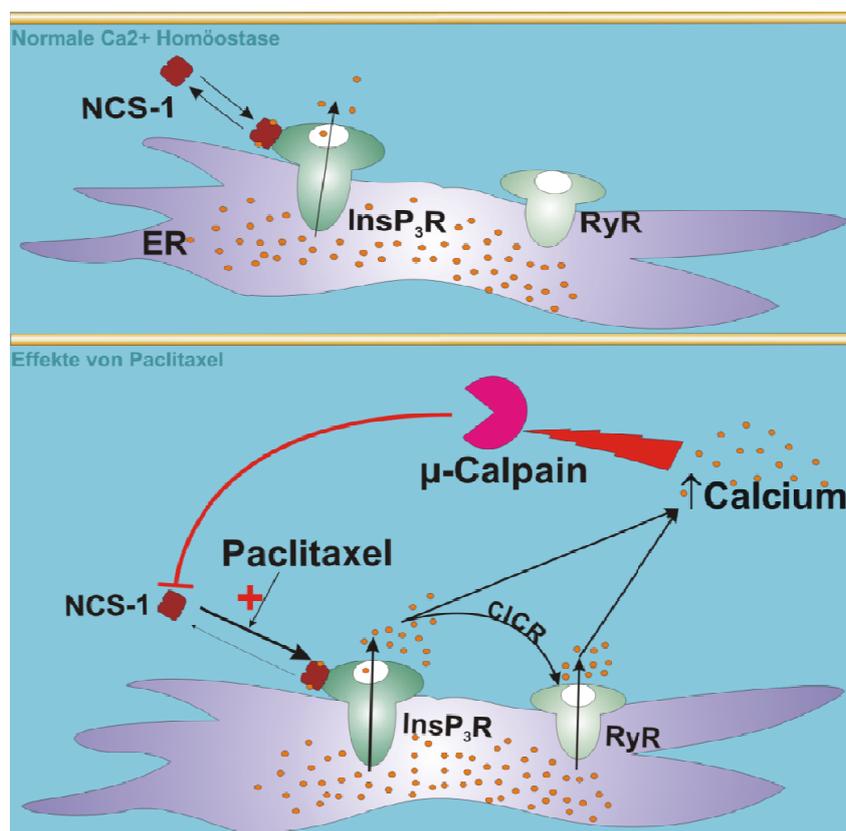
Periphere Polyneuropathie ist eine sehr häufige, Dosis limitierende und schlecht verstandene Nebenwirkung des potenten Chemotherapeutikums Paclitaxel. Während manche Studien diese Nebenwirkung auf das Trägermedium Cremophor EL zurückführten (zusammengefasst in [33]), weisen neuere Studien auf eine kausale Rolle von Paclitaxel hin [34]. Verschiedene in vitro und in vivo Untersuchungen deuten auf eine kausale Rolle einer gestörten intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase in Paclitaxel induzierter PNP [22, 23, 29, 35-37]. Es fehlte jedoch bislang ein Modell, welches alle bisher beschriebenen Aspekte zu vereinen vermag. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten [2, 3] gelang es nachzuweisen, dass therapeutische Konzentrationen von Paclitaxel langsame Ca^{2+} -Oszillationen in neuronalen Zellen induzieren. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Oszillation bei höheren Konzentrationen [23], ist dieser Effekt auf eine verstärkte Bindung von NCS-1 an den InsP_3R und der daraus resultierenden positiven Modulation dieses Liganden gesteuerten Ca^{2+} -Kanals zurückzuführen [2].

Interessanterweise führte dagegen eine längere Exposition mit Paclitaxel zu einer Verminderung von InsP_3 vermittelten Ca^{2+} -Signalen [3]. Dieser auf den ersten Blick paradoxe Befund lässt sich durch die Aktivierung von μ -Calpain, einer durch Ca^{2+} aktivierten, NCS-1 abbauenden Protease erklären, die durch negatives Feedback die Oszillationen zum Erliegen bringt. (Details siehe Abb.1). Dies könnte die von Wang et al. beschriebene

Effektivität von Calpain Inhibitoren in der Prävention von PNP in Paclitaxel behandelten Mäusen erklären [29]. Die von uns beobachtete vollständige Reversibilität der gestörten Ca^{2+} -Homöostase, könnte dabei als Modell für die initial leichte und reversible PNP dienen [28], während die irreversible schwere PNP durch Zelltod peripherer Neurone infolge exzessiver Calpain Aktivierung zu erklären wäre [38]. Damit erlauben die hier vorgestellten Beobachtungen [1-3] erstmals die Formulierung eines Modells, welches verschiedene Aspekte der klinischen- und Grundlagenforschung zu diesem Thema zu integrieren vermag und damit neue Ansätze in der Therapie von Paclitaxel induzierter PNP ermöglicht.

