

Neurotoxische und neuroprotektive Mechanismen Cisplatin-induzierter Polyneuropathien

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Markus Leo, M.Sc.

aus Castrop-Rauxel

Dezember 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden an der Klinik für Neurologie in der Arbeitsgruppe Experimentelle Schmerzforschung der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter: PD Dr. med. Tim Hagenacker

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Jürgen Thomale

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Herbert de Groot

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hynek Burda

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2016

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis	7
II Abbildungsverzeichnis	10
III Tabellenverzeichnis.....	12
1. Einleitung	13
1.1 Platin-haltige Zytostatika	13
1.1.1 Cisplatin.....	14
1.1.2 Zytostatische Wirkung von Cisplatin.....	14
1.2 Neurotoxizität	16
1.2.1 Cisplatin-Neurotoxizität.....	17
1.2.2 Calcium-vermittelte Apoptose.....	18
1.3 Polyneuropathien	20
1.3.1 Chemotherapie-induzierte Polyneuropathien	21
1.3.2 Neuropathischer Schmerz	22
1.4 Spannungsabhängige Calciumkanäle.....	23
1.4.1 Subtypen von VGCC	25
1.4.1.1 L-Typ	26
1.4.1.2 P-/Q-Typ.....	26
1.4.1.3 N-Typ.....	26
1.4.1.4 T-Typ.....	27
1.4.2 Die Rolle von VGCC-Subtypen bei Polyneuropathien und neuropathischen Schmerzen	28
1.5 Hypothese der vorliegenden Arbeit.....	29
1.6 Zielsetzung.....	31
2. Material und Methoden.....	32
2.1 Verwendete Geräte.....	32
2.2 Chemikalien	33
2.3 Verbrauchsmaterialien	35
2.4 Antikörper.....	36

2.5 Reagenzien für die Verwendung in der Immunozytochemie/Immunohistochemie	37
2.6 Puffer, Lösungen und Medien	38
2.6.1 Medien und Lösungen für Zellkulturen	38
2.6.2 Lösungen für die elektrophysiologischen Untersuchungen	38
2.6.3 Lösungen und Puffer für die Immunozytochemie/Immunohistochemie	39
2.7 Versuchstiere	40
2.8 Zellkultur	40
2.8.1 Präparation und Kultivierung von DRG-Neuronen.....	41
2.8.2 DRG-Neuronen Kulturen aus <i>in vivo</i> behandelten Tieren.....	41
2.9 Elektrophysiologie	41
2.9.1 Patch-Clamp.....	42
2.9.2 Patch-Clamp Stand	43
2.9.3 Zellkulturen für die Patch-Clamp-Messung von $I_{Ca(V)}$	44
2.9.4 Patch-Clamp Messungen von $I_{Ca(V)}$	44
2.9.5 Patch-Clamp Protokolle.....	45
2.9.6 Auswertung der Patch-Clamp Messungen	46
2.10 Immunozyto- und immunohistochemische Färbungen.....	47
2.10.1 Zellkulturen für immunozytochemische (ICC) Färbungen nach Cisplatin- Inkubation.....	47
2.10.2 Anfertigung von Kryoschnitten für die immunohistochemischen (IHC) Färbungen nach <i>in vivo</i> Cisplatin-Applikation.....	47
2.10.3 Immunozytochemische Färbungen.....	48
2.10.4 Immunohistochemische Färbungen.....	49
2.10.5 Immunozytischer Assay (ICA) zur Darstellung von Platin/DNA-Addukten	50
2.10.6 Auswertung der ICC und IHC	51
2.10.7 Auswertung der ICA	51
2.11 Testungen des Schmerz-assoziierten und motorischen Verhaltens	52
2.11.1 Behandlung- und Zeitverlaufsschema	52

2.11.2 Rotarod.....	53
2.11.3 Testung der taktilen Allodynie.....	53
2.11.4 Testung der Hitze-Hyperalgesie	54
2.11.5 Auswertung der Verhaltenstestungen.....	56
3. Ergebnisse	58
3.1 Modulation von $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neuronen durch Cisplatin	58
3.1.1 Zeitverlauf von $I_{Ca(V)}$	58
3.1.2 IV von $I_{Ca(V)}$	61
3.2 Aktivitätsabhängigkeit des Effekts von Cisplatin auf $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neuronen	62
3.3 Modulation von $I_{Ca(V)}$ von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen durch Cisplatin	62
3.3.1 Zeitverlauf von $I_{Ca(V)}$ von VGCC-Subtypen	63
3.3.2 IV von $I_{Ca(V)}$ von VGCC-Subtypen.....	65
3.4 Modulation von $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Exposition	67
3.5 Modulation von $I_{Ca(V)}$ von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Exposition.....	69
3.6 Einfluss einer einmaligen <i>in vivo</i> Cisplatin-Applikation auf $I_{Ca(V)}$ und N-Typ $I_{Ca(V)}$	71
3.7 Einfluss von Proteinkinase C auf Regulation von N-Typ $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Applikation	73
3.8 Einfluss von Calmodulinkinase II auf die Erhöhung der N-Typ VGCC Stromdichten kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Exposition.....	74
3.9 Einfluss von Cisplatin-Expositionen auf das Proteinlevel von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen.....	75
3.10 Einfluss von <i>in vivo</i> Cisplatin-Applikationen auf das Proteinlevel von N-Typ VGCC in DRG-Neuronen	78
3.11 Einfluss von Cisplatin und ω -Conotoxin auf die Apoptoserate kultivierter DRG-Neuronen	79
3.12 Schmerz-assoziiertes und motorisches Verhalten nach repetitiver Cisplatin-Applikation	82
3.12.1 Testung des motorischen Verhaltens nach repetitiver Cisplatin-Applikation	82
3.12.2 Testung der Thermhyperalgesie nach repetitiver Cisplatin-Applikation ..	83
3.12.3 Testung der taktilen Allodynie nach repetitiver Cisplatin-Applikation.....	85

3.13 Proteinlevel von N-Typ VGCC nach repetitiver Cisplatin- und ω -Conotoxin-Applikation	86
3.14 Nachweis von Cisplatin/DNA-Addukten in DRG-Neuronen nach repetitiver <i>in vivo</i> Cisplatin-Applikation	88
4. Diskussion	89
4.1 Modulation von VGCC durch Cisplatin.....	89
4.2 Modulation von VGCC-Subtypen durch Cisplatin	92
4.2.1 Modulation von L-Typ VGCC durch Cisplatin	92
4.2.2 Modulation von P-/Q-Typ VGCC durch Cisplatin.....	93
4.2.3 Modulation von T-Typ VGCC nach Cisplatin	93
4.2.4 Modulation von N-Typ VGCC nach Cisplatin.....	94
4.2.5 Regulation von VGCC-Subtypen durch Cisplatin	96
4.3 Einfluss von Cisplatin und ω -Conotoxin auf die Apoptose von DRG-Neuronen	99
4.4 Einfluss von Cisplatin und ω -Conotoxin auf das Schmerz-assoziierte und motorische Verhalten	101
4.5 Platin-Addukte vs. Störung der Calciumhomöostase	103
4.6 Ausblick.....	104
5. Zusammenfassung	106
6. Literaturverzeichnis.....	108
7. Danksagung	124
8. Publikationen, Poster und Vorträge.....	125
9. Lebenslauf.....	128
10. Erklärungen.....	128

I Abkürzungsverzeichnis

A	A549 Zellen	Humane Lungentumorzellen	
	Abb.	Abbildung	
	AK	Antikörper	
B	BaCl ₂	Bariumchlorid	
	Bax	BCL2-assoziiertes X Protein	
	Bcl-2	engl. B-cell lymphoma 2	
	BGC823 Zellen	engl. human gastric cancer cell line	
	A. bidest.	bidestilliertes Wasser	
C	BSA	Bovines Serumalbumin	
	°C	Grad Celsius	
	Cav	spannungsabhängiger Calciumkanal	
	CCCES	Calcium Channel Current External Solution	
	CCI	Chronic constriction Injury	
	CDDP	Cis-Diammindichloridoplatin	
	ced-9	Caenorhabditis elegans Gen 9	
	<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans	
	CIDP	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie	
	CIN	Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie	
	CO ₂	Kohlenstoffdioxid	
	CTCF	Corrected total cell fluorescence	
	CsCl	Cäsiumchlorid	
	Cy	Cyanine	
	D	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
		DMSO	Dimethylsulfoxid
		DNA	engl. Deoxyribonucleic acid
DRG		engl. Dorsal root ganglion (Spinalganglion)	
E	<i>E. coli</i>	Escherichia coli	
	EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	
	EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	
H	ER	Endoplasmatisches Retikulum	
	h	Stunde	

	HeLa-S3 Zellen	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
	H ₂ O	Wasser
	HS	Horse Serum
	HVA	High voltage activating
I	IASP	International Association for the Study of Pain
	I _{Ca(V)}	VGCC-Ströme
	ICC	Immunozytochemische Färbung
	ICH	Immunohistochemische Färbung
	InsP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
	i.p.	Intraperitoneal
	IP ₃	Inositoltrisphosphat
	IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor
	ISCC	Internal Solution for Calcium Currents
	ISO	International Organisation for Standardisation
	i.v.	Intravenös
	IV	Strom-Spannungs-Kurve
K	KCl	Kaliumchlorid
	kDa	Kilodalton
	KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	LVA	Low voltage activating
M	µg	Mikrogramm
	µl	Mikroliter
	µM	Mikromol
	M	Molare Masse
	m ²	Quadratmeter
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
	Min.	Minuten
	Mm	Millimeter
	MΩ	Megaohm
	Ms.	Millisekunde
	mtDNA	Mitochondriale DNA
	mV	Millivolt
N	N	Stichprobenmenge

	nA	Nanoampere
	nF	Nanofarad
	NaCl	Natriumchlorid
	Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
	NaV	spannungsaktivierte Natriumkanäle
	NGF	Nerve Growth Factor
P	P	Signifikanzwert
	pA	Pikoampere
	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
	PBS/T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
	PFA	Paraformaldehyd
	PNS	peripheres Nervensystem
	Rpm.	Umdrehungen pro Minute
S	SEM	Standard Error of Mean
T	Tab.	Tabelle
	TBS	Tris-Puffer
	TEA-Cl	Tetraethylammoniumchlorid
	(TEA-OH)	Tetraethylammoniumhydroxid
	TTX	Tetrodotoxin
U	U	Unit
	UE	Untereinheit
	U2OS	Human osteosarcoma Zelllinie
V	VGCC	spannungsaktivierte Calciumkanäle
W	WHO	Weltgesundheitsorganisation
Z	ZNS	Zentrales Nervensystem

