

Aus dem  
CharitéCentrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie  
Klinik für Neurologie und Institut für Experimentelle Neurologie, Charité Campus Mitte  
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Endres

## **Habilitationsschrift**

# **Pathomechanismen und Präventionsstrategien Chemotherapie induzierter Neuropathien**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Wolfgang Böhmerle**  
geboren in Kirchheim unter Teck

Eingereicht: August 2015  
Dekan: Prof. Dr. med. Axel Radlach Pries  
1. Gutachterin: Prof. Dr. Claudia Sommer  
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Schwaninger

# Inhalt

<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>3</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
1.1 KLINISCHE ASPEKTE CHEMOTHERAPIE INDUZIRTER POLYNEUROPATHIEN (CIPN) .....	4
1.2 PRÄKLINISCHE MODELLE DER CIPN .....	5
1.3 ZIELSTELLUNG.....	9
<b>2. EIGENE ARBEITEN</b> .....	<b>10</b>
2.1 PATHOMECHANISMEN IM ZELLMODELL .....	10
2.1.1 <i>Paclitaxel verändert die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Homöostase durch eine NCS-1 abhängige Modulation des InsP<sub>3</sub>R auf Einzelkanalebene mit gewebespezifischer Aktivierung nachgeordneter Signalwege</i> .....	10
2.1.2 <i>Salinomycin induziert eine Ca<sup>2+</sup> vermittelte bimodale Caspasen Aktivierung in Spinalganglienzellen</i> .....	18
2.2 TIERMODELLE DER CIPN.....	29
2.2.1 <i>Automatisierte Ganganalyse als alternativer Endpunkt im CIPN Tiermodell</i> .....	29
2.2.2 <i>Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Bortezomib, Cisplatin, Paclitaxel und Vincristin induzierten Neuropathie im Mausmodell</i> .....	39
2.3 PRÄVENTION TOXISCHER NEUROPATHIEN IM TIERMODELL .....	49
2.3.1 <i>Prävention der Salinomycin induzierten Neuropathie im Mausmodell</i> .....	49
<b>3. DISKUSSION</b> .....	<b>62</b>
3.1 ZELLULÄRE PATHOMECHANISMEN DER CIPN .....	62
3.2 GEEIGNETE ENDPUNKTE UND MODELLE IN TIEREXPERIMENTELLEN STUDIEN DER CIPN .....	66
3.3 NEUE PRÄVENTIONSSTRATEGIEN DER CIPN.....	69
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>72</b>
<b>5. LITERATURANGABEN</b> .....	<b>73</b>
5.1. REFERENZEN DER DIESER ARBEIT ZUGRUNDELIEGENDEN ORIGINALARBEITEN .....	77
<b>6. DANKSAGUNG</b> .....	<b>78</b>
<b>7. ERKLÄRUNG</b> .....	<b>79</b>

## Abkürzungen

Ca <sup>2+</sup>	Calcium Ionen
CIPN	Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HMSN	Hereditäre motorisch-sensible Neuropathie
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
InsP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor
KG	Körpergewicht
NCS-1	Neuronaler Ca <sup>2+</sup> Sensor 1
SNAP	Sensibles Nervenaktionspotential
TRP	„Transient receptor potential“ Kanäle

# 1. Einleitung

## 1.1 Klinische Aspekte Chemotherapie induzierter Polyneuropathien (CIPN)

Polyneuropathien gehören mit einer Prävalenz von circa 10% zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Unter den mehr als 100 beschriebenen Differentialdiagnosen dieses Krankheitsbildes nimmt die Gruppe der medikamentös-toxischen Neuropathien eine wichtige Position ein. In dieser wiederum sehr heterogenen Entität sind insbesondere Zytostatika vermittelte Neuropathien angesichts der hohen Prävalenz von Tumorerkrankungen von zunehmendem Interesse. Viele hochaktive Zytostatika wie zum Beispiel Platin-Komplexe (Krarup-Hansen et al. 2007), Proteasominhibitoren (speziell Bortezomib (Richardson et al. 2003)), Taxane (insbesondere Paclitaxel (Postma et al. 1995)) und Vincaalkaloide (Caccia et al. 1977) führen häufig zu einer Dosis und Therapie limitierenden Neuropathie (Siehe auch Übersichtsarbeit von (Argyriou et al. 2014)). Die mit der CIPN einhergehende gesteigerte Morbidität und Letalität der Patienten hebt die sozioökonomische Bedeutung dieses Krankheitsbildes hervor und unterstreicht die Notwendigkeit intensiver Forschung zu dieser Erkrankung.

Obwohl neurotoxische Phänomene trotz des postmitotischen Zustands von Nervenzellen für viele Zytostatika zu den häufigsten und am schlechtesten kontrollierbaren Nebenwirkungen zählen, sind für die meisten Substanzen die zugrundeliegenden Pathomechanismen nur unvollständig erforscht. Trotz intensiver Bemühungen gibt es daher für die CIPN keine an großen Patientenkohorten validierte Therapie- bzw. Präventionsmöglichkeit (zusammengefasst in (Hershman et al. 2014)). Aktuelle Therapiestrategien erschöpfen sich in einer klinisch häufig sehr schwierigen und unbefriedigenden symptomatischen Therapie.

Das Fehlen sowohl einer präventiven als auch einer spezifisch therapeutischen Behandlung ist insofern bemerkenswert, da die CIPN als ein Modell einer neurodegenerativen Erkrankung im peripheren Nervensystem mit einem klar definierten Beginn verstanden werden kann. Eine präventive bzw. frühe therapeutische Intervention wäre aufgrund des definierten Schädigungszeitpunkts zumindest theoretisch dann problemlos möglich, wenn sich der molekulare Mechanismus der CIPN-Induktion vom Wirkmechanismus des Zytostatikums unterscheidet. Da dies nach erfolgter Zulassung einer Substanz nur sehr schwer mit Sicherheit nachzuweisen ist, bestehen aus onkologischer Sicht gegenüber einer präventiv applizierten Komedikation Vorbehalte in Bezug auf eine möglicherweise verminderte zytostatische Wirkung (Boehmerle et al. 2015). Zurzeit besteht die einzige gut belegte präventive Strategie zur Vermeidung einer CIPN daher in der Veränderung des Therapieplans hinsichtlich der Häufigkeit, Dosierung und des Applikationswegs der neurotoxischen Substanz. So wurde etwa für den Proteasominhibitor Bortezomib eine signifikant geringere Häufigkeit von Neuropathien nach subkutaner statt intravenöser Infusion berichtet (Moreau et al. 2011).

## **1.2 Präklinische Modelle der CIPN**

Zur weiteren Erforschung von CIPN Pathomechanismen und der präklinischen Testung möglicher therapeutischer bzw. präventiver Interventionen wurden bislang eine Vielzahl von Zell- und Tiermodellen vorwiegend in den Spezies Maus und Ratte beschrieben (Authier et al. 2009). Da sensible Phänomene im Tiermodell nur schwer zu erfassen sind, wird in praktisch allen Studien eine Verminderung der mechanischen (und oder thermischen) Reizschwelle als Goldstandard verwandt. Übertragen auf die humane Situation wird dies meist als Äquivalent der von Patienten berichteten mechanischen oder thermischen Allodynie gewertet. Ein methodischer Nachteil dieser

Untersuchungen ist, dass letztlich eine motorische Reaktion auf einen isolierten (artifizialen) Stimulus bewertet wird und somit nur dann valide Rückschlüsse auf das sensible Nervensystem gezogen werden können, wenn die Tiere auch auf motorische Defizite hin untersucht wurden. Es ist zudem umstritten inwiefern die Entwicklung einer mechanischen Allodynie relevante Probleme der Patienten abbildet, da diese oft am meisten unter (spontan auftretenden) neuropathischen Schmerzen leiden. Auch die Wahl der Spezies bzw. des Stammes beeinflusst in erheblichem Ausmaß experimentelle Resultate. Eine vergleichende Untersuchung an 10 verschiedenen Mausstämmen zeigte eine teilweise mehr als doppelt so starke Ausprägung der Paclitaxel-induzierten mechanischen Allodynie zwischen den Gruppen (Smith et al. 2004).