Zusammenfassend stellen die hier vorgestellten Arbeiten eine neue Regulationsmöglichkeit des InsP_3R durch das Ca^{2+} bindende Protein NCS-1 vor. Die auf dieser Basis beruhenden noch weitgehend unerforschten zellulären Prozesse, versprechen nicht nur ein besseres mechanistisches Verständnis, sondern auch neue und effektivere Therapien verschiedener Pathologien.

Abbildung 1. Zusammenfassendes Modell. Bindung von Paclitaxel an NCS-1 führt zu verstärkter Bindung von NCS-1 an den InsP_3R durch Stabilisierung der Ca^{2+} gebundenen Konformation von NCS-1. Die dadurch bedingte positive Modulation dieses Liganden gesteuerten Ca^{2+} Kanals führt zu verstärkter Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER, wobei das Signal durch den RYR verstärkt wird. Dies aktiviert die Ca^{2+} abhängige Protease μ -Calpain, welche in einer negativen Feedbackschleife NCS-1 abbaut. Dies beeinträchtigt die normale zelluläre Ca^{2+} -Homöostase mit potenziell wichtigen Folgen für die Ausbildung einer peripheren Polyneuropathie.



Referenzen

1. Schlecker, C., Boehmerle, W., Jeromin, A., et al., *Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium*. J Clin Invest., 2006. **116**(6): p. 1668-74. Epub 2006 May 11.
2. Boehmerle, W., Splittgerber, U., Lazarus, M.B., et al., *Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2006. **103**(48): p. 18356-61. Epub 2006 Nov 17.
3. Boehmerle, W., Zhang, K., Sivula, M., et al., *Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain mediated NCS-1 degradation in neuronal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2007. **104**(26): p. 11103-8. Epub 2007 Jun 20.
4. Jochenning, F.W., Zochowski, M., Conway, S.J., Holmes, A.B., Koulen, P., and Ehrlich, B.E., *Distinct intracellular calcium transients in neurites and somata integrate neuronal signals*. J Neurosci., 2002. **22**(13): p. 5344-53.
5. Tang, T.S., Tu, H., Chan, E.Y., et al., *Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1*. Neuron, 2003. **39**(2): p. 227-39.
6. Shibao, K., Hirata, K., Robert, M.E., and Nathanson, M.H., *Loss of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors from bile duct epithelia is a common event in cholestasis*. Gastroenterology, 2003. **125**(4): p. 1175-87.
7. Jacob, S.N., Choe, C.U., Uhlen, P., DeGray, B., Yeckel, M.F., and Ehrlich, B.E., *Signaling microdomains regulate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium transients in cultured neurons*. J Neurosci, 2005. **25**(11): p. 2853-64.
8. Estrada, M., Varshney, A., and Ehrlich, B.E., *Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells*. J Biol Chem, 2006.
9. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature., 1993. **361**(6410): p. 315-25.
10. Berridge, M.J., *Neuronal calcium signaling*. Neuron, 1998. **21**(1): p. 13-26.
11. Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Lipp, P., *Calcium--a life and death signal*. Nature, 1998. **395**(6703): p. 645-8.
12. Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L., *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
13. Ciccolini, F., Collins, T.J., Sudhoelter, J., Lipp, P., Berridge, M.J., and Bootman, M.D., *Local and global spontaneous calcium events regulate neurite outgrowth and onset of GABAergic phenotype during neural precursor differentiation*. J Neurosci, 2003. **23**(1): p. 103-11.
14. Kasri, N.N., Holmes, A.M., Bultynck, G., et al., *Regulation of InsP(3) receptor activity by neuronal Ca(2+)-binding proteins*. Embo J, 2004. **23**(2): p. 312-21.
15. Hagar, R.E., Burgstahler, A.D., Nathanson, M.H., and Ehrlich, B.E., *Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium*. Nature, 1998. **396**(6706): p. 81-4.
16. Thrower, E.C., Choe, C.U., So, S.H., Jeon, S.H., Ehrlich, B.E., and Yoo, S.H., *A functional interaction between chromogranin B and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca2+ channel*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49699-706.
17. Bezprozvanny, I., *The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*. Cell Calcium., 2005. **38**(3-4): p. 261-72.
18. Wagner, L.E., 2nd, Betzenhauser, M.J., and Yule, D.I., *ATP binding to a unique site in the type-1 S2- inositol 1,4,5-trisphosphate receptor defines susceptibility to phosphorylation by protein kinase a*. J Biol Chem., 2006. **281**(25): p. 17410-9. Epub 2006 Apr 18.
19. Spencer, C.M. and Faulds, D., *Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer*. Drugs., 1994. **48**(5): p. 794-847.
20. Rowinsky, E.K. and Donehower, R.C., *Paclitaxel (taxol)*. N Engl J Med., 1995. **332**(15): p. 1004-14.
21. Mekhail, T.M. and Markman, M., *Paclitaxel in cancer therapy*. Expert Opin Pharmacother., 2002. **3**(6): p. 755-66.