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Chemische Struktur von Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin).....	15
Abb. 2 Aktivierung und Adduktbildung von Cisplatin.....	16
Abb. 3 Calcium-vermittelte Apoptose.....	19
Abb. 4 Funktionen von spannungsabhängigen Calciumkanälen.....	24
Abb. 5 Struktur spannungsabhängiger Calciumkanäle.....	25
Abb. 6 Hypothese zur Entstehung von Cisplatin-induzierten Polyneuropathien.....	30
Abb. 7 Verschiedene Konfigurationen der Patch-Clamp Technik zur Ableitung von Ionenkanalströmen.....	43
Abb. 8 Patch-Clamp Stand.....	44
Abb. 9 Behandlungs- und Zeitverlaufsschema der Testungen des Schmerzassoziierten Verhaltens nach Applikation von Cisplatin und ω -Conotoxin <i>in vivo</i>	53
Abb. 10 Testung der taktilen Allodynie.....	54
Abb. 11 Areal zur Testung der taktilen Allodynie und der Hitze-Hyperalgesie.....	55
Abb. 12 Aufbau zur Testung der Hitze-Hyperalgesie.....	55
Abb. 13 Beispielhafte Darstellung von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen vor und nach Applikation verschiedener Konzentrationen von Cisplatin.....	58
Abb. 14 Zeitverlauf von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen nach wiederholter Depolarisation auf 0 mV und Applikation von Cisplatin.....	59
Abb. 15 Prozentuale Blockade/Reduktion von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen nach Applikation von Cisplatin.....	60
Abb. 16 Strom-Spannungs-Kurven von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen vor und nach Applikation von Cisplatin.....	61
Abb. 17 Use-Dependency des Cisplatin-Effekts auf $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen.....	62
Abb. 18 Beispielströme von $I_{Ca(V)}$ durch VGCC-Subtypen in kultivierten DRG-Neuronen vor und nach Applikation von 0,5 μ M Cisplatin.....	63
Abb. 19 Zeitverläufe von $I_{Ca(V)}$ durch VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen nach wiederholter Depolarisation von -80 mV auf 0 mV, vor und nach Applikation von 0,5 μ M Cisplatin.....	64
Abb. 20 Modulation der $I_{Ca(V)}$ durch VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen nach Applikation von 0,5 μ M Cisplatin.....	65

Abb. 21 Strom-Spannungs-Kurven (IV) von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen vor und nach Applikation von Cisplatin.	66
Abb. 22 Modulation der Stromdichte von VGCC kultivierter DRG-Neuronen durch langzeitige Cisplatin-Exposition.	68
Abb. 23 Strom-Spannungskennlinien $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neurone nach Exposition mit 0,5 μ M bzw 5 μ M Cisplatin für 24 h.	69
Abb. 24 Modulation der Stromdichte von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Exposition.	71
Abb. 25 Modulation von VGCC Stromdichten nach <i>in vivo</i> Cisplatin-Applikation.	72
Abb. 26 Modulation der N-Typ VGCC Stromdichten nach <i>in vivo</i> Cisplatin-Applikation.	72
Abb. 27 Einfluss von PKC auf die Ströme von N-Typ VGCC kultivierter DRG-Neurone nach Cisplatin-Applikation.	73
Abb. 28 Einfluss der CaMK II auf die Erhöhung der N-Typ VGCC Stromdichte von kultivierten DRG-Neuronen nach 24 h Cisplatin-Exposition.	75
Abb. 29 Relatives Proteinlevel von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neurone nach Exposition mit 0,5 μ M Cisplatin für 24 h.	77
Abb. 30 Relatives N-Typ VGCC Proteinlevel in DRG-Neuronen nach <i>in vivo</i> Cisplatin-Applikationen.	79
Abb. 31 Einfluss von Cisplatin auf die Aktivierung von Caspase-3 in kultivierten DRG-Neurone.	81
Abb. 32 Einfluss von repetitiver Cisplatin-Applikation auf das motorische Verhalten.	83
Abb 33 Thermhyperalgesie-Messung nach repetitiver Cisplatin-Applikation.	84
Abb. 34 Testung der taktilen Allodynie nach repetitiver Cisplatin-Applikation.	86
Abb. 35 Relatives Proteinlevel von N-Typ VGCC in DRG-Neuronen nach repetitiver <i>in vivo</i> Cisplatin- und ω -Conotoxin-Applikation.	87
Abb. 36 Nachweis von Cisplatin/DNA-Addukten in DRGs nach repetitiven <i>in vivo</i> Cisplatin-Applikationen.	88
Abb. 37 Mögliche Mechanismen der Regulation der N-Typ VGCC-Ströme in DRG-Neuronen durch Cisplatin.	99
Abb. 38 Mechanismen der Calcium-basierten Neurotoxizität von Cisplatin.	101

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verwendete Geräte	32
Tab. 2 Chemikalien	33
Tab. 3 Verbrauchsmaterialien	35
Tab. 4 Primärantikörper	36
Tab. 5 Sekundärantikörper	37
Tab. 6 Reagenzien für die Immunocytochemie/Immunohistochemie	37
Tab. 7 Medien und Lösung für die Zellkultur	38
Tab. 8 Lösungen für die elektrophysiologischen Untersuchungen	38
Tab. 9 Lösungen und Puffer für die Immunocytochemie/Immunohistochemie	39
Tab. 10 Verwendete Antikörper und Verdünnungen für ICC	48
Tab. 11 Verwendete Antikörper und Verdünnungen für IHC	49
Tab. 12 Verwendete Antikörper und Verdünnungen für ICA	50
Tab. 13 Reduktion von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen durch Cisplatin	59
Tab. 14 Blockade von $I_{Ca(V)}$ nach Applikation von Cisplatin	60
Tab. 15 Gruppen der Verhaltenstestung	82

1. Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen (Krebs) stellen neben Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die häufigste Todesursache in den Industrieländern der westlichen Welt dar. Als maligne Tumorerkrankung werden Erkrankungen bezeichnet, welche auf Grund von Neubildung von Körpergeweben durch dereguliertes Zellwachstum entstehen.

Die Behandlung von Tumorerkrankungen richtet sich nach der Art und Lokalisation des Tumors. Heutzutage kann die Medizin dabei auf eine Vielzahl verschiedenster Behandlungsmöglichkeiten zurückgreifen. Neben den primären chirurgischen Therapien solider Tumore, sind Immuntherapien mit monoklonalen Antikörpern, die Verwendung von Signaltransduktionshemmern, oder die Behandlung mit ionisierender Strahlung möglich. Eine weitere wichtige Behandlungsmöglichkeit stellt die Chemotherapie mit verschiedenen Zytostatika dar. Diese richtet sich gegen die Replikation der DNA und stoppt somit die Teilung der Tumorzellen. Neben der hohen Effektivität in der Bekämpfung des Tumors führen Chemotherapien oft zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, welche das Leben der Betroffenen stark beeinflussen. Nebenwirkungen der Chemotherapie können beispielsweise Schädigungen der Nieren, oder des Nervensystems (Neurotoxizität) sein. Letztere können zu schmerzhaften peripheren Polyneuropathien führen (Wagener, 2009).

1.1 Platin-haltige Zytostatika

Platin-haltige Zytostatika spielen eine wichtige Rolle für die Therapie verschiedener Arten von Tumoren. Sie gehören bis heute zu den wirksamsten Chemotherapeutika. Aktuell finden vornehmlich drei Platinanaloga bei der Krebstherapie Anwendung: Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin. Neben der hohen Wirksamkeit in der Tumorthherapie führen diese Zytostatika zu schweren neurotoxischen Nebenwirkungen (Barabas et al., 2008; Amptoulach and Tsavaris, 2011; Khasabova et al., 2012), häufig mit der Folge einer schmerzhaften Polyneuropathie (Schlegel, 2005; Boehmerle et al., 2015).

1.1.1 Cisplatin

Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin, CDDP) stellt ein effektives Chemotherapeutikum in der Behandlung verschiedener Tumorentitäten dar. Die Erstbeschreibung von Cisplatin geht auf den US-amerikanischen Chemiker Barnett Rosenberg zurück. Rosenberg wollte die Wirkung von Wechselstrom auf das Wachstum des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) untersuchen und entdeckte hierbei die wachstumshemmende Wirkung des Platinkomplexes (Rosenberg et al., 1965).

Die Verabreichung von Cisplatin erfolgt einzeln, oder in Kombination mit anderen Zytostatika. Die Anwendungsgebiete umfassen in erster Linie Karzinome, dabei sowohl Hoden- und Ovarialkarzinome, Tumore des Hals-Kopf-Bereichs, sowie der Harnblase, Zervixkarzinome oder Bronchialkarzinome (Cersosimo, 1989; Taillade et al., 2004; Barabas et al., 2008).

Cisplatin verteilt sich nach Infusion in einer Vielzahl von Geweben, jedoch ist die Akkumulation innerhalb der ersten Stunde in den Nieren, der Leber, den Muskeln und der Haut besonders hoch (Litterst et al., 1976; Huang et al., 2001). Auch im Innenohr, insbesondere in den äußeren Haarsinneszellen, kann Cisplatin nachgewiesen werden (Dehne et al., 2001).

1.1.2 Zytostatische Wirkung von Cisplatin

Der zytostatische Effekt von Cisplatin besteht in der Inhibition der DNA-Synthese. Hierdurch wird die Proliferation der Tumorzellen gestoppt und führt im weiteren Verlauf zur Apoptose der Zelle (Harder and Rosenberg, 1970; Howle and Gale, 1970). Die Wirkung von Cisplatin ergibt sich aus der chemischen Struktur (Abb. 1). Der Komplex besteht aus einem zentralen Platin-Atom, das von zwei Chloridatomen, sowie von zwei Amino-Gruppen in einer cis-Konfiguration umgeben ist (Page et al., 1985).