Im Hinblick auf die Pathogenese der CIPN deuten zahlreiche publizierte Ergebnisse aus Zell- und Tiermodellen auf eine wichtige Rolle einer gestörten intrazellulären Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Homöostase. So konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass durch die Applikation  $\text{Ca}^{2+}$  puffernder Substanzen eine Verbesserung des klinischen Phänotyps einer Paclitaxel, Vincristin bzw. Zalcitabin induzierten Polyneuropathie erreicht wird (Siau et al. 2006). Auch für  $\text{Ca}^{2+}$  permeable Kationenkanäle aus der „transient receptor potential“ (TRP) Familie wurde wiederholt ein Zusammenhang mit Veränderungen der mechanischen aber auch thermischen Reizschwelle in CIPN Modellen gezeigt (Alessandri-Haber et al. 2004, Alessandri-Haber et al. 2008, Chen et al. 2011, Materazzi et al. 2012). In weiteren Experimenten ergaben sich Hinweise für die Effektivität von Ethosuximid, einem T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Inhibitor, im Paclitaxel und Vincristin Tiermodell (Flatters et al. 2004). Im Rahmen der oben angeführten Studien wurde jedoch nicht untersucht, ob mit der klinischen Verbesserung, insbesondere der mechanischen Allodynie, auch eine strukturelle Veränderung des peripheren Nervensystems einhergeht. Im ungünstigsten Falle sind die untersuchten molekularen

Mechanismen daher nur für symptomatische Therapieansätze geeignet. Im Gegensatz zu den vorgenannten Studien wurde für die Blockade der  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Protease Calpain im Mausmodell der Paclitaxel induzierten Neuropathie ein effektiver Schutz in den Endpunkten Verhalten, Elektrophysiologie und Histologie gezeigt (Wang et al. 2004). Ein wichtiges Merkmal dieser Studie ist der Nachweis einer erhaltenen zytostatischen Wirkung trotz neuroprotektiver Intervention. Damit spricht diese Arbeit nicht nur für eine kausale Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$  Dyshomöostase in der Pathogenese der Paclitaxel induzierten Neuropathie, sondern eröffnet die Möglichkeit einer gezielt protektiven Behandlung bei erhaltenem antiproliferativem Wirkmechanismus. In eigenen Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass Paclitaxel in neuronalen Zellen mit kurzer zeitlicher Latenz eine durch das Protein neuronaler  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor 1 (NCS-1) und dem Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) vermittelte Dysregulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase hervorruft (Boehmerle et al. 2006). Bei längerer Exposition mit Paclitaxel wurde eine Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Protease Calpain, sowie eine Calpain vermittelte Erniedrigung der intrazellulären NCS-1 Konzentration nach Paclitaxelbehandlung nachgewiesen. Eine pharmakologische Inhibition von Calpain konnte sowohl den Abbau von NCS-1, als auch Veränderungen  $\text{InsP}_3$  vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$  Signale verhindern. Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass es in Paclitaxel behandelten neuronalen Zellen durch eine  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelte Aktivierung der Protease Calpain zu einer negativen Feedbackschleife mit Spaltung des Paclitaxel bindenden Proteins NCS-1 und nachfolgend verminderter  $\text{InsP}_3$  vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung aus dem ER kommt (Boehmerle et al. 2007).

Weitere Anhaltspunkte für eine bedeutende Rolle der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  (Dys-) Homöostase im Kontext toxischer Neuropathien, wurden für das in der experimentellen Tumorforschung genutzte und zur Behandlung der Schlafkrankheit zugelassene Medikament Suramin berichtet. So führte die Behandlung kultivierter Spinalganglien

mit Suramin zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, vermindertem Wachstum von Neuriten sowie bei längerer Exposition zum Tod der Zellen. Die weitere Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen legte einen durch spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle in der Plasmamembran vermittelten Effekt nahe, konnte jedoch den molekularen Pathomechanismus nicht restlos aufklären (Sun et al. 1996).

Obwohl sich aus den oben angeführten Studien eine Bedeutung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase für die Pathogenese der CIPN ableiten lässt, sind weitere Arbeiten zur Aufklärung molekularer Mechanismen und möglicher Präventionsstrategien unerlässlich. Die Schwierigkeiten bei der Interpretation tierexperimenteller Arbeiten mit dem alleinigen Endpunkt Verhalten unterstreichen darüber hinaus die herausragende Bedeutung geeigneter Endpunkte für präklinische Studien.

### 1.3 Zielstellung

Vor dem Hintergrund des ungelösten medizinischen Problems Chemotherapie induzierter Neuropathien stellt eine weitere Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen einen zentralen Schritt bei der Entwicklung spezifischer therapeutischer bzw. präventiver Behandlungen dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung molekularer Mechanismen, um diese dann in geeigneten Mausmodellen zu validieren und präventive Interventionen zu evaluieren. In den hier zusammengefassten Forschungsarbeiten wurde folgenden, im Kontext der Pathogenese und Prävention Zytostatika induzierter neurotoxischer Nebenwirkungen relevanten Fragen nachgegangen:

- I. Führt Paclitaxel auf Einzelkanalebene zu einer InsP<sub>3</sub>R Modulation? Wie verhalten sich nicht neuronale erregbare Gewebe bei Paclitaxel Exposition und welche Faktoren beeinflussen differentielle Effekte?
- II. Verursacht das Zytostatikum Salinomycin eine Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Homöostase?
  - a. Welche molekularen Mechanismen liegen diesem Effekt zugrunde?
  - b. Welche zellulären Prozesse werden dadurch initiiert?
- III. Ist es möglich Symptome einer sensiblen Neuropathie im Spontanverhalten von Mäusen nachzuweisen?
- IV. Welche Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede bestehen im Hinblick auf die Endpunkte Verhalten, Elektrophysiologie und Histologie in CIPN-Mausmodellen klinisch relevanter Zytostatika?
- V. Kann durch eine gezielte Intervention im Bereich der zellulären Ca<sup>2+</sup> Homöostase die Entwicklung einer CIPN verhindert werden? Hat dies negative Auswirkungen auf die zytostatische Wirksamkeit?

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1 Pathomechanismen im Zellmodell

#### 2.1.1 Paclitaxel verändert die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ Homöostase durch eine NCS-1 abhängige Modulation des $\text{InsP}_3\text{R}$ auf Einzelkanalebene mit gewebespezifischer Aktivierung nachgeordneter Signalwege

Zhang, K., Heidrich, F.M., DeGray, B., **Boehmerle, W.**, Ehrlich, B.E. (2010). „Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the  $\text{InsP}_3\text{R}$ “. J Mol Cell Cardiol. 2010 Nov;49(5):829-35.

In eigenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass in neuronalen Zellen therapeutische Paclitaxelkonzentrationen über einen  $\text{InsP}_3\text{R}$  und NCS-1 abhängigen Mechanismus zu einer  $\text{Ca}^{2+}$  Dyshomöostase mit Aktivierung der Protease Calpain führen (Boehmerle et al. 2006, Boehmerle et al. 2007). Unklar blieb bei diesen Arbeiten jedoch, wieso bei nahezu ubiquitärer Expression von NCS-1 und dem  $\text{InsP}_3\text{R}$  eine prädominante Schädigung im peripheren Nervensystem durch die Paclitaxel Exposition resultiert und ob neben dem  $\text{InsP}_3\text{R}$  und NCS-1 weitere Faktoren für die beobachteten Paclitaxel-induzierten Effekte vorhanden sein müssen. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Inkorporation von  $\text{InsP}_3\text{R}$  in artifizielle Doppellipidmembranen nachgewiesen werden, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit des  $\text{InsP}_3\text{R}$  nach Zugabe des Proteins NCS-1 sowie Paclitaxel sprunghaft stieg. Bei Zugabe der Trägerflüssigkeit anstatt von Paclitaxel bzw. Fehlen von NCS-1 konnte dieser Effekt hingegen nicht induziert werden. Um gewebespezifische Nebenwirkungen des Paclitaxel besser verstehen zu können, untersuchten wir die Auswirkungen einer Paclitaxel Exposition auf Herzmuskelzellen. Hierbei zeigte sich, dass nach einer mehrstündigen Paclitaxel Inkubation die Oszillationsfrequenz spontaner  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillationen in Kardiomyozyten zunahm und eine Verstärkung  $\text{InsP}_3\text{R}$

vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$  Signale nachgewiesen werden konnte. Als molekulares Korrelat zu dieser Beobachtung konnte eine vermehrte NCS-1 Proteinmenge abgegrenzt werden. Dieser im Vergleich zu neuronalen Zellen entgegengesetzte Befund lässt sich am ehesten durch einen verminderten Proteinabbau bedingt durch die vermehrte Bindung des NCS-1 an den  $\text{InsP}_3\text{R}$  und eine sehr viel niedrigere Expression der  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten Protease Calpain in Kardiomyozyten im Vergleich zu neuronalen Zellen erklären. Zusammenfassend führt Paclitaxel in verschiedenen Geweben, durch eine NCS-1 vermittelte Modulation der Öffnungswahrscheinlichkeit des  $\text{InsP}_3\text{R}$ , zu einer Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase, wobei je nach Ausstattung mit  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Effektorproteinen wie zum Beispiel Proteasen gewebespezifisch differente Effekte induziert werden.

Zhang, K., Heidrich, F.M., DeGray, B., Boehmerle, W., Ehrlich, B.E. (2010). Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Nov;49(5):829-35. Epub 2010 Aug 27.  
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.08.018>











## 2.1.2 Salinomycin induziert eine $\text{Ca}^{2+}$ vermittelte bimodale Caspasen Aktivierung in Spinalganglienzellen

**Boehmerle, W.** and Endres, M. "Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death." *Cell death & disease*, (2011), 2: e168

Salinomycin ist aufgrund seiner Wirksamkeit gegen Chemotherapie resistente Zellen bzw. Tumorstammzellen (Gupta et al. 2009) ein aussichtsreicher Kandidat für adjuvante Chemotherapien. Vor dem Hintergrund einer möglichen klinischen Anwendung evaluierten wir in der vorliegenden Arbeit die Toxizität von Salinomycin auf kultivierte murine Spinalganglien. Hierbei konnten bereits nach 8h für Apoptose typische Veränderungen nachgewiesen werden. Da Salinomycin ein Ionophor ist, untersuchten wir durch Salinomycin ausgelöste Veränderungen des intrazellulären ionalen Milieus. Es zeigte sich zunächst eine Erhöhung der zytoplasmatischen  $\text{Na}^+$  Konzentration mit einer nachfolgenden, durch  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiporter vermittelten,  $\text{Ca}^{2+}$  Akkumulation und Depolarisation der Mitochondrien. Diese Prozesse führen zu einer dualen Aktivierung der Initiator-Caspase 9 mittels eines Calpain und Caspase 12 vermittelten Signalwegs einerseits und Cytochrom c Freisetzung aus depolarisierten Mitochondrien andererseits. Über die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 wird dann der apoptotische Zelltod ausgelöst. Die prophylaktische Blockade von  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiportern in der Plasmamembran bzw. den Mitochondrien wies eine zu einer direkten Blockade von Caspase 3 vergleichbare Effektivität auf. Bei Beschränkung auf einen molekularen Mechanismus war die Blockades des mitochondrialen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiporters überlegen, da nicht nur die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Akkumulation reduziert, sondern auch eine mitochondriale Depolarisation und darauf folgende Cytochrom c Freisetzung verhindert wird. Diese Daten unterstreichen die Relevanz einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Dyshomöostase für die Pathogenese toxischer Effekte in Spinalganglienzellen.

Boehmerle, W., & Endres, M. (2011). Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death. *Cell Death and Disease*, 2(6), e168.

doi: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2011.46>



















## 2.2 Tiermodelle der CIPN

### 2.2.1 Automatisierte Ganganalyse als alternativer Endpunkt im CIPN Tiermodell

Huehnchen, P.\*, **Boehmerle, W.\***, Endres M.

„Assessment of paclitaxel induced sensory polyneuropathy with "Catwalk" automated gait analysis in mice.“ PLoS One. 2013 Oct 15;8(10):e76772.

In den vergangenen Jahren wurden unter anderem zur adjuvanten Behandlung von Mammakarzinomen Protokolle für die dosisdichte Chemotherapie entwickelt (Sparano et al. 2008). Dosisdicht bezeichnet dabei die häufigere Gabe eines Zytostatikums mit einer geringeren Einzeldosis. Angesichts fehlender Tiermodelle für diese Therapiestrategie etablierten wir in der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell dosisdichter Paclitaxel-Therapie. Trotz einer hohen kumulativen Gesamtdosis wurde dieses Protokoll von den Tieren gut vertragen und führte zur Ausbildung einer ausgeprägten mechanischen Allodynie, sowie deutlich reduzierter sensibler Nervenaktionspotentiale (SNAP) im Sinne einer sensiblen Neuropathie. Anhand dieses Tiermodells evaluierten wir dann, ob durch eine automatisierte Ganganalyse mittels des sogenannten „Catwalk“ Test Symptome sensibler Neuropathien im Spontanverhalten von Mäusen objektivierbar sind. Bei dieser Methode laufen Mäuse einzeln durch einen abgedunkelten Tunnel zu Ihrem Käfig, wobei ein durch den Pfotendruck ausgelöstes intensitätscodiertes Signal aufgezeichnet und semiautomatisch ausgewertet wird. Hierbei zeigte sich, dass Tiere mit einer sensiblen Neuropathie den Kontakt Ihrer Hinterpfoten zur Unterlage durch eine Verlängerung der Schwung- und Reduktion der Standphasen bzw. Verminderung der Auflagefläche minimierten. Durch eine symptomatische medikamentöse Behandlung besserten sich die Veränderungen im Gangverhalten. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die semiautomatische Ganganalyse als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung sensibler Neuropathien im Mausmodell geeignet ist.

Huehnchen, P., Boehmerle, W., Endres M.

„Assessment of paclitaxel induced sensory polyneuropathy with "Catwalk" automated gait analysis in mice.“

PLoS One. 2013 Oct 15;8(10):e76772.

doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076772>

















## **2.2.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Bortezomib, Cisplatin, Paclitaxel und Vincristin induzierten Neuropathie im Mausmodell**

**Boehmerle, W.\***, Huehnchen, P.\*, Peruzzaro, S., Balkaya, M. and Endres, M. "Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice." *Scientific Reports*, (2014), 4: 6370.

Um der humanen Situation näher zu kommen wurden bereits zahlreiche Tiermodelle der CIPN in verschiedenen Maus und Rattenstämmen beschrieben (Hoke et al. 2014). Zwischen den meisten Studien besteht jedoch eine erhebliche Heterogenität hinsichtlich der verwendeten Endpunkte. Weiterhin wurden bislang kaum Effekte verschiedener Substanzen auf einen Modellorganismus in einer Studie verglichen.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Mausmodellen der Bortezomib-, Cis-Platin-, Paclitaxel- und Vincristin-induzierten Neuropathie in den Endpunkten Verhalten, Elektrophysiologie und Histologie. Alle untersuchten Substanzen führten zu einer axonal sensiblen Neuropathie mit Nachweis einer reduzierten mechanischen Reizschwelle, typischen Gangveränderungen und verminderten SNAP Amplituden der Schwanznerven. Paclitaxel und Cisplatin Therapie führte zudem zu einer Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit. Symptome für eine Neuropathie entwickelten sich schneller in Paclitaxel und Vincristin behandelten Tieren, als unter Bortezomib bzw. Cis-Platin Therapie. Die histologische Analyse des Ischiasnerven zeigte eine Reduktion der Faserdichte, sowie substanzspezifische Schädigungsmuster. Zusammenfassend etabliert und vergleicht diese Arbeit Mausmodelle klinisch häufig CIPN induzierender Substanzen als Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung von Pathomechanismen bzw. zur Etablierung präventiver Strategien.