22. Kidd, J.F., Pilkington, M.F., Schell, M.J., et al., *Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore*. J Biol Chem., 2002. **277**(8): p. 6504-10. Epub 2001 Nov 27.
23. Mironov, S.L., Ivannikov, M.V., and Johansson, M., *[Ca²⁺]_i signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum in neurons is regulated by microtubules. From mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*. J Biol Chem., 2005. **280**(1): p. 715-21. Epub 2004 Oct 29.
24. Estrada, M., Uhlen, P., and Ehrlich, B.E., *Ca²⁺ oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth*. J Cell Sci., 2006. **119**(Pt 4): p. 733-43. Epub 2006 Jan 31.
25. Uhlen, P., *Spectral analysis of calcium oscillations*. Sci STKE., 2004. **2004**(258): p. p15.
26. Rowinsky, E.K., Jiroutek, M., Bonomi, P., Johnson, D., and Baker, S.D., *Paclitaxel steady-state plasma concentration as a determinant of disease outcome and toxicity in lung cancer patients treated with paclitaxel and cisplatin*. Clin Cancer Res., 1999. **5**(4): p. 767-74.
27. Kruglikov, I., Gryshchenko, O., Shutov, L., Kostyuk, E., Kostyuk, P., and Voitenko, N., *Diabetes-induced abnormalities in ER calcium mobilization in primary and secondary nociceptive neurons*. Pflugers Arch., 2004. **448**(4): p. 395-401. Epub 2004 Mar 27.
28. Rowinsky, E.K., Chaudhry, V., Cornblath, D.R., and Donehower, R.C., *Neurotoxicity of Taxol*. J Natl Cancer Inst Monogr., 1993(15): p. 107-15.
29. Wang, M.S., Davis, A.A., Culver, D.G., Wang, Q., Powers, J.C., and Glass, J.D., *Calpain inhibition protects against Taxol-induced sensory neuropathy*. Brain., 2004. **127**(Pt 3): p. 671-9. Epub 2004 Feb 4.
30. Yarlagadda, A., *Role of calcium regulation in pathophysiology model of schizophrenia and possible interventions*. Med Hypotheses, 2002. **58**(2): p. 182-6.
31. Strunecka, A. and Ripova, D., *What can the investigation of phosphoinositide signaling system in platelets of schizophrenic patients tell us?* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999. **61**(1): p. 1-5.
32. Koh, P.O., Undie, A.S., Kabbani, N., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S., and Lidow, M.S., *Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 313-7.
33. Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., and Sparreboom, A., *Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation*. Eur J Cancer., 2001. **37**(13): p. 1590-8.
34. Mielke, S., Sparreboom, A., Steinberg, S.M., et al., *Association of Paclitaxel pharmacokinetics with the development of peripheral neuropathy in patients with advanced cancer*. Clin Cancer Res., 2005. **11**(13): p. 4843-50.
35. Alessandri-Haber, N., Dina, O.A., Yeh, J.J., Parada, C.A., Reichling, D.B., and Levine, J.D., *Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat*. J Neurosci., 2004. **24**(18): p. 4444-52.
36. Flatters, S.J. and Bennett, G.J., *Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy*. Pain., 2004. **109**(1-2): p. 150-61.
37. Siau, C. and Bennett, G.J., *Dysregulation of cellular calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy*. Anesth Analg., 2006. **102**(5): p. 1485-90.
38. Harwood, S.M., Yaqoob, M.M., and Allen, D.A., *Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis*. Ann Clin Biochem., 2005. **42**(Pt 6): p. 415-31.

Liste eigener Publikationen

Veröffentlichte Artikel, in chronologischer Reihenfolge

Schlecker C, **Boehmerle W**, Jeromin A, DeGray B, Varshney A, Sharma Y, Szigeti-Buck K, Ehrlich BE (2006). Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium.