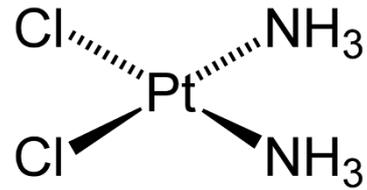


Abb. 1 Chemische Struktur von Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin). Ein zentrales Platin-Atom wird von zwei Chlorid-Atomen und zwei Amino-Gruppen in cis-Konfiguration umgeben.

Die Aktivierung des Komplexes erfolgt durch den Austausch der beiden Chlorid-Atome mit Hydroxyl-Gruppen in wässriger Lösung, wie beispielsweise dem Zytosol einer Zelle (Rosenberg, 1979) (Abb. 2). Die neutrale Form (Abb. 1) des Komplexes wird als biologisch unwirksam beschrieben (Litterst, 1984). Diese Form liegt vorzugsweise in der extrazellulären Flüssigkeit vor, die eine hohe Chloridkonzentration (10^{-3} M) aufweist. Durch den Eintritt in das Zytosol kommt es zur Austauschreaktion und somit zur Aktivierung des Komplexes (Rosenberg, 1979). Die aktivierte Komplexform bindet nun an die Basen der DNA, um diese zu schädigen. Die Bindung von Cisplatin an die DNA wird als Platin/DNA-Addukt bezeichnet (Reed, 2006). Hierbei befinden sich die Basen auf dem gleichen oder auf benachbarten Strängen der DNA (Reed, 2006). Cisplatin bindet an alle DNA-Basen, überwiegend jedoch an die N-7 Position von Adenin und Guanin. Dies ist auf die hohe Nukleophilie der Position zurückzuführen (Munchausen and Rahn, 1975; Rosenberg, 1979; Reed, 2006). Durch die Bildung von DNA-Addukten kommt es zur Inhibition der DNA-Replikation (Harder et al., 1976). Die Reparatur solcher Schädigungen erfolgt langsam und kann somit über längere Dauer nicht kompensiert werden, was zu funktionellen Störungen und zur Apoptose bzw. zum Untergang der betroffenen Zellen führt (Plooy et al., 1984).

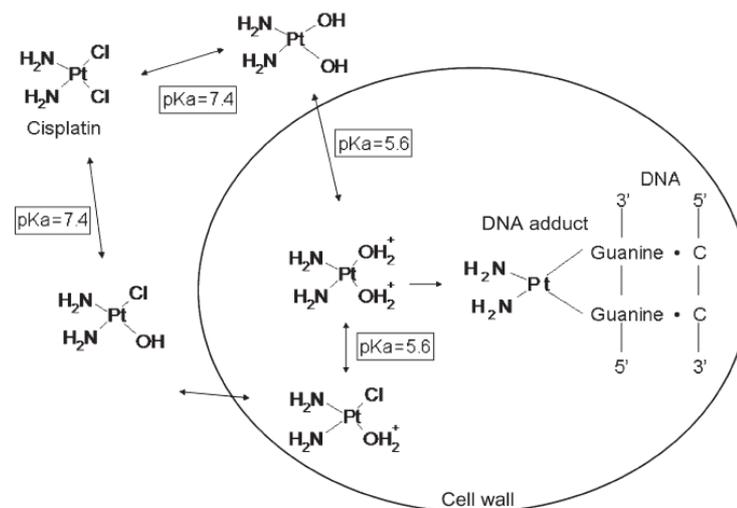


Abb. 2 Aktivierung und Adduktbildung von Cisplatin. Cisplatin wird nach dem Eintritt in das Zytoplasma der Zelle durch den Austausch von Chlorid gegen Hydroxyl-Gruppen aktiviert. Die aktivierte Form bindet zum Beispiel an der N-7 Position von Guanin an zwei Seiten des DNA-Strangs und führt somit zur Bildung von DNA-Addukten. Diese führen zur Schädigung der DNA, die aufgrund dessen nicht mehr repliziert werden kann. Die Folge sind apoptotische Prozesse in der Zelle, welche zum Untergang dieser führen (adaptiert nach Barabas et al., 2008).

Neben den zytostatischen Effekten führt Cisplatin auch zu einer erheblichen Toxizität. Diese Nebenwirkungen erstrecken sich von schwerem Erbrechen, bis hin zu einer dauerhaften Einschränkung der Nierenfunktion (Barabas et al., 2008).

Auch neurotoxische Effekte treten auf, bei denen vor allem die Spinalganglienneuronen des peripheren Nervensystems betroffen sind, was als Folge zu einer schwerwiegenden, häufig schmerzhaften Polyneuropathie führt. Die Mechanismen dieser Neurotoxizität sind bis heute unklar. Es existieren jedoch verschiedene Theorien zu dieser Thematik. So werden beispielsweise neben den Schädigungen der Neuronen durch die Platin/DNA-Addukte (Dzagnidze et al., 2007), auch Störung der neuronalen Calcium-Homöostase diskutiert (Snutch, 2005; Hagenston and Simonetti, 2014).

1.2 Neurotoxizität

Der Begriff Neurotoxizität beschreibt die Eigenschaft von Stoffen und Substanzen sich schädlich auf neuronale Zellen auszuwirken. Dieses kann sich in Form von Funktionsänderungen zellulärer Strukturen und Prozesse, wie etwa der Veränderung

von Ionenkanälen, aber auch in der Aktivierung von apoptotischen Prozessen zeigen. Neurotoxische Effekte sind häufig von Dosis und Dauer der Anwendung abhängig. So können nicht nur Substanzen wie Cisplatin zu einer Neurotoxizität führen, sondern auch beispielsweise wichtige Ionen wie Calcium, wenn diese über ein physiologisches Maß hinaus in die Zellen gelangen (Mattson and Chan, 2003; Orrenius et al., 2003; Smaili et al., 2013).

1.2.1 Cisplatin-Neurotoxizität

Bei etwa 30-70 % der mit Cisplatin behandelten Patienten kommt es zu einer schmerzhaften Polyneuropathie (Thompson et al., 1984; Cavaletti, 2008; Windebank and Grisold, 2008). Studien zu neurotoxischen Effekten von Cisplatin konnten zeigen, dass es durch die kovalente Bindung von Cisplatin an die DNA des Zellkerns von Spinalwurzelganglionneuronen (DRG-Neuronen) zu Schädigungen der DNA und zur Aktivierung von apoptotischen Prozessen kommt (Eastman and Barry, 1987; Woynarowski et al., 1998). Auch konnte eine Korrelation von Cisplatin/DNA-Addukten und der Entstehung einer Polyneuropathie an DNA-Reparatur-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Dzagnidze et al., 2007).

Die Schädigung der DNA führt zur Hochregulation von p53 und zu Veränderungen des Zellzyklus der Zellen (Fischer et al., 2001). Dieses hat wiederum die Hochregulation von Cyclin D1, sowie die Aktivierung des CDK4/6-Komplexes und die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) zur Folge. Dadurch wird die Translokation von Bax in die Mitochondrien begünstigt. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c, zur Aktivierung von Caspasen und zur Apoptose (Gill and Windebank, 1998; Windebank and McDonald, 2002).

Einen weiteren Mechanismus stellt die Bildung von Addukten mit der mitochondrialen DNA (mtDNA) dar (Podratz et al., 2011). Im Gegensatz zur Kern-DNA erfolgt keine Reparatur der DNA in den Mitochondrien. Die Bindung von Cisplatin an die mtDNA bewirkt Veränderungen in der mtDNA Replikation und Transkription. Dieses führt zu mitochondrialen Dysfunktionen und somit zu neuronaler Beeinträchtigung (Podratz et al., 2011).

Neben diesen Mechanismen könnte auch eine Störung der Calcium-Homöostase in den DRG-Neuronen durch Veränderungen der spannungsabhängigen Calciumkanäle

le (VGCC) eine wichtige Rolle bei der Neurotoxizität von Cisplatin und der Genese von schmerzhaften Polyneuropathien darstellen (Tomaszewski and Busselberg, 2007).

1.2.2 Calcium-vermittelte Apoptose

Calcium-Ionen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler biologischer Prozesse, wie bei der Muskelkontraktion, der Zellproliferation oder der Aktivierung verschiedener Proteine innerhalb von zellulären Signalkaskaden (Stevens, 1983; Busselberg et al., 1994; Clapham, 2007; Tomaszewski and Busselberg, 2007).

Die Calciumkonzentration im extrazellulären und intrazellulären Raum ist strikt reguliert. Dieser regulative Prozess wird als Calciumhomöostase bezeichnet. So beträgt die extrazelluläre Calciumkonzentration in Geweben von Säugern 10^{-3} M, wohingegen sie innerhalb einer Zelle nur 10^{-7} - 10^{-6} M beträgt (Busselberg et al., 1994; Tomaszewski and Busselberg, 2007).

Der Eintritt von Calcium in neuronale Zellen erfolgt zum größten Teil über VGCC oder über glutamaterge Rezeptoren (Kandel et al., 2012). Neuronen weisen eine hohe Empfindsamkeit für Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration auf, die es ihnen erlaubt durch kleinste Veränderung Signalwege zu aktivieren und mit anderen Zellen zu kommunizieren (Busselberg et al., 1994; Clapham, 2007). Neben diesen für die Zelle und deren Funktion wichtigen Eigenschaften, ist Calcium auch an der Apoptose beteiligt. Dieses geschieht beispielsweise, wenn es zu Fehlfunktionen der VGCC und somit zu einer kritischen Veränderung der intrazellulären Calciumhomöostase kommt.

Apoptotische Prozesse können durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden. Zu diesen zählen z.B. die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren von Zytokinen (wie Tumor-Nekrose Faktor), Wachstumsfaktoreninsuffizienz, Toxine, oxidativer Stress aber auch der vermehrte Calciumeinstrom durch membranständige Kanäle oder die Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytosol der Zelle (Mattson and Chan, 2003).

Lange war die genaue Rolle von Calcium bei der Apoptose unklar, jedoch konnte gezeigt werden, dass Calcium als Messenger dient, der die Mitochondrien-ER-Interaktion koordiniert und so zur Apoptose führt (Boehning et al., 2003). Wird durch

einen Stimulus eine kleine Menge Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, führt dies zu einer Bindung an den Inositol-1,4,5-triphosphat (InsP₃) Rezeptor des ER und somit zu einer vermehrten Calciumleitfähigkeit. Dadurch wird eine vermehrte Freisetzung von Calcium aus dem ER in das Zytosol der Zelle hervorgerufen. Dieses wird von den Mitochondrien aufgenommen und löst eine verstärkte Freisetzung von Cytochrom c aus. Dies begünstigt die Bildung bzw. Aktivierung des Apoptosom-Komplexes, sowie von Caspasen. Die aktivierten Caspasen, sowie Nukleasen, finalisieren den apoptotischen Prozess durch die Zersetzung von Proteinen und der DNA (Abb. 3) (Boehning et al., 2003; Mattson and Chan, 2003). Tritt dieser Prozess in sensorischen Neuronen auf, kann es anschließend zur Entstehung von schmerzhaften Polyneuropathien kommen.