Boehmerle, W., Huehnchen, P., Peruzzaro, S., Balkaya, M., & Endres, M. (2014). Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Sci. Rep.*, 4, 6370.

doi: <http://dx.doi.org/10.1038/srep06370>

















## 2.3 Prävention toxischer Neuropathien im Tiermodell

### 2.3.1 Prävention der Salinomycin induzierten Neuropathie im Mausmodell

**Boehmerle, W.\***, Muenzfeld, H.\*, Springer, A., Huehnchen, P. and Endres, M. "Specific targeting of neurotoxic side effects and pharmacological profile of the novel cancer stem cell drug salinomycin in mice." *Journal of Molecular Medicine*, (2014), 92(8): 889-900.

Ausgehend von eigenen Befunden zu Pathomechanismen der Salinomycin induzierten Neurotoxizität (Beitrag 2.1.2) stellte sich die Frage nach der Relevanz dieser Befunde *in vivo*. Da bislang nur wenige präklinische Daten zur Sicherheit des Salinomycin vorliegen, untersuchten wir in einem ersten Schritt die Pharmakokinetik und das Nebenwirkungsprofil chronischer intraperitonealer Salinomycininjektionen im Mausmodell. Hierbei zeigte sich, dass Salinomycin eine geringe therapeutische Breite aufweist, eine Dosis von 5mg/kg KG jedoch gut toleriert wurde und zu keinen nachweisbaren laborchemischen oder morphologischen Veränderungen von Herz, Skelettmuskel, Niere bzw. Leber führte. Im peripheren Nervensystem ließ sich eine axonal sensible Neuropathie nachweisen. In einer zweiten Kohorte wurde daraufhin die Effektivität einer präventiven pharmakologischen Inhibition des mitochondrialen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiporters durch die Substanz CGP-37157 untersucht. Hierbei zeigte sich bei ausgezeichneter Verträglichkeit des zusätzlich verabreichten Pharmakons eine mindestens teilweise Prävention der Salinomycin induzierten Neuropathie. Insbesondere strukturelle Veränderungen wie der Verlust myelinisierter Axone bzw. Reduktion der SNAP Amplitude konnten weitgehend verhindert werden, ohne nachweisbaren Wirkverlust in Zelllinien humaner Malignome.

Zusammenfassend demonstriert unsere Arbeit, dass durch eine zielgerichtete pharmakologische Intervention im Mausmodell eine wirksame Prävention der CIPN ohne Verlust der zytostatischen Wirksamkeit erzielt werden kann.

Boehmerle, W., Muenzfeld, H., Springer, A., Huehnchen, P., & Endres, M. (2014). Specific targeting of neurotoxic side effects and pharmacological profile of the novel cancer stem cell drug salinomycin in mice. *Journal of Molecular Medicine*, 92(8), 889–900.

doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-014-1155-0>























### **3. Diskussion**

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten wurde in verschiedenen präklinischen Modellen die Pathogenese, sowie mögliche Präventionsstrategien der CIPN untersucht. Das gewählte methodische Vorgehen erfolgte im Sinne eines translationalen Ansatzes ausgehend von Untersuchungen an einfachen Zellmodellen hin zur Validierung molekularer Kandidaten im Tiermodell.

#### **3.1 Zelluläre Pathomechanismen der CIPN**

Wir untersuchten die pathogenetische Relevanz einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Dyshomöostase im Kontext medikamentös toxischer Neuropathien zunächst mit dem Zytostatikum Paclitaxel. Hierzu existierten bereits publizierte Studien an kultivierten Pankreaszellen (Kidd et al. 2002) und Hirnstammneuronen (Mironov et al. 2005) welche nachweisen konnten, dass Paclitaxel in einer Dosis von 10  $\mu\text{M}$  intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Signale durch eine Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore hervorruft. Diese Dosis liegt jedoch circa eine log 10-Stufe oberhalb publizierter humaner Plasmakonzentrationen (Huizing et al. 1993). In der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y welche als einfaches Modell eines (peripheren) Neurons aufgefasst werden kann (Tovey et al. 2001, Estrada et al. 2006), konnte hingegen bereits für nanomolare Paclitaxelkonzentrationen eine  $\text{InsP}_3\text{R}$  vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung nachgewiesen werden (Boehmerle et al. 2006). In weiteren Arbeiten konnten wir mittels Einzelkanalmessungen zeigen, dass die NCS-1 vermittelte positive Modulation des  $\text{InsP}_3\text{R}$  (Schlecker et al. 2006) durch Paclitaxel in nanomolaren Konzentrationen potenziert wird (Zhang et al. 2010). Die Diskrepanz des beobachteten molekularen Mechanismus zwischen den oben genannten Studien (d.h. Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus Mitochondrien) und eigenen Arbeiten (d.h. Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER) kann auf Unterschieden in den verwendeten Zellmodellen beruhen oder,

wahrscheinlicher, gemäß des bereits 1538 durch Paracelsus formulierten Grundsatzes „*Dosis facit venenum*“ durch den anderen Konzentrationsbereich erklärt sein. Für letztere Annahme spricht, dass mit dem von uns verwendeten Dosisbereich in kultivierten Kardiomyozyten ebenfalls NCS-1 vermittelte Veränderungen InsP<sub>3</sub> vermittelter Ca<sup>2+</sup> Signale nachgewiesen werden konnten (Zhang et al. 2010). Dieser Befund legt angesichts der nahezu ubiquitären InsP<sub>3</sub>R und NCS-1 Expression ein Modell nahe, in dem die InsP<sub>3</sub>R vermittelte Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER durch differentielle Expression Ca<sup>2+</sup> abhängiger Effektorproteine letztlich zu gewebespezifisch höchst unterschiedlichen Effekten führt. Grundsätzlich können Ca<sup>2+</sup> Ionen im Zytoplasma eine Vielzahl von nachgeschalteten, für Plastizität, Trophik aber auch Zelltodinduktion relevante Kaskaden aktivieren (Berridge et al. 1998). Die Regulation so diverser und teilweise konträrer zellulärer Prozesse durch dasselbe Ion setzt eine präzise zeitliche und räumliche Feinabstimmung des Ca<sup>2+</sup> Signals voraus (Berridge et al. 2003). Was dies konkret bedeutet wird durch den Vergleich neuronaler und kardialer Zellen besonders deutlich: Eine mehrstündige Paclitaxel-Inkubation führt in Kardiomyozyten zu einer *Zunahme*, in kultivierten Spinalganglienzellen hingegen zu einer *Verminderung* InsP<sub>3</sub> vermittelter Ca<sup>2+</sup> Signale. Diesem Phänomen liegt sehr wahrscheinlich eine differentielle Expression der Ca<sup>2+</sup> abhängigen Protease Calpain zugrunde, welche in neuronalen Zellen hoch und in kardialen Zellen kaum exprimiert wird (Zhang et al. 2010). Während in Herzmuskelzellen daher nach Paclitaxel Inkubation keine Calpain Aktivierung nachweisbar ist, induziert aktiviertes Calpain in Neuronen durch Spaltung von NCS-1 eine negative Feedbackschleife (Boehmerle et al. 2007). Die Affinität von NCS-1 für Ca<sup>2+</sup> nimmt durch die Calpain vermittelte Spaltung deutlich ab (Blachford et al. 2009). Da NCS-1 nur in der Ca<sup>2+</sup> gebundenen Konformation den InsP<sub>3</sub>R positiv moduliert (Schlecker et al. 2006) resultiert eine verminderte InsP<sub>3</sub> vermittelte Ca<sup>2+</sup> Freisetzung aus dem ER. Dieses Phänomen konnte

sowohl in SH-SY5Y Zellen als auch in kultivierten Spinalganglienzellen nachgewiesen werden, ein Umstand welcher mindestens für ausgewählte Fragestellungen die Validität des SH-SY5Y Zellmodels nahelegt (Boehmerle et al. 2007).

Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei den durch Paclitaxel induzierten molekularen Mechanismen um ein rein substanzspezifisches Phänomen handelt oder eine breitere Bedeutung einer  $\text{Ca}^{2+}$  Dyshomöostase in der Pathogenese toxischer Neuropathien anzunehmen ist, untersuchten wir das Polyether Antibiotikum Salinomycin. Salinomycin wird durch das Bakterium *Streptomyces albus* gebildet und zur Behandlung bzw. Prävention der Kokzidiose in der Nutztierhaltung eingesetzt. Vermehrtes Interesse an einem Einsatz von Salinomycin in der Humanmedizin besteht seit Gupta und Mitarbeiter Salinomycin in einer systematischen Untersuchung von 16000 Substanzen als vielversprechenden Kandidaten für die Bekämpfung von Tumorstammzellen identifizierten (Gupta et al. 2009). Im Kontext der Neuropathieforschung ist Salinomycin ebenfalls von Interesse. So erkrankten 1996 in den Niederlanden zahlreiche Katzen an einer teilweise letalen sensomotorischen axonalen und demyelinisierenden Polyneuropathie, welche durch mit Salinomycin kontaminiertem Katzenfutter ausgelöst wurde (van der Linde-Sipman et al. 1999). Das Auftreten von toxischen Phänomenen im peripheren, jedoch nicht im zentralen Nervensystem vergifteter Katzen ist am ehesten auf die durch das P-Glykoprotein vermittelte Elimination dieser Substanz aus dem ZNS zurückzuführen (Lagas et al. 2008).

Der Wirkmechanismus des Salinomycin beruht auf der Bildung lipophiler Komplexe mit monovalenten Kationen, wodurch diese passiv über biologische Doppellipidmembranen diffundieren können (Mitani et al. 1975). Weitere Untersuchungen an Spinalganglienzellen zeigten einen durch Salinomycin induzierten Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$  Konzentration. Dies führte nachfolgend zu einem  $\text{Ca}^{2+}$

Einstrom welcher durch  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiporter in der Plasmamembran sowie den Mitochondrien vermittelt wird. Durch die erhöhten intrazellulären  $\text{Na}^+$  Konzentrationen arbeiten diese Transportproteine entgegengesetzt zu ihrer physiologischen Wirkrichtung (Boehmerle et al. 2011). Da dies kein elektroneutraler Prozess ist, wird eine Depolarisation der Mitochondrien mit Freisetzung von Cytochrom c induziert. Die erhöhten zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen sind zudem ausreichend um eine Calpain Aktivierung zu vermitteln. Der apoptotische Zelltod in Salinomycin behandelten Neuronen wird somit bimodal aktiviert: einerseits unter Einbeziehung von aus depolarisierten Mitochondrien freigesetztem Cytochrom c welches in einem Komplex mit APAF-1 und dATP die Caspase 9 aktiviert (Pop et al. 2006) und durch mittels Calpain aktivierter Caspase 12 andererseits (Rao et al. 2001). Diese Prozesse führten in unserem Modell nach 8h zu frühen Zeichen der Apoptose, welche durch eine prophylaktische Blockade von  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiportern verhindert werden konnte (Boehmerle et al. 2011).

Zusammenfassend unterstreichen die im Paclitaxel (Boehmerle et al. 2006, Boehmerle et al. 2007, Zhang et al. 2010) und Salinomycin (Boehmerle et al. 2011) Zellmodell erhobenen Befunde die Bedeutung veränderter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen in der Pathogenese der Zytostatika induzierten Neurotoxizität im peripheren Nervensystem. Unsere Experimente mit Salinomycin beleuchten zudem der Calpain Aktivierung nachgelagerte Signalkaskaden und unterstreichen die Rolle der mitochondrialen Dysfunktion in der Induktion des Zelltods peripherer Neurone (Boehmerle et al. 2011). Interessanterweise wird von verschiedenen Autoren die Kombination einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase zusammen mit einer mitochondrialen Fehlfunktion, obwohl sehr wahrscheinlich durch andere Mechanismen verursacht, als ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der diabetischen Neuropathie diskutiert

(Verkhatsky et al. 2008). Auch für genetische Neuropathien gibt es Hinweise, dass Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$  Signaltransduktion von hoher Relevanz sind. So wurde für die hereditäre motorisch-sensible Neuropathie Typ 2C (HMSN 2C, in der Literatur auch als Charcot Marie Tooth Typ 2C bezeichnet) eine „gain-of-function“ Mutation des  $\text{Ca}^{2+}$  permeablen Kationenkanals TRPV4 mit resultierenden Veränderungen der basalen und induzierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen beschrieben (Deng et al. 2010, Landouere et al. 2010, Klein et al. 2011). Klinisch tritt im Rahmen der HMSN 2C eine sensible Neuropathie auf, der Phänotyp wird jedoch von motorischen Ausfällen dominiert. Die Beobachtung einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Dyshomöostase als ursächlichem Faktor in verschiedenen toxischen, metabolischen und genetischen Polyneuropathien legt eine wichtige und eventuell auch allgemeinere pathogenetische Rolle nahe. Sollten weitere Arbeiten diesen Umstand bestätigen, so eröffnet dies neue Perspektiven für die Entwicklung wirksamer Präventions- und Behandlungsstrategien ätiologisch differenter Polyneuropathien.

### **3.2 Geeignete Endpunkte und Modelle in tierexperimentellen Studien der CIPN**

Komplexe Pathophysiologien wie die der CIPN lassen sich nicht vollständig im Zellmodell nachbilden. Bei der Degeneration peripherer Nerven spielt nicht nur die axonale Schädigung, sondern auch die Interaktion neuronaler Strukturen mit Schwannschen Zellen, der Blut-Nerven-Schranke und möglicherweise Immunzellen eine Rolle (zusammengefasst in (Carozzi et al. 2015)). Durch die Etablierung von Tiermodellen der CIPN ergeben sich Möglichkeiten die *in vitro* gewonnenen Daten zu verifizieren und zu erweitern. Wie im Abschnitt 1.2 dargelegt stellt die Auswahl eines geeigneten Tiermodells sowie geeigneter Endpunkte aus der Fülle beschriebener Ansätze (Authier et al. 2009, Hoke et al. 2014) eine Herausforderung dar. Insbesondere die (objektive) Abbildung sensibler Ausfalls- bzw. Reizerscheinungen ist

dabei Gegenstand einer fortgesetzten, teilweise kontroversen Debatte. Auch bei Patienten kursieren zur Verlaufsbeurteilung einer CIPN eine Vielzahl verschiedener Skalen welche sich meist aus einem Fragebogen, körperlichen Untersuchungsbefunden und ggf. apparativen Zusatzuntersuchungen zusammensetzen und spezifische Vor- bzw. Nachteile aufweisen (zusammengefasst in (Park et al. 2013)). In präklinischen Modellen kommen zur Objektivierung sensibler Defizite, aber auch Schmerzen, vorwiegend mechanische und thermische Reizschwellenbestimmungen zum Einsatz. Der Nachteil dieser Methode ist, dass letztlich ein Untersucher einen artifiziellen Reiz appliziert und die Reaktion des Tieres darauf bewertet. Voraussetzung für valide und reproduzierbare Ergebnisse ist daher ein Minimum an Stress für die Tiere, sowie eine vollständige Verblindung des Experimentators. Als objektivere Alternative wurde daher von verschiedenen Gruppen für Tiermodelle einer traumatischen Mononeuropathie eine automatisierte Ganganalyse vorgeschlagen (Vrinten et al. 2003, Deumens et al. 2007, Bozkurt et al. 2008). Wir untersuchten darauf aufbauend in einem Mausmodell mit ausgeprägter sensibler Neuropathie nach dosisdichter Paclitaxeltherapie, ob auch in Tieren mit einer Polyneuropathie spezifische Gangveränderungen nachweisbar sind. Hierbei zeigte sich, dass ähnlich wie bei einer Mononeuropathie Tiere mit einer sensiblen Polyneuropathie den Kontakt Ihrer Hinterpfoten zur Unterlage minimierten (Huehnchen et al. 2013). Im Gegensatz zu einer Mononeuropathie waren die Veränderungen im Paclitaxel Modell jedoch sehr viel geringer ausgeprägt und in Abwesenheit einer internen Kontrolle war eine gut kontrollierte gesunde Vergleichsgruppe unabdingbar. Da sich Gangveränderungen langsamer entwickelten als Veränderungen in der Elektrophysiologie bzw. der mechanischen Reizschwelle liegt der Wert der semiautomatischen Ganganalyse eher in einem objektiven zusätzlichen Endpunkt, denn in einer Alternative zu den vorgenannten Methoden.