The Journal of Clinical Investigation 116:1668-1674. Epub 2006 May 16 11.

Boehmerle W, Splittgerber U, Lazarus MB, McKenzie KM, Johnston DG, Austin DJ and Ehrlich BE (2006). Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor-1 dependent mechanism.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(48):18356-61. Epub 2006 Nov 17.

Nicolay NH, Hertle D, **Boehmerle W**, Heidrich FM, Yeckel M, and Ehrlich BE (2007). Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor and chromogranin B are concentrated in different regions of the hippocampus.

Journal of Neuroscience Research 85(9):2026-36.

Boehmerle W, Zhang K, Sivula M, Heidrich FM, Lee Y, Jordt SE and Ehrlich BE (2007). Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain mediated NCS-1 degradation.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(26):11103-8. Epub 2007 Jun 20.

Zitierfähige Abstracts

Johnston DG, **Boehmerle W**, Ehrlich BE (2006). Calcium Release in Neuroblastoma Cells is diminished by the Anticancer Agent Taxol.

2006 Biophysical Society Meeting Abstracts. Biophysical Journal, Supplement, 20a, Abstract, 2556-Pos.

Boehmerle W, Sivula M, Jordt SE, Ehrlich BE (2007). Paclitaxel induces alterations in InsP3 mediated calcium signaling via calpain mediated NCS-1 degradation in neuronal cells.

2007 Biophysical Society Meeting Abstracts. Biophysical Journal, Supplement, 21a, Abstract, 2836-Pos.

Burch PM, Fornaro M, **Boehmerle W**, Yang W, Zhang L, Hamilton CE, Ehrlich BE, Neel BG, Bennett AM. SHP-2 Regulates Skeletal Muscle Growth by Activation of the NFAT Signaling Pathway. Gordon Research Conference on Myogenesis. Lucca, Italy. May, 2007.

(Stand Juli 2007)

Der Promovend hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1: *“Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium.”*

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Untersuchung der Protein-Protein Interaktion zwischen NCS-1 und InsP₃R Typ 1 mittels Ko-Immunopräzipitierung und Charakterisierung der calciumabhängigkeit dieser Assoziation (Abb.2). Revision des Manuskripts.

Publikation 2: *“Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor-1 dependent mechanism”*

75 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung aller Experimente bis auf die Phagen Interaktionsstudie (Abb. 3B). Auswertung der Daten und ihre graphische Aufbereitung sowie Schreiben des Manuskripts.

Publikation 3: *“Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated NCS-1 degradation”*

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung aller Experimente, bis auf die Experimente mit Taxol behandelten Mäusen und den Experimenten im Anhang. Auswertung aller Daten und ihre graphische Aufbereitung sowie Schreiben des Manuskripts.

Berlin, den 24.07.2007 -----

(Wolfgang Böhmerle)

Lebenslauf

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

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Wolfgang Böhmerle, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Paclitaxel induziert akute und chronische Alterationen in der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase“

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

Berlin, den 24.07.2007 -----

(Wolfgang Böhmerle)

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Barbara E. Ehrlich für die Einladung in Ihrem Labor in New Haven zu forschen und die unkomplizierte, informative und ausgesprochen produktive Zusammenarbeit. Manuel Estrada, Per Uhlén und Anurag Varshney gebührt besonderer Dank für die exzellente experimentelle Betreuung und anregende wissenschaftliche Diskussionen, sowie Brenda DeGray für unermüdliche logistische Unterstützung.

Auf deutscher Seite möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Uwe Heinemann und Prof. Dr. Dietmar Schmitz für die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Ich danke Familie Weber für Grammatik und Stilberatung.

Ohne die fortlaufende Hilfe und Unterstützung durch meine Familie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dank geht auch an die Studienstiftung des deutschen Volkes, die mich mit einem Auslandsstipendium finanziell unterstützte.

Anhang A: Hier vorgestellte Publikationen

1. Schlecker C, Boehmerle W, Jeromin A, DeGray B, Varshney A, Sharma Y, Szigeti-Buck K, Ehrlich BE (2006). Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *The Journal of Clinical Investigation* 116:1668-1674. Epub 2006 May 16 11.
2. Boehmerle W, Splittgerber U, Lazarus MB, McKenzie KM, Johnston DG, Austin DJ and Ehrlich BE (2006). Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor-1 dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48):18356-61. Epub 2006 Nov 17.
3. Boehmerle W, Zhang K, Sivula M, Heidrich FM, Lee Y, Jordt SE and Ehrlich BE (2007). Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain mediated NCS-1 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(26):11103-8. Epub 2007 Jun 20.