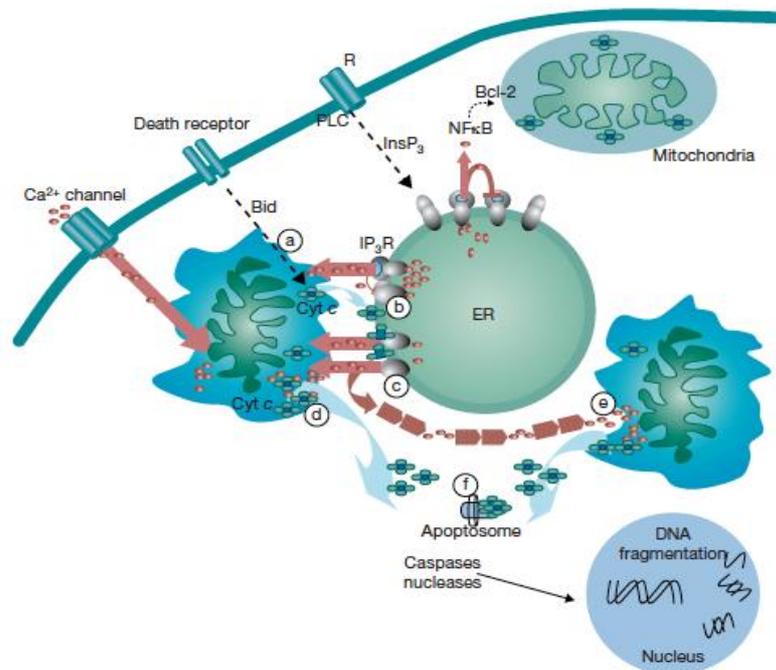


Abb. 3 Calcium-vermittelte Apoptose. Durch einen Apoptose-auslösenden Stimulus (Calciumeinstrom, Todesrezeptoren, etc.) kann es zur Freisetzung geringer Mengen Cytochrom c aus den Mitochondrien kommen (a). Cytochrom c bindet an den IP₃R des ER (b) wodurch es zu einer vermehrten Freisetzung von Calcium in das Zytosol der Zelle kommt (c). Dieses Calcium führt zu einem kritischen Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol (d). Das Calcium wird von umliegenden Mitochondrien aufgenommen. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (e). Die Folge ist eine Aktivierung des Apoptosoms und von Caspasen, welche zum finalen apoptotischen Prozess beitragen (aus Mattson & Chan, 2003).

1.3 Polyneuropathien

Der Begriff „Polyneuropathie“ umfasst die gleichzeitigen Erkrankungen von verschiedenen peripheren Nerven. Die Entstehung von Polyneuropathien kann auf zahlreiche Ursachen zurückgeführt werden. Hierbei kann es sich um metabolische (z.B. Diabetes mellitus), inflammatorische (z.B. CIDP), vaskulär/vaskulitische (z.B. ischämisch), exogen-toxische (z.B. Alkohol), hereditäre (z.B. Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung) oder medikamentös-toxische (z.B. Zytostatika) Ursachen handeln (Neundörfer and Heuß, 2006).

Neben Platin-haltigen Zytostatika, wie Cis-, oder Oxaliplatin führen auch Vinkaalkaloide wie Vincristin, Vindesin oder Vinorelbin, sowie Taxane wie Taxol oder Taxotere zu Polyneuropathien (Boehmerle et al., 2015). Diese Polyneuropathien werden als Chemotherapie-induzierte Polyneuropathien (CIN) bezeichnet.

Im Rahmen von Polyneuropathien können sowohl motorische, als auch sensible Nervenanteile betroffen sein. Das Verteilungsmuster der Erkrankung ist typischerweise zu Beginn an den distalen Extremitäten lokalisiert, kann jedoch auch körpernah (proximal) auftreten und dabei sowohl symmetrisch, als auch asymmetrisch sein (Freynhagen & Baron, 2006). Die verschiedenen Fasertypen eines Nerven können auch isoliert betroffen sein. Bei der sog. „small-fiber Neuropathie“ sind z.B. nur die A δ - und unmyelinisierte C-Fasern betroffen, die vor allem an der Weiterleitung von Schmerz- und Temperaturreizen beteiligt sind. Betroffene Patienten klagen oft über das sogenannte „burning-feet“-Syndrom, brennende Schmerzen der unteren Extremitäten (Tavee and Zhou, 2009; Hovaguimian and Gibbons, 2011).

Die häufigsten Symptome von Polyneuropathien sind Parästhesien, Sensibilitätsstörungen und Lähmungserscheinungen. Als Parästhesien werden schmerzhaft empfundene Körperempfindungen mit Kribbeln oder Elektrisieren bezeichnet. Taubheit oder Kälte- und Wärmewahrnehmungsstörungen werden als Hypästhesie oder Thermhypästhesie bezeichnet (Freynhagen and Baron, 2006; Neundörfer and Heuß, 2006).

Die Therapie von Polyneuropathien ist schwierig und erfolgt entsprechend den zugrundeliegenden Ursachen. Als Sonderfall erweisen sich die CIN, die nachfolgend beschrieben werden. Hier kann, bei ausreichend früher Erkennung, das Absetzen der Zytostatika eine Entstehung verhindern. Dadurch wird jedoch die Behandlung der Tumorerkrankung stark eingeschränkt (Quasthoff and Hartung, 2002).

1.3.1 Chemotherapie-induzierte Polyneuropathien

CIN stellen eine der häufigsten Nebenwirkungen von Zytostatika dar. Sie treten bei 30 - 70 % der chemotherapeutisch behandelten Patienten auf (Thompson et al., 1984; van der Hoop et al., 1990; Gregg et al., 1992; Cavaletti, 2008; Windebank and Grisold, 2008; McWhinney et al., 2009; Cavaletti and Marmiroli, 2010). Bei der wachsenden Anzahl an Tumorerkrankung stellen sie die Forschung und Medizin vor ein Problem, da es sich dabei um einen von der Dosis der verwendeten Zytostatika abhängigen Effekt handelt (Boehmerle et al., 2015) und die Therapie der eigentlichen Krebserkrankung somit limitiert wird (Roelofs et al., 1984).

Auch die chemotherapeutische Behandlung mit Cisplatin führt zu solchen Polyneuropathien. Betroffen hiervon sind in der Regel die Spinalganglionneuronen der sensiblen Nerven. Es handelt sich dabei typischerweise um sensible axonale Neuropathien vom distal-symmetrischen Typ. Die Entwicklung einer Cisplatin-induzierten Polyneuropathie erfolgt dosisabhängig und tritt verzögert auf. Dies geschieht meist drei bis sechs Monate nach Behandlungsbeginn (Zedan et al., 2014). Die Entwicklung einer Neuropathie nach Cisplatintherapie ist von der kumulativen Gesamtdosis abhängig. Bereits ab 200 mg/m^2 ist mit der Ausbildung einer CIN zu rechnen, wohingegen ab 600 mg/m^2 neuropathische Symptome bei nahezu allen Patienten nachzuweisen sind (Roelofs et al., 1984).

Erkrankte Patienten klagen zunächst über sensible Symptome mit Parästhesien, sowie einem sensorischen Verlust, der vor allem in den distalen Extremitäten beginnt (van der Hoop et al., 1990; Podratz et al., 2011). Bei längeren Behandlungen kann auch eine gestörte Propriozeption mit sensibler Ataxie auftreten. Eine Besonderheit von Cisplatin-induzierten Polyneuropathien stellt die Verschlechterung der Symptome nach Beendigung der chemotherapeutischen Behandlung dar. Dieses Phänomen wird als „Coasting“ bezeichnet (Grunberg et al., 1989; Podratz et al., 2011). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch nach Beendigung der Therapie ein fortlaufender neuronaler Schaden auftritt (Grunberg et al., 1989). Cisplatin-Neuropathien sind oft nur bedingt reversibel. So haben Langzeitstudien zeigen können, dass Patienten, die mit Cisplatin behandelt wurden, auch noch nach vielen Jahren Symptome aufwiesen (Strumberg et al., 2002).

Die Therapie von Cisplatin-induzierten Polyneuropathien, sowie CIN im Allgemeinen erweist sich als äußerst schwierig. Bis heute konnten kaum therapeutische oder gar präventive Strategien für die neurotoxischen Nebenwirkungen von Zytostatika entwickelt werden, so dass ein Absetzen dieser, bei ersten Anzeichen für eine Polyneuropathie, eine Verschlechterung der neuropathischen Symptome verhindert.

1.3.2 Neuropathischer Schmerz

Nach Definition der IASP (International Association for the Study of Pain) ist Schmerz „ein unangenehmes heftiges Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit tatsächlichen oder möglichen Gewebeschäden verbunden ist, oder in solchen Kategorien beschrieben wird“. Schmerzen können in akuter und chronischer Weise auftreten. So haben akute Schmerzen eine Warnfunktion und signalisieren potentielle oder aktuelle Gewebeverletzungen. Chronische Schmerzen hingegen führen häufig zu langwierigen Beschwerden und zu einer Minderung der Lebensqualität der betroffenen Patienten. Eine Therapie chronischer Schmerzen erweist sich jedoch oft als schwierig (Manfredi et al., 1981). Ätiologisch können Schmerzen in Nozizeptorenschmerz, Schmerzen infolge funktioneller Störungen und in neuropathische Schmerzen eingeteilt werden. Als neuropathischer Schmerz wird der Schmerz definiert, dessen Ursache in einer primären Läsion oder Dysfunktion des Nervensystems begründet ist (Baron and Mahn, 2010; Hagenston and Simonetti, 2014). Eine dieser Ursachen stellen Polyneuropathien dar. Etwa 6,9 % der an neuropathischen Schmerzen leidenden Patienten haben diese länger als drei Monate (Bouhassira, 2008). Die Symptome neuropathischer Schmerzen lassen sich in Negativ- und Positivsymptome einteilen. Typisch für die Genese von neuropathischen Schmerzen ist das gleichzeitige Auftreten von Negativ- und Positivsymptomen (Stengel et al., 2007). Negativsymptome umfassen die taktile Hypästhesie, die thermale Hypästhesie und den Verlust der Vibrationswahrnehmung. Diese werden als unangenehm, jedoch nicht als schmerzhaft beschrieben (Nickel et al., 2011). Unter den Positivsymptomen werden spontane und evozierte Schmerzen verstanden. So beinhalten spontane Schmerzen Parästhesien, oberflächliche Schmerzen und spontan einschließende Schmerzen; evozierte Schmerzen hingegen umfassen die mechanische Allodynie, sowie die Kälte- und Hitze-Hyperalgesie. Die mechanische Allodynie beschreibt den Zustand, in welchem

Schmerzen durch eigentlich nicht schmerzhaft Reize, wie leichte Berührungen oder leichten Druck, ausgelöst werden. Bei der Kälte- bzw. Hitze-Hyperalgesie kommt es zu Schmerzempfindungen durch normalerweise nicht schmerzhaften Kälte- oder Hitze Reize (Hansson et al., 2007; Baron and Mañ, 2010).