Für ein besseres Verständnis von Gemeinsamkeiten bzw. Unterschieden in der Kinetik pathophysiologischer Prozesse im Rahmen der CIPN sollten mehrere Substanzen in einem Tierstamm mit denselben Endpunkten verglichen werden. Trotz der Vielzahl publizierter Modelle existieren bislang nur wenige vergleichende Studien an Tiermodellen: In einer Studie wurden die Substanzen Paclitaxel, Cisplatin, Bortezomib und Epothilon-B untersucht (Carozzi et al. 2010) und in einer weiteren Paclitaxel, Epothilon B und Eribulin (Wozniak et al. 2011). In beiden Studien wurden jeweils BALB/c Mäuse verwendet und im Hinblick auf die Endpunkte Neurophysiologie und Histologie verglichen. Dabei zeigten sich sowohl in Bezug auf die Häufigkeit, als auch die Ausprägung der vorwiegend sensiblen axonalen Neuropathie Unterschiede zwischen den untersuchten Substanzen. Der zeitliche Verlauf wurde bislang hingegen nicht untersucht.

Angesichts einer Vielzahl verfügbarer transgener Mauslinien mit dem C57BL/6 Hintergrund untersuchten wir die Entwicklung einer durch Paclitaxel, Cisplatin, Bortezomib und Vincristin induzierten Neuropathie bezüglich der Endpunkte Verhalten, Neurophysiologie und Histologie in diesem Mausstamm. Die Auswahl der untersuchten Zytostatika erfolgte dabei unter anderem nach der klinischen Relevanz und die Dosis wurde mit dem Ziel minimaler Toxizität gewählt. Im Endpunkt Verhalten wurden sowohl die Untersuchung der mechanischen Reizschwelle als auch spontane Verhaltensänderungen wie Gangmuster und Erkundungsverhalten analysiert. Alle Behandlungsgruppen entwickelten eine messbare, distal betonte, axonal sensible Neuropathie, wobei sich jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede im Hinblick auf die Dynamik und Ausprägung zeigten (Boehmerle et al. 2014). Die Befunde dieser Studie unterstreichen unter anderem erneut die Bedeutung mehrerer Endpunkte zur Beurteilung des klinischen Phänotyps. So war etwa in Bortezomib behandelten Tieren histologisch eine vorwiegende Schädigung dünner myelinisierter Fasern nachweisbar,

ein Befund welcher die Diskrepanz zwischen der raschen Entwicklung einer mechanischen Allodynie einerseits und der nur verhältnismäßig spät elektrophysiologisch nachweisbaren axonalen Schädigung andererseits erklärt. Zur sinnvollen Interpretation tierexperimenteller Studien der CIPN, insbesondere bei präventiven oder therapeutischen Fragestellungen, sollten daher stets neben Verhaltensänderungen auch die Endpunkte Elektrophysiologie und Histologie untersucht werden.

### **3.3 Neue Präventionsstrategien der CIPN**

Vor dem Hintergrund der oben unter 3.1 diskutierten Hinweise für eine wichtige pathophysiologische Rolle einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Dyshomöostase in der Pathogenese Zytostatika induzierter Neurotoxizität stellt sich die Frage nach der Relevanz dieser Daten für die antineoplastische Wirksamkeit, sowie die Übertragbarkeit ins Tiermodell. Um eine erfolgreiche Prävention bzw. frühe Therapie der CIPN auf Basis der erhobenen molekularen Mechanismen entwickeln zu können wäre eine Dissoziation zytostatischer (therapeutischer) und den der CIPN zugrundeliegenden Mechanismen notwendig.

Im Hinblick auf die Paclitaxel induzierte Neuropathie führten in eigenen Arbeiten Experimente mit anderen Mikrotubuli stabilisierenden (Epothilon B) oder destabilisierenden (Colchicin) Pharmaka zu keiner signifikanten Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung (Boehmerle et al. 2007). Diese Daten sind interessant, da Epothilon B in klinischen Studien seltener neurotoxische Nebenwirkungen verursachte (Bollag et al. 1995, Goodin et al. 2004). Unter Berücksichtigung eines vergleichbaren Wirkmechanismus bedeutet dies möglicherweise, dass eine gestörte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurotoxischer Nebenwirkungen durch Paclitaxel spielt, sehr wahrscheinlich für die zytostatische

Wirkung aber wenig oder nicht bedeutsam ist. Stellt die Paclitaxel induzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Dyshomöostase auch *in vivo* einen pathogenetisch relevanten Mechanismus dar, so sollte die Inhibition der NCS-1 –  $\text{InsP}_3\text{R}$  Interaktion oder die der  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung nachgelagerte Calpain Aktivierung vor der Entwicklung einer Paclitaxel induzierten Neuropathie schützen. Für beide Ansätze finden sich in der Literatur positive Studien: Wang und Kollegen gelang es durch Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Protease Calpain, bei erhaltener zytostatischer Aktivität, eine Paclitaxel induzierte Neuropathie in C57BL/6 Mäusen in den Endpunkte, Verhalten, Elektrophysiologie und Histologie zu verhindern (Wang et al. 2004). Für die Lithium vermittelte Inhibition der NCS-1 –  $\text{InsP}_3\text{R}$  Interaktion (Schlecker et al. 2006) konnten mehrere Gruppen eine präventive Wirkung im Ratten- (Pourmohammadi et al. 2012) bzw. Mausmodell (Mo et al. 2012) der Paclitaxel induzierten Neuropathie zeigen. In letzterer Studie war zudem kein negativer Effekt auf die antiproliferativen Eigenschaften von Paclitaxel nachweisbar. Im Hinblick auf eine Prävention der durch Salinomycin induzierten Neuropathie lässt sich die Frage, ob sich die Genese der neurotoxischen Nebenwirkungen von dem Wirkprinzip gegen Tumorstammzellen unterscheidet angesichts des noch nicht vollständig aufgeklärten Wirkmechanismus nicht abschließend beantworten. Bisher publizierte Befunde beschreiben unter anderem eine verminderte Expression von mit Stammzellen assoziierten Genen und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie Cadherinen (Gupta et al. 2009). Dies legt den Schluss nahe, dass Salinomycin in Tumorstammzellen eine terminale epitheliale Differenzierung mit anschließender Terminierung des Zellzyklus induziert (Naujokat et al. 2012). Damit wäre ein von den in Spinalganglien beobachteten direkten zytotoxischen Effekten abweichender Mechanismus für eine zielgerichtete neuroprotektive Interventionen gegeben. Wir untersuchten daher die Effektivität einer prophylaktischen Inhibition des mitochondrialen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauschers im Mausmodell der Salinomycin induzierten

Neuropathie. Dabei zeigte sich eine effektive Prävention, insbesondere struktureller Veränderungen, bei erhaltener zytostatischer Aktivität (Boehmerle et al. 2014).

Zusammengefasst unterstreichen die im Paclitaxel und Salinomycin Tiermodell erhobenen Befunde die Relevanz einer veränderten  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase als molekularem Ansatzpunkt für die Entwicklung wirksamer CIPN Präventionsstrategien bei erhaltener zytostatischer Aktivität. Weitere Experimente sind jedoch notwendig um die Relevanz dieser Daten für andere Substanzen abschätzen zu können.

#### **4. Zusammenfassung**

Das Verständnis molekularer Mechanismen in der Pathogenese der CIPN stellt die Grundvoraussetzung für die Entwicklung therapeutischer und präventiver Interventionen mit dem Ziel der klinischen Translation dar. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten konnten für die Substanzen Paclitaxel und Salinomycin Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase, gefolgt von einer  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Proteasen und Caspasen Aktivierung in neuronalen Zellen nachgewiesen werden. Den Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase liegt dabei kein singulärer Mechanismus zugrunde, vielmehr konvergieren verschiedene auslösende Faktoren auf einen gemeinsamen Effektormechanismus.