Die Entstehung von neuropathischen Schmerzen ist mit der Veränderung der peripheren und zentralen neuronalen Erregbarkeit assoziiert. Jedoch wurde eine Vielzahl verschiedenster Mechanismen zur Entstehung vorgeschlagen (Murali et al., 2015). Einer dieser Mechanismen stellt die Veränderung der Expression und Funktion von spannungsabhängigen Ionenkanälen dar. Hierbei stellen die spannungsaktivierten Natriumkanäle Nav1.1 - Nav1.9 die am besten untersuchten Strukturen dar (Dib-Hajj et al., 2010).

Auf Grund ihrer Rolle bei der Entwicklung und Manifestierung unterschiedlicher Schmerzbedingungen stehen auch VGCC in Verdacht einen wichtigen Anteil an der Genese von neuropathischen Schmerzen zu haben (Femyhough and Calcutt, 2010; Murali et al., 2015).

1.4 Spannungsabhängige Calciumkanäle

VGCC stellen wichtige Schlüsselproteine zur Übertragung von Membranpotenzialveränderungen dar. Somit spielen diese Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Regulation vieler physiologischer Prozesse verschiedenster Zelltypen, wie Muskelkontraktionen (Bakowski and Parekh, 2007; Kanaide, 2007), der Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern (Stojilkovic et al., 2005), der enzymatischen Regulation, der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen, sowie der Expression von unterschiedlichen Genen (Abb. 4) (Takahashi et al., 1987; Naveh-Many and Nechama, 2007).

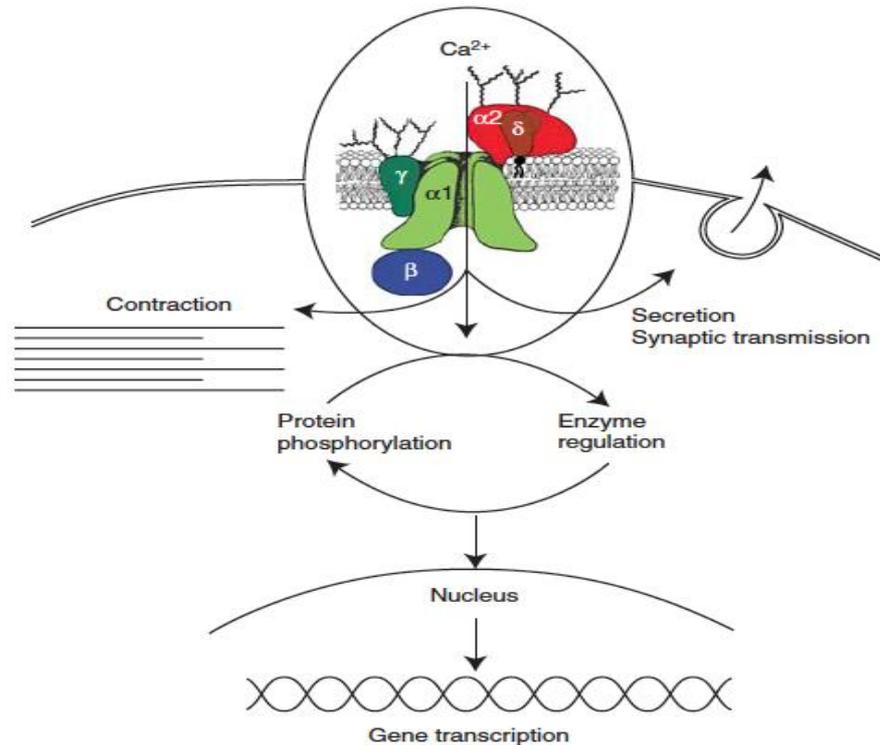


Abb. 4 Funktionen von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Der Einstrom von Calcium durch spannungsabhängige Calciumkanäle führt zur Regulierung verschiedenster zellulärer Prozesse und Ereignisse, wie enzymatische Regulierungen, Proteinphosphorylationen/-dephosphorylationen, oder der Transkription von Genen (nach Takahashi et al., 1987).

Ihre Aktivierung erfolgt durch Membrandepolarisation, wie beispielsweise durch Aktionspotentiale in Neuronen, wodurch es zum Einstrom von extrazellulären Calciumionen in das Zytosol der Zellen kommt (Catterall, 2011).

Die Struktur der VGCC wurde erstmalig an den Kanälen des Skelettmuskels untersucht und besteht aus einer $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, γ - und einer δ -Untereinheit (Abb. 5) (Curtis and Catterall, 1984; Leung et al., 1987; Takahashi et al., 1987). Diese Untereinheiten bilden ein Heteromultimer (Catterall, 2011).

Die $\alpha 1$ -Untereinheit stellt mit 190-200 kDa die größte dar (Takahashi et al., 1987). Das Protein setzt sich aus etwa 2000 Aminosäurenresten zusammen, welche eine transmembranäre Struktur bilden und in vier sich wiederholenden Domänen (I-IV) organisiert sind. Jede dieser Domänen beinhaltet sechs Transmembransegmente (S1-S6), sowie eine Schlaufe (Loops) zwischen den Segmenten S5 und S6 (Takahashi et al., 1987). Die $\alpha 1$ -Untereinheit umfasst die Kanalpore, den Spannungssensor (S4), sowie den „Gating“-Apparat. Die Loops zwischen den Segmenten

S5 und S6 einer jeden Domäne bestimmen die Ionenleitfähigkeit und die Selektivität (Catterall et al., 1991; Catterall, 2011).

Die β -Untereinheit befindet sich im intrazellulären Raum. Sie besteht aus α -Helices ohne transmembranäre Segmente und ist etwa 55 kDa groß (Takahashi et al., 1987; Ruth et al., 1989). Die Struktur des Kanals wird durch die α_2 -Untereinheit bestimmt. An dieser ist die δ -Untereinheit, via Disulfidbrücken, gekoppelt. Sie ist für die spannungsabhängige Aktivierung des Kanals, sowie für die steady-state Inaktivierung verantwortlich. Die Größe dieses Komplexes beträgt etwa 170 kDa. (Catterall et al., 1991; Ertel et al., 2000; Lacinova, 2005).

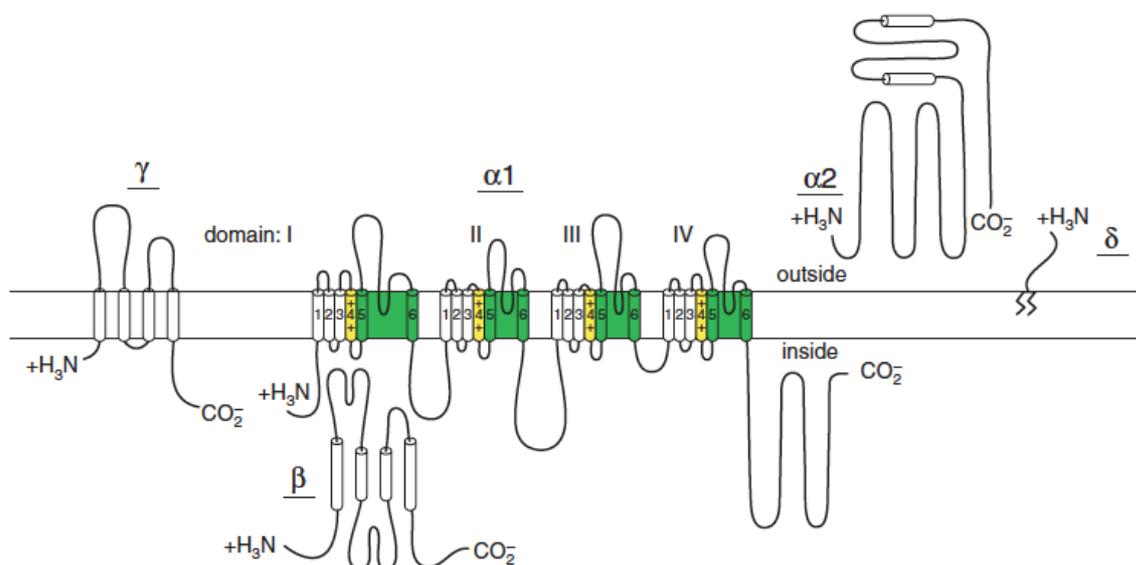


Abb. 5 Struktur spannungsabhängiger Calciumkanäle. Spannungsabhängige Calciumkanäle bestehen aus verschiedenen Untereinheiten: α_1 , α_2 , β , γ , δ . Die α_1 -Untereinheit lässt sich in 4 Transmembran-Domänen (I-IV) mit jeweils 6 Segmenten (S1-S6) unterteilen (Takahashi et al., 1987).

1.4.1 Subtypen von VGCC

In Abhängigkeit von Eigenschaften wie Kinetik, α_1 -Untereinheit, Pharmakologie, Einzelkanalleitfähigkeit und Spannungsabhängigkeit lassen sich zwei Gruppen von VGCC unterscheiden. Diese können wiederum in verschiedene Subtypen eingeteilt werden (Ertel et al., 2000; Lacinova, 2005; Catterall, 2011):

1. bei geringer Spannung aktivierende Kanäle (engl. **low voltage activating**, LVA; z.B. T-Typ)

2. bei hoher Spannung aktivierende Kanäle (engl. **high voltage activating**, HVA; L-Typ, N-Typ, P-/Q-Typ und R-Typ),

1.4.1.1 L-Typ

VGCC vom L-Typ lassen sich in die Formen Cav1.1–Cav1.4 einteilen (Helton et al., 2005). Von diesen werden jedoch nur die Formen Cav1.2 und Cav1.3 im Nervensystem exprimiert (Hell et al., 1993b; Lipscombe et al., 2004). Sie sind überwiegend an den Somata und den Dendriten der Neuronen lokalisiert (Hell et al., 1993a; Simon et al., 2003). Daher spielen sie auch nur eine limitierte Rolle beim präsynaptischen Calciumeintritt an den meisten Synapsen (Dunlap et al., 1995). Weiterhin ist unklar ob sie, bedingt durch ihre langsame Öffnung bei Depolarisationen, einen Beitrag zum Aktionspotential-abhängigen Calciumeintritt leisten (Hell et al., 1993a; Simon et al., 2003; Helton et al., 2005). Jedoch scheinen sie essentiell für die aktivitätsabhängige Genexpression, sowie für die Regulation der synaptischen Plastizität zu sein (Murphy et al., 1991; Magee and Johnston, 1997; Mermelstein et al., 2000; Lei et al., 2003; Helton et al., 2005). Die Blockade von L-Typ Kanälen erfolgt beispielsweise durch Dihydropyridine wie Nimodipin (Gelmers, 1985).

1.4.1.2 P-/Q-Typ

Der P-/Q-Typ kommt nur in einer Form (Cav2.1) vor. Am häufigsten sind die VGCC des P-/Q-Typs in den Purkinjezellen des Cerebellums exprimiert. Dennoch sind sie auch in vielen anderen Typen von Neuronen, wie beispielsweise in DRG-Neuronen lokalisiert (Westenbroek et al., 1995; Indriati et al., 2013). Zu ihren Aufgaben zählen die Integration von dendritischen Signalen, die Generierung dendritischer Spikes, sowie die Transmitterfreisetzung. Ferner leisten sie einen Beitrag zur Genexpression (Tank et al., 1988; Westenbroek et al., 1995; Indriati et al., 2013). Eine Blockade kann über das Spinnengift Agatoxin erfolgen (Mintz et al., 1992).

1.4.1.3 N-Typ

VGCC des N-Typs kommen auch nur in einer Form (Cav2.2) vor. Sie sind überwiegend in der präsynaptischen Nerventerminale von Neuronen lokalisiert (Westenbroek et al., 1992; Su et al., 2012). Insbesondere in den DRG-Neuronen kommen N-Typ

VGCC jedoch auch vermehrt in den Somata vor, sowie in deren synaptischen Terminalen im Hinterhorn der Wirbelsäule (*Laminae* I und II) (Kerr et al., 1988; Gohil et al., 1994). Ihre Hauptfunktion ist die Vermittlung von neuronalen Schlüsselereignissen wie Synaptogenese, sowie die Freisetzung von Neurotransmittern (Westenbroek et al., 1992; Sheng et al., 1994). N-Typ VGCC in DRG-Neuronen sind mit dem Neurotransmitter Substanz P ko-lokalisiert. Hierbei handelt es sich um ein Neuropeptid mit Bedeutung für die Nozizeption (Westenbroek et al., 1995; Murakami et al., 2001). Die Blockade von N-Typ VGCC erfolgt durch ω -Conotoxin. Hierdurch wird die Weiterleitung der Schmerzsignale verhindert (Adams and Berecki, 2013; Rigo et al., 2013). Dadurch könnte der N-Typ VGCC ein mögliches Ziel bei der Therapie verschiedener Schmerzen darstellen.

1.4.1.4 T-Typ

VGCC des T-Typs lassen sich in die Formen Cav3.1 - Cav3.3 einteilen. Die Erstbeschreibung erfolgte in Purkinjezellen, woraufhin sie in vielen weiteren Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, so auch in DRG-Neuronen, nachgewiesen werden konnten (Nowycky et al., 1985; Kostyuk et al., 1988; Boland and Dingledine, 1990; Regan, 1991). Neben Neuronen kommen T-Typ VGCC auch am Herzen, in der Niere und in neuroendokrinen Geweben vor und vermitteln dort den Calciumeintritt, beispielsweise für die Sekretion von Hormonen (Yang and Berggren, 2006; Belardetti and Zamponi, 2008). Da ihre Öffnung nur bei sehr negativen Membranpotentialen erfolgt, kommt ihnen eine wichtige Rolle bei der Regulation der neuronalen Erregbarkeit zu (Nelson et al., 2006; Cain and Snutch, 2010). Neben diesen Funktionen unter physiologischen Bedingungen, spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen wie Epilepsie, Autismus, Herzfehlern, Psychosen oder Schmerzen (Vassort et al., 2006; Heron et al., 2007; Belardetti and Zamponi, 2008; Cribbs, 2010). Die Blockade des T-Typ VGCC kann z.B. durch die Gabe von Pimozid erfolgen (Bertolesi et al., 2002).

1.4.2 Die Rolle von VGCC-Subtypen bei Polyneuropathien und neuropathischen Schmerzen

Über die Rolle der verschiedenen Subtypen von VGCC bei der Genese von Polyneuropathien und neuropathischen Schmerzen existieren zahlreiche wissenschaftliche Studien. Diese befassen sich jedoch überwiegend mit fokalen Nervenläsion oder mit im Rahmen von *Diabetes mellitus* entstandenen Neuropathien. Untersuchungen schmerzhafter Polyneuropathien auf Ionenkanalebene nach Chemotherapien mit Cisplatin sind nicht beschrieben.

In funktionellen Studien konnte bereits die Bedeutung von VGCC für die Genese neuropathischer Schmerzen nach Nervenläsionen belegt werden (Fernyhough and Calcutt, 2010). Insbesondere die Rolle von N-Typ und T-Typ VGCC wurde beschrieben.

Der Fokus vieler Studien liegt auf der Expression der $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit in verschiedenen Schmerzmodellen. Diese Untereinheit kommt insbesondere bei N-Typ VGCC vor und vermittelt den analgetischen Effekt von Gabapentin. So konnte in verschiedenen Studien mit Tiermodellen mit peripherer Nervenverletzungen eine Zunahme der $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit in sensorischen Neuronen nachgewiesen werden (Luo et al., 2001; Newton et al., 2001; Narita et al., 2007; Bauer et al., 2009).

Ferner konnte in verschiedenen Schmerzmodellen nachgewiesen werden, dass die Inhibition der N-Typ VGCC, beispielsweise durch Conotoxine, oder strukturverwandten Peptiden, sowie der Verlust dieser Kanäle durch genetischen Knockout, zu einer Schmerzlinderung führen (Vanegas and Schaible, 2000; Ikeda et al., 2003; Altier and Zamponi, 2004; Snutch, 2005; Vink and Alewood, 2012).

Andere Studien hingegen zeigen, dass es zu einer Minderung der Ströme des N-Typs durch die Verletzung von sensorischen Nerven kommt (McCallum et al., 2003; McCallum et al., 2011). Auch konnten Veränderungen der Ströme und Stromdichten von L- und T-Typ VGCC gezeigt werden (McCallum et al., 2003; Jagodic et al., 2007; Jagodic et al., 2008). Im Rahmen von Studien mit Schmerzmodellen wie der „Chronic constriction Injury“ (CCI) konnte die Abnahme der gesamten Calciumstromdichte in DRG-Neuronen nachgewiesen werden (McCallum et al., 2003; Fuchs et al., 2007). Diese Studien zeigen, dass VGCC an der Genese verschiedenster Arten von

schmerzhaften Polyneuropathien beteiligt sind, jedoch die Ergebnisse zu den einzelnen VGCC-Subtypen teils unterschiedlich und widersprüchlich sind.

1.5 Hypothese der vorliegenden Arbeit

Trotz der wachsenden Anzahl von malignen Tumorerkrankungen und der damit verbundenen Zunahme der Verwendung von Zytostatika, sind die genauen Mechanismen von Platin-induzierten schmerzhaften Polyneuropathien bis heute nicht ausreichend verstanden. Dieses ist jedoch nötig, um entsprechende therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können.

Auf Basis des aktuellen Wissens ist es jedoch möglich, verschiedene Hypothesen für die Mechanismen der Neurotoxizität von Platin-haltigen Zytostatika zu erstellen. Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Arbeitshypothese wird nachfolgend erläutert (Abb. 6).

Analog zu den Studien zur Rolle von VGCC bei Polyneuropathien und neuropathischen Schmerzen, die nach Läsionen peripherer Nerven oder durch Diabetes mellitus entstehen, soll in dieser Arbeit der Einfluss von Cisplatin auf VGCC in DRG-Neuronen untersucht werden.

Da es durch Cisplatin zu einer Störung der Calcium-Homöostase in verschiedenen Zelltypen kommt (Xing et al., 1999; Liang and Huang, 2000; Al-Taweel et al., 2014; Splettstoesser and Büsselberg, 2005), liegt die Vermutung nahe, dass dieses auch in DRG-Neuronen der Fall sein könnte. Dabei könnten VGCC eine wichtige Rolle spielen und zur Genese von CIN beitragen.

Führt nun die Behandlung mit Cisplatin zu einem vermehrten Einstrom von Calcium in das Zytosol der DRG-Neuronen, könnte dies einen kritischen Anstieg des intrazellulären Calciums bedingen, mit der Folge einer Funktionsveränderung, Funktionsstörung oder der Aktivierung von proapoptotischen Faktoren. Dadurch entstehen und manifestieren sich schmerzhafte periphere Polyneuropathien. Auch wäre es denkbar, dass es durch den vermehrten Calcium-Einstrom zu einer vermehrten Freisetzung von Neurotransmittern kommt, wodurch ein pronozizeptiver Effekt eintritt. Folglich wäre es denkbar, dass durch die gezielte Modulation von VGCC-Subtypen ein pro-

nozizeptiver Effekt unterbunden wird, oder sogar die Entstehung einer schmerzhaften Polyneuropathie *in vivo* verhindert werden kann.