Zur weiteren Untersuchung pathophysiologischer Prozesse aber auch zur Entwicklung zielgerichteter Therapie- bzw. Präventionsstrategien scheinen Mausmodelle auf dem C57Bl/6 Hintergrund geeignet. Wir etablierten in eigenen Arbeiten für Paclitaxel, Cis-Platin, Bortezomib, Vincristin und Salinomycin in diesem Mausstamm CIPN Modelle und charakterisierten Veränderungen in den Endpunkten Verhalten, Neurophysiologie und Histologie. Dabei konnte die Eignung der semiautomatischen Ganganalyse zur Beurteilung sensibler Neuropathien im Mausmodell nachgewiesen werden.

Auf diesen Vorarbeiten aufbauend wurde für Salinomycin im Mausmodell eine neue zielgerichtete prophylaktische Therapiestrategie bei erhaltener zytostatischer Wirkung entwickelt. Publierte Studien zu Tiermodellen der Paclitaxel induzierten Neuropathie legen auch für diese Substanz spezifische Präventionsmöglichkeiten durch Verhinderung einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Dyshomöostase nahe.

Zusammenfassend verdichten sich die Hinweise, dass zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Signale, bzw. daran beteiligte Proteine, einen wichtigen molekularen Ansatzpunkt zur spezifischen Prävention Zytostatika induzierter neurotoxischer Nebenwirkungen darstellen.

## 5. Literaturangaben

- Alessandri-Haber, N., O. A. Dina, E. K. Joseph, D. B. Reichling and J. D. Levine (2008). "Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia." J Neurosci **28**(5): 1046-1057.
- Alessandri-Haber, N., O. A. Dina, J. J. Yeh, C. A. Parada, D. B. Reichling and J. D. Levine (2004). "Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat." J Neurosci. **24**(18): 4444-4452.
- Argyriou, A. A., A. P. Kyritsis, T. Makatsoris and H. P. Kalofonos (2014). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature." Cancer Manag Res **6**: 135-147.
- Authier, N., D. Balayssac, F. Marchand, B. Ling, A. Zangarelli, J. Descoeur, F. Coudore, E. Bourinet and A. Eschalier (2009). "Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies." Neurotherapeutics **6**(4): 620-629.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and P. Lipp (1998). "Calcium--a life and death signal." Nature **395**(6703): 645-648.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.
- Blachford, C., A. Celic, E. T. Petri and B. E. Ehrlich (2009). "Discrete proteolysis of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) by mu-calpain disrupts calcium binding." Cell Calcium **46**(4): 257-262.
- Boehmerle, W. and M. Endres (2011). "Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death." Cell Death Dis **2**: e168.
- Boehmerle, W., P. Huehnchen and M. Endres (2015). "[Chemotherapy-induced neuropathy]." Nervenarzt **86**(2): 156-160.
- Boehmerle, W., P. Huehnchen, S. Peruzzaro, M. Balkaya and M. Endres (2014). "Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice." Sci Rep **4**: 6370.
- Boehmerle, W., H. Muenzfeld, A. Springer, P. Huehnchen and M. Endres (2014). "Specific targeting of neurotoxic side effects and pharmacological profile of the novel cancer stem cell drug salinomycin in mice." J Mol Med (Berl) **92**(8): 889-900.
- Boehmerle, W., U. Splittgerber, M. B. Lazarus, K. M. McKenzie, D. G. Johnston, D. J. Austin and B. E. Ehrlich (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): 18356-18361.
- Boehmerle, W., K. Zhang, M. Sivula, F. M. Heidrich, Y. Lee, S. E. Jordt and B. E. Ehrlich (2007). "Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(26): 11103-11108.
- Bollag, D. M., P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides and C. M. Woods (1995). "Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action." Cancer Res. **55**(11): 2325-2333.
- Bozkurt, A., R. Deumens, J. Scheffel, D. M. O'Dey, J. Weis, E. A. Joosten, T. Fuhrmann, G. A. Brook and N. Pallua (2008). "CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury." J Neurosci Methods **173**(1): 91-98.

Caccia, M. R., B. Comotti, E. Ubiali and A. Lucchetti (1977). "Vincristine polyneuropathy in man. A clinical and electrophysiological study." J Neurol **216**(1): 21-26.

Carozzi, V. A., A. Canta and A. Chiorazzi (2015). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms?" Neurosci Lett **596**: 90-107.

Carozzi, V. A., A. Canta, N. Oggioni, B. Sala, A. Chiorazzi, C. Meregalli, M. Bossi, P. Marmioli and G. Cavaletti (2010). "Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies." Exp Neurol **226**(2): 301-309.

Chen, Y., C. Yang and Z. J. Wang (2011). "Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain." Neuroscience **193**: 440-451.

Deng, H. X., C. J. Klein, J. Yan, Y. Shi, Y. Wu, F. Fecto, H. J. Yau, Y. Yang, H. Zhai, N. Siddique, E. T. Hedley-Whyte, R. DeLong, M. Martina, P. J. Dyck and T. Siddique (2010). "Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4." Nat Genet **42**(2): 165-169.

Deumens, R., R. J. Jaken, M. A. Marcus and E. A. Joosten (2007). "The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection." J Neurosci Methods **164**(1): 120-130.

Estrada, M., P. Uhlen and B. E. Ehrlich (2006). "Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth." J Cell Sci. **119**(Pt 4): 733-743. Epub 2006 Jan 2031.

Flatters, S. J. and G. J. Bennett (2004). "Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy." Pain. **109**(1-2): 150-161.

Goodin, S., M. P. Kane and E. H. Rubin (2004). "Epothilones: mechanism of action and biologic activity." J Clin Oncol. **22**(10): 2015-2025.

Gupta, P. B., T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg and E. S. Lander (2009). "Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening." Cell **138**(4): 645-659.

Hershman, D. L., C. Lacchetti, R. H. Dworkin, E. M. Lavoie Smith, J. Bleeker, G. Cavaletti, C. Chauhan, P. Gavin, A. Lavino, M. B. Lustberg, J. Paice, B. Schneider, M. L. Smith, T. Smith, S. Terstriep, N. Wagner-Johnston, K. Bak, C. L. Loprinzi and O. American Society of Clinical (2014). "Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline." J Clin Oncol **32**(18): 1941-1967.

Hoke, A. and M. Ray (2014). "Rodent models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy." ILAR J **54**(3): 273-281.

Huehnchen, P., W. Boehmerle and M. Endres (2013). "Assessment of Paclitaxel induced sensory polyneuropathy with "catwalk" automated gait analysis in mice." PLoS One **8**(10): e76772.

Huizing, M. T., A. C. Keung, H. Rosing, V. van der Kuy, W. W. ten Bokkel Huinink, I. M. Mandjes, A. C. Dubbelman, H. M. Pinedo and J. H. Beijnen (1993). "Pharmacokinetics of paclitaxel and metabolites in a randomized comparative study in platinum-pretreated ovarian cancer patients." J Clin Oncol. **11**(11): 2127-2135.

Kidd, J. F., M. F. Pilkington, M. J. Schell, K. E. Fogarty, J. N. Skepper, C. W. Taylor and P. Thorn (2002). "Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore." J Biol Chem. **277**(8): 6504-6510. Epub 2001 Nov 6527.

Klein, C. J., Y. Shi, F. Fecto, M. Donaghy, G. Nicholson, M. E. McEntagart, A. H. Crosby, Y. Wu, H. Lou, K. M. McEvoy, T. Siddique, H. X. Deng and P. J. Dyck (2011). "TRPV4 mutations and cytotoxic hypercalcemia in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies." Neurology **76**(10): 887-894.