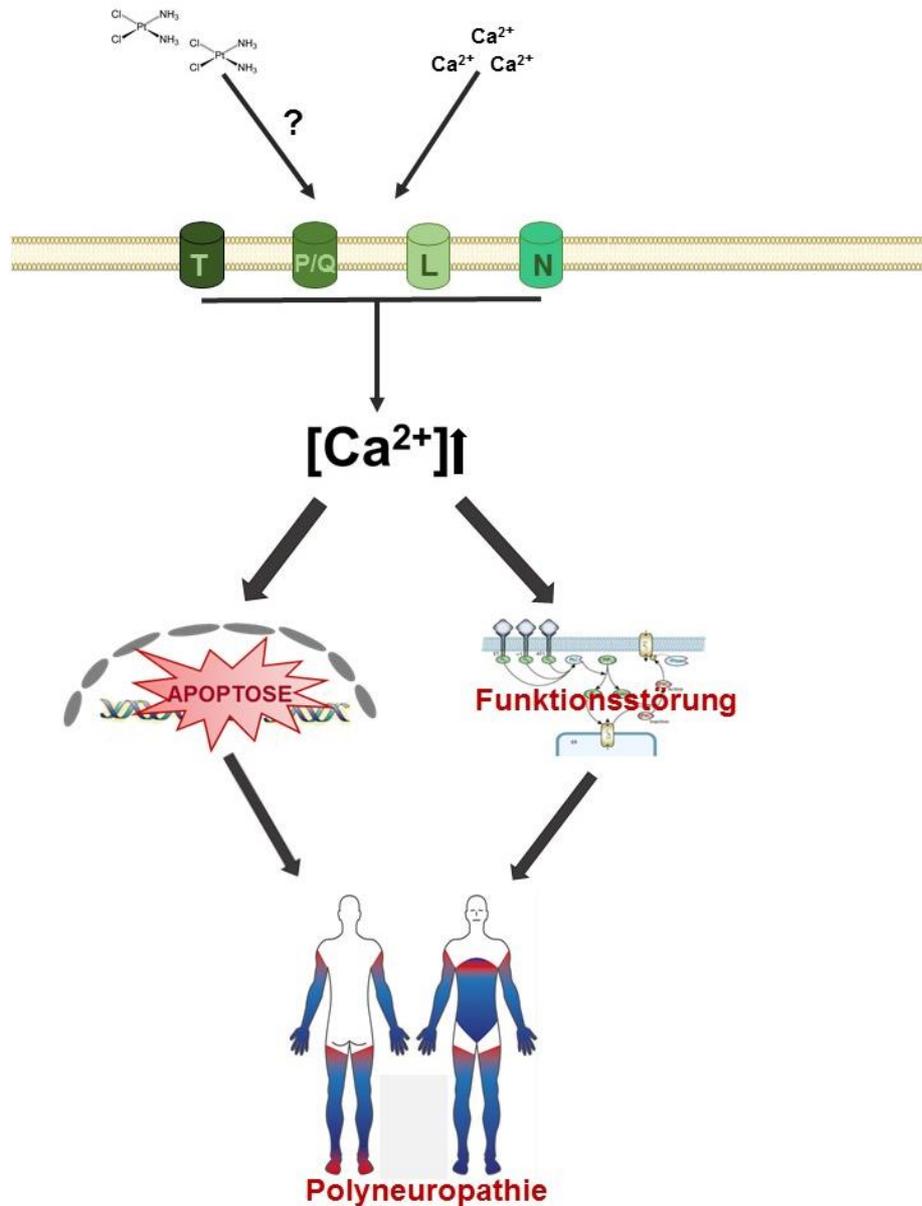


Abb. 6 Hypothese zur Entstehung von Cisplatin-induzierten Polyneuropathien. Durch den Einstrom von Calcium durch die verschiedenen Subtypen spannungsabhängiger Calciumkanäle, kommt es zu einem kritischen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in den DRG-Neuronen. Dieses kann anschließend zur Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, zu Funktionsstörungen von Proteinen dieser Signalwege oder zur Aktivierung von pro-apoptotischen Faktoren führen, wodurch es zu Apoptose der Zelle und zur Entwicklung und Manifestierung von schmerzhaften Polyneuropathien kommt (Original; M. Leo).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es die neurotoxischen und neuroprotektiven Mechanismen der Cisplatin-induzierten Polyneuropathie, durch die Untersuchung des Einflusses von Cisplatin auf VGCC von DRG-Neuronen aufzuklären. Um dieses zu erreichen sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss haben die direkte Applikation und die Inkubation von Cisplatin auf die Ströme der naiven (unbehandelten) VGCC in DRG-Neuronen?
- Welchen Einfluss hat die direkte Applikation und Inkubation von Cisplatin auf die Ströme der einzelnen Subtypen der VGCC in den DRG-Neuronen?
- Welcher/Welche Subtyp/en trägt/tragen zur Erhöhung des intrazellulären Calciums in den DRG-Neuronen bei?
- Führt Cisplatin zu einer Veränderung des Proteinlevels der VGCC-Subtypen?
- Welche Signalwege bzw. Signalproteine spielen eine Rolle bei der Modulation von VGCC-Strömen durch Cisplatin?
- Hat Cisplatin Einfluss auf die Apoptose von DRG-Neuronen und lässt sich durch die Modulation von VGCC-Subtypen eine Neuroprotektion erzielen?
- Ist es möglich durch die gezielte Modulation einzelner Subtypen die Entstehung einer Polyneuropathie *in vivo* zu unterbinden?

Diese Fragen sollten mit Hilfe verschiedener Methoden beantwortet werden.

Die Überprüfung des Einflusses von Cisplatin auf die Ströme der VGCC erfolgte mit Hilfe der Patch-Clamp Methode und spezifischen Kanalmodulatoren an kultivierten Spinalganglionneuronen der Ratte.

Zur Untersuchung des Proteinlevels der VGCC nach Cisplatin-Inkubation wurden immunozytochemische und -histochemische Färbungen durchgeführt.

Nach Erhalt dieser Ergebnisse sollte es möglich sein, Calcium-leitende Strukturen zur gezielten Blockade zu identifizieren und somit die Entstehung einer Polyneuropathie *in vivo* zu verhindern. Dazu sollten verschiedene Verhaltensexperimente an un-behandelten, mit Platin behandelten, sowie mit Platin und spezifischen Kanalmodulato-ren behandelten Ratten durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte

Tab. 1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Axioplan	Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Brutschrank, mit CO ₂ BB15	Heraeus, Deutschland
Kühlschränke Gefrierschränke	Liebherr, Deutschland
Lichtmikroskop, invers Zeiss ID03	Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Mikromanipulator Display SM-5	Luigs & Neumann, Deutschland
Mikropipetten 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl	Thermo Scientific, Deutschland
Mikroskopkamera AxioclCam MRm	Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Patch-Clamp Manipulatoren Mini 25 xl Mini 25 xr	Luigs & Neumann, Deutschland
Patch-Clamp Verstärker EPC 10 USB	HEKA, Deutschland

Pipetten-Polierer Micro Forge MF-830	Narishige, England
Pipetten-Puller Pipette Puller PIP6	HEKA, Deutschland
Schwingungsgedämpfter Tisch Table Stable	JRS Scientific Instruments, Deutschland
Stereolupe Zeiss Stemi DV4	Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Sterilbank Hera Guard	Thermo Scientific, Deutschland
Tischzentrifuge Mini Spin plus	Eppendorf AG, Deutschland
UV-Quecksilber Dampfampe XBO 75 W HBO 100 W	Osram, Deutschland

2.2 Chemikalien

Tab. 2 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Agatoxin IVA	Alomone Labs, Israel
Bariumchlorid (BaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Cäsiumchlorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, Deutschland

2. Material und Methoden

Cisplatin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Collagenase Typ II	Biochrom AG, Deutschland
ω -Conotoxin	Alomone Labs, Israel
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
F-12 Medium	Biochrom AG, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich, Deutschland
HCl	Sigma-Aldrich, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Deutschland
Horse Serum (HS)	Biochrom AG, Deutschland
Isofluran	Abbvie, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich, Deutschland
KN-93	Sigma-Aldrich, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Deutschland
Na-ATP	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Nerve Growth Factor (NGF)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Nimodipin	Alomone Labs, Israel
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deutschland

Pimozide	Alomone Labs, Israel
Tetraethylammoniumchlorid (TEA-Cl)	Fluka, Deutschland
Tetraethylammoniumhydroxid (TEA-OH)	Fluka, Deutschland
Tetrodotoxin (TTX)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG, Deutschland
Tween 20	AppliChem GmbH, Deutschland

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Borosilikat Glaskapillaren 1,5 mm OD x 0,86 mm ID x 100 mm L	Bio Medical Instruments, Deutschland
Deckgläser 12 mm	Oehmen-Labortechnik, Deutschland
Einmalpipetten 10 ml	Sarstedt AG und Co., Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten, glas 230 mm	Brand, Deutschland
Falcon Easy Grip Dishes (35mmx10mm)	Corning Incorporated, Deutschland
Falcon Tubes 50 ml, 15 ml	Corning Incorporated, Deutschland
Hamilton-Spritze, Glas 100 µl	Hamilton Company, USA

Handschuhe, latexfrei	Diverse Hersteller
Objekttträger Super Frost Gold	Labor- und Medizintechnik Langenbrinck, Deutschland
Petrischalen Verschiedene Größen	Greiner Bio One, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 1 µl	Brand, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Sarstedt AG und Co., Deutschland
Spritzen 5 ml, 1 ml	BD Discardit, Deutschland
Spritzenkanülen 0,3 x 13 mm 30 G 0,6 x 25 mm 23 G	BD Microlance, Deutschland

2.4 Antikörper

Tab. 4 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-β-III-Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich, Deutschland
Anti-Caspase3	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Deutschland
Anti-Cav1.1 (L-Typ)	Kaninchen	Alomone Labs, Israel
Anti-Cav2.1 (P-/Q-Typ)	Kaninchen	Alomone Labs, Israel
Anti-Cav2.2 (N-Typ)	Kaninchen	Alomone Labs, Israel

Anti-Ca _v 3.1 (T-Typ)	Kaninchen	Alomone Labs, Israel
Anti-Cisplatin (R-C18)	Ratte	AG Thomale, Deutschland