- Krarup-Hansen, A., S. Helweg-Larsen, H. Schmalbruch, M. Rorth and C. Krarup (2007). "Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies." Brain. **130**(Pt 4): 1076-1088. Epub 2007 Feb 1014.
- Lagas, J. S., R. W. Sparidans, R. A. van Waterschoot, E. Wagenaar, J. H. Beijnen and A. H. Schinkel (2008). "P-glycoprotein limits oral availability, brain penetration, and toxicity of an anionic drug, the antibiotic salinomycin." Antimicrob Agents Chemother **52**(3): 1034-1039.
- Landouere, G., A. A. Zdebik, T. L. Martinez, B. G. Burnett, H. C. Stanescu, H. Inada, Y. Shi, A. A. Taye, L. Kong, C. H. Munns, S. S. Choo, C. B. Phelps, R. Paudel, H. Houlden, C. L. Ludlow, M. J. Caterina, R. Gaudet, R. Kleta, K. H. Fischbeck and C. J. Sumner (2010). "Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C." Nat Genet **42**(2): 170-174.
- Materazzi, S., C. Fusi, S. Benemei, P. Pedretti, R. Patacchini, B. Nilius, J. Prenen, C. Creminon, P. Geppetti and R. Nassini (2012). "TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism." Pflugers Arch **463**(4): 561-569.
- Mironov, S. L., M. V. Ivannikov and M. Johansson (2005). "[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum in neurons is regulated by microtubules. From mitochondrial permeability transition pore to Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release." J Biol Chem. **280**(1): 715-721. Epub 2004 Oct 2029.
- Mitani, M., T. Yamanishi and Y. Miyazaki (1975). "Salinomycin: a new monovalent cation ionophore." Biochem Biophys Res Commun **66**(4): 1231-1236.
- Mo, M., I. Erdelyi, K. Szigeti-Buck, J. H. Benbow and B. E. Ehrlich (2012). "Prevention of paclitaxel-induced peripheral neuropathy by lithium pretreatment." FASEB J **26**(11): 4696-4709.
- Moreau, P., H. Pylypenko, S. Grosicki, I. Karamanesht, X. Leleu, M. Grishunina, G. Rekhman, Z. Masliak, T. Robak, A. Shubina, B. Arnulf, M. Kropff, J. Cavet, D. L. Esseltine, H. Feng, S. Girgis, H. van de Velde, W. Deraedt and J. L. Harousseau (2011). "Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study." Lancet Oncol **12**(5): 431-440.
- Naujokat, C. and R. Steinhart (2012). "Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells." J Biomed Biotechnol **2012**: 950658.
- Park, S. B., D. Goldstein, A. V. Krishnan, C. S. Lin, M. L. Friedlander, J. Cassidy, M. Koltzenburg and M. C. Kiernan (2013). "Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis." CA Cancer J Clin **63**(6): 419-437.
- Pop, C., J. Timmer, S. Sperandio and G. S. Salvesen (2006). "The apoptosome activates caspase-9 by dimerization." Mol Cell **22**(2): 269-275.
- Postma, T. J., J. B. Vermorcken, A. J. Liefing, H. M. Pinedo and J. J. Heimans (1995). "Paclitaxel-induced neuropathy." Ann Oncol **6**(5): 489-494.
- Pourmohammadi, N., H. Alimoradi, S. E. Mehr, G. Hassanzadeh, M. R. Hadian, M. Sharifzadeh, A. Bakhtiarian and A. R. Dehpour (2012). "Lithium attenuates peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats." Basic Clin Pharmacol Toxicol **110**(3): 231-237.
- Rao, R. V., E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L. M. Ellerby, H. M. Ellerby and D. E. Bredesen (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." J Biol Chem **276**(36): 33869-33874.
- Richardson, P. G., B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, S. Jagannath, D. Irwin, S. V. Rajkumar, G. Srkalovic, M. Alsina, R. Alexanian, D. Siegel, R. Z. Orlowski, D. Kuter, S. A. Limentani, S. Lee, T. Hideshima, D. L. Esseltine, M. Kauffman, J. Adams, D. P. Schenkein and K. C. Anderson (2003). "A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma." N Engl J Med. **348**(26): 2609-2617.

Schlecker, C., W. Boehmerle, A. Jeromin, B. DeGray, A. Varshney, Y. Sharma, K. Szigeti-Buck and B. E. Ehrlich (2006). "Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium." The Journal of clinical investigation **116**(6): 1668-1674.

Siau, C. and G. J. Bennett (2006). "Dysregulation of cellular calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy." Anesth Analg. **102**(5): 1485-1490.

Smith, S. B., S. E. Cramer and J. S. Mogil (2004). "Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains." Life Sci **74**(21): 2593-2604.

Sparano, J. A., M. Wang, S. Martino, V. Jones, E. A. Perez, T. Saphner, A. C. Wolff, G. W. Sledge, Jr., W. C. Wood and N. E. Davidson (2008). "Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer." N Engl J Med **358**(16): 1663-1671.

Sun, X. and A. J. Windebank (1996). "Calcium in suramin-induced rat sensory neuron toxicity in vitro." Brain Res **742**(1-2): 149-156.

Tovey, S. C., P. de Smet, P. Lipp, D. Thomas, K. W. Young, L. Missiaen, H. De Smedt, J. B. Parys, M. J. Berridge, J. Thuring, A. Holmes and M. D. Bootman (2001). "Calcium puffs are generic InsP(3)-activated elementary calcium signals and are downregulated by prolonged hormonal stimulation to inhibit cellular calcium responses." J Cell Sci. **114**(Pt 22): 3979-3989.

van der Linde-Sipman, J. S., T. S. van den Ingh, J. J. van nes, H. Verhagen, J. G. Kersten, A. C. Beynen and R. Plekkringa (1999). "Salinomycin-induced polyneuropathy in cats: morphologic and epidemiologic data." Vet Pathol **36**(2): 152-156.

Verkhatsky, A. and P. Fernyhough (2008). "Mitochondrial malfunction and Ca<sup>2+</sup> dyshomeostasis drive neuronal pathology in diabetes." Cell Calcium **44**(1): 112-122.

Vrinten, D. H. and F. F. Hamers (2003). "'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing." Pain **102**(1-2): 203-209.

Wang, M. S., A. A. Davis, D. G. Culver, Q. Wang, J. C. Powers and J. D. Glass (2004). "Calpain inhibition protects against Taxol-induced sensory neuropathy." Brain. **127**(Pt 3): 671-679. Epub 2004 Feb 2004.

Wozniak, K. M., K. Nomoto, R. G. Lapidus, Y. Wu, V. Carozzi, G. Cavaletti, K. Hayakawa, S. Hosokawa, M. J. Towle, B. A. Littlefield and B. S. Slusher (2011). "Comparison of neuropathy-inducing effects of eribulin mesylate, paclitaxel, and ixabepilone in mice." Cancer Res **71**(11): 3952-3962.

Zhang, K., F. M. Heidrich, B. DeGray, W. Boehmerle and B. E. Ehrlich (2010). "Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R." Journal of molecular and cellular cardiology **49**(5): 829-835.

## 5.1. Referenzen der dieser Arbeit zugrundeliegenden Originalarbeiten

1. Zhang, K., Heidrich, F. M., DeGray, B., **Boehmerle, W.** and Ehrlich, B. E. "Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R." *Journal of molecular and cellular cardiology*, (2010), 49(5): 829-835.
2. **Boehmerle, W.** and Endres, M. "Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death." *Cell death & disease*,
3. Huehnchen, P.\*, **Boehmerle, W.\*** and Endres, M. "Assessment of Paclitaxel induced sensory polyneuropathy with "catwalk" automated gait analysis in mice." *PLoS One*, (2013), 8(10): e76772.
4. **Boehmerle, W.\***, Huehnchen, P.\*, Peruzzaro, S., Balkaya, M. and Endres, M. "Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice." *Sci Rep*, (2014), 4: 6370.
5. **Boehmerle, W.\***, Muenzfeld, H.\*, Springer, A., Huehnchen, P. and Endres, M. "Specific targeting of neurotoxic side effects and pharmacological profile of the novel cancer stem cell drug salinomycin in mice." *Journal of Molecular Medicine*, (2014), 92(8): 889-900.

## **6. Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. Barbara Ehrlich und Prof. Dr. Matthias Endres für die umfassende und kontinuierliche Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl für die Möglichkeit in der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité Projekte zu realisieren.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Endres für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Ohne die vielfältige Unterstützung meiner Familie wäre diese Arbeit nie realisiert worden.

## 7. Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

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

Berlin, den 21.08.2015

---

(Wolfgang Böhmerle)