Tab. 5 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Alexa Fluor 488 Anti-Maus	Ziege	Life Technologies, Deutschland
Alexa Fluor 555 Anti-Kaninchen	Ziege	Life Technologies, Deutschland
Cy3 Anti-Kaninchen	Ziege	Dianova GmbH, Deutschland
Cy3 Anti-Ratte	Kaninchen	Dianova GmbH, Deutschland

2.5 Reagenzien für die Verwendung in der Immunocytochemie/Immunohistochemie

Tab. 6 Reagenzien für die Immunocytochemie/Immunohistochemie

Bezeichnung	Hersteller
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Immu-Mount	Thermo Scientific, Deutschland

2.6 Puffer, Lösungen und Medien

2.6.1 Medien und Lösungen für Zellkulturen

Tab. 7 Medien und Lösung für die Zellkultur

Medium/Lösung	Zusammensetzung
Collagenase-Lösung	F-12 Medium
DRG-Neuronen Medium	F-12 Medium 10 % (v/v) HS 0,2 % (v/v) NGF
Trypsin-Lösung	F-12 Medium 10 % (v/v) Trypsin

2.6.2 Lösungen für die elektrophysiologischen Untersuchungen

Tab. 8 Lösungen für die elektrophysiologischen Untersuchungen

Lösung	Zusammensetzung (in A. bidest.)
Internal Solution for Calcium Currents ISCC (Pipettenlösung)	140 mM CsCl 10 mM HEPES 10 mM EGTA 4 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O pH-Wert auf 7,2 mit TEA-OH 2 mM Na-ATP

Calcium Channel Current External Solution CCCES (Badlösung)	130 mM TEA 10 mM Glucose 1 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES pH-Wert auf 7,3 mit TEA-OH 10 mM BaCl ₂ 1 µM TTX-Lösung
TTX-Lösung 100 mM	1 mg TTX 31,3 µl A. bidest.

2.6.3 Lösungen und Puffer für die Immunocytochemie/Immunohistochemie

Tab. 9 Lösungen und Puffer für die Immunocytochemie/Immunohistochemie

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Block-Lösung 5 %	PBS 100 g/l Milchpulver
Paraformaldehyd 4 % (PFA)	PBS 40 g/l PFA
PBS	137 mM NaCl 3 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH-Wert 7,3 in A. bidest

PBS/A	PBS 1 g/l BSA
PBS/T	PBS 0,1 % (v/v) Tween 20
Permeabilisationslösung	PBS 0,5 % (v/v) Triton X-100

2.7 Versuchstiere

Für die Kultivierung von DRG-Neuronen wurden adulte Wistar-Ratten (beider Geschlechter) im Alter von drei Wochen (60-80 g) verwendet. Für die Verhaltensexperimente wurden adulte männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 120-150 g verwendet (Charles River, Erkrath, Deutschland). Die Haltung der Tiere erfolgte im Zentralen Tierlabor der Universität Duisburg-Essen in Käfigen mit bis zu vier Tieren. Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser (*ad libitum*) und wurden in einem 14/10 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Tiere, welche durch das Zentrale Tierlabor zur Verfügung gestellt wurden, konnten direkt nach Bereitstellung für die Experimente verwendet werden.

Alle Experimente wurden unter Beachtung der Tierschutzrichtlinien der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Die Verhaltensexperimente wurden zuvor durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (TSG-Nr.: 1382/13).

2.8 Zellkultur

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Flow-Hood durchgeführt. Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % im Brutschrank kultiviert. Die Desinfektion des Arbeitsplatzes erfolgte mit 70 %-igem Ethanol.

2.8.1 Präparation und Kultivierung von DRG-Neuronen

Zur Isolation von DRG-Neuronen wurden die Tiere mit inhalativem Isofluran narkotisiert. Mit dem Ausbleiben von Schmerzreflexen erfolgte die Dekapitation der Tiere. Die Wirbelsäule wurde entfernt und von dorsal mit einer Schere geöffnet. Das Rückenmark wurde mit einer Pinzette entfernt, die DRGs entnommen und in F12-Medium gesammelt. Unter optischer Kontrolle wurden die Spinalnerven der DRGs entfernt und die Kapseln der Ganglien angeschnitten. Die Kapseln wurden in Collagenase-Lösung (2612,5 U/ml; 0,9 ml F12-Medium und 0,1 ml Collagenase) überführt und für 45 min im Brutschrank inkubiert. Um die Collagenase zu entfernen, wurden die Ganglien dreimal in F12-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Ganglien in Trypsin (2525 U; 0,9 ml F12-Medium und 0,1 ml Trypsin) überführt und für 2 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Ganglien zweimal in F12-Medium gewaschen und in 0,7 ml F12-Medium überführt. Die Ganglien wurden mit einer Pipette trituriert bis es zum Austritt der DRG-Neurone kam (Eintrüben der Lösung). 50 µl dieser Zellsuspension wurden in der Mitte einer Kulturschale (Falcon Easy Grip 35 x 10 mm) platziert und für 2 h im Brutschrank inkubiert, um eine Adhäsion der Neuronen zu ermöglichen. Nach dem Anwachsen der DRG-Neuronen auf der Kulturschale wurden die Zellen mit 1 ml DRG-Neuronen-Medium pro Schale versehen. Bis zur Nutzung erfolgte die Kultivierung der DRG-Neurone im Brutschrank.

2.8.2 DRG-Neuronen Kulturen aus *in vivo* behandelten Tieren

Zur *in vivo* Behandlung wurden Tiere einmalig mit Cisplatin (2,3 mg/kg) (i.p.) für 24 h behandelt. Anschließend wurden die DRG-Neurone, wie unter 2.8.1 beschrieben, entnommen und kultiviert.

2.9 Elektrophysiologie

Zur Isolation von $I_{Ca(V)}$ von DRG-Neuronen wurde die Patch-Clamp Technik verwendet. Alle gemessenen Ströme wurden in der „whole-cell“ Konfiguration abgeleitet.

2.9.1 Patch-Clamp

Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik ist es möglich Ströme von Einzelkanälen oder Ganzzellströme von Zellen zu messen. Bei dieser von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten Technik werden mit Hilfe einer Glaselektrode, einer sogenannten Mikropipette, die Ströme an der Zellmembran von Neuronen abgeleitet (Neher & Sakmann, 1976). Der Durchmesser der Mikropipetten beträgt in der Regel ca. 1 μm und hat, je nach Experiment und Zelltyp, einen elektrischen Widerstand von 0,5-25 Megaohm ($\text{M}\Omega$). Durch das Annähern der Mikroelektrode an die Zellmembran kommt es zu einem Ansteigen des Elektrodenwiderstandes auf mehrere Gigaohm ($\text{G}\Omega$), dem sogenannten Gigaseal. Dieser Anstieg ist darauf zurückzuführen, dass die Membran der Zelle die Öffnung der Mikropipette zunehmend verschließt. Das Membranstück, welches sich hierbei in der Öffnung der Pipette befindet, wird als „Patch“ bezeichnet.

Es gibt vier verschiedene Patch-Clamp Konfigurationen, welche als A) „Cell-attached“, B) „inside-out“, C) „whole-cell“ und D) „outside-out“ bezeichnet werden. Drei dieser Konfigurationen (A, B, D) erlauben das Ableiten von Strömen einzelner Ionenkanäle, welche sich im „Patch“ befinden. Mit der „whole-cell“ Konfiguration ist es möglich die Ströme der Ionenkanäle der Zellmembran zu messen (Abb. 7).

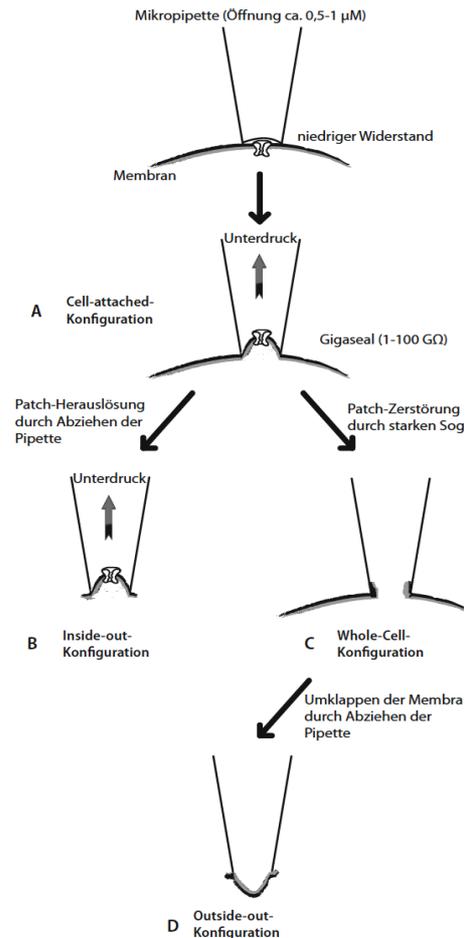


Abb. 7 Verschiedene Konfigurationen der Patch-Clamp Technik zur Ableitung von Ionenkanalströmen. **A)** Die Konfiguration „cell-attached“ wird durch die Herstellung eines Seals zwischen Pipette und Zellmembran erreicht. **B)** Wird die Pipette aus der „cell-attached“ Konfiguration von der Membran abgezogen, reißt ein Stück der Membran (Patch) ab und die „inside-out“ Konfiguration ist erreicht. **C)** Wird in der „cell-attached“ Konfiguration ein starker Unterdruck angelegt, führt dies zum Zerreißen der Membran innerhalb der Pipette und es kann über die gesamte Membran abgeleitet werden (whole-cell). **D)** Wird aus der „whole-cell“ Konfiguration die Pipette abgezogen führt dies zur „outside-out“ Konfiguration (nach Hermeijer et al., 2010).

2.9.2 Patch-Clamp Stand

Die elektrophysiologischen Ableitungen von Ionenkanalströme erfolgen am Patch-Clamp Stand (Abb. 8). Um von äußeren elektronischen Einflüssen geschützt zu sein, findet die Ableitung in einem Faraday'schen Käfig statt. Das Mikroskop steht auf einem schwingungsgedämpften Tisch, um Störungen der Messungen durch Erschütterungen zu minimieren. Zur zielgenauen Steuerung der Mikropipetten wird ein Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Deutschland) genutzt. Die Aufzeichnung der Ströme

erfolgt mit Hilfe eines Patch-Clamp Verstärkers (EPC 10, HEKA, Deutschland), sowie einer geeigneten Software (Patchmaster, HEKA, Deutschland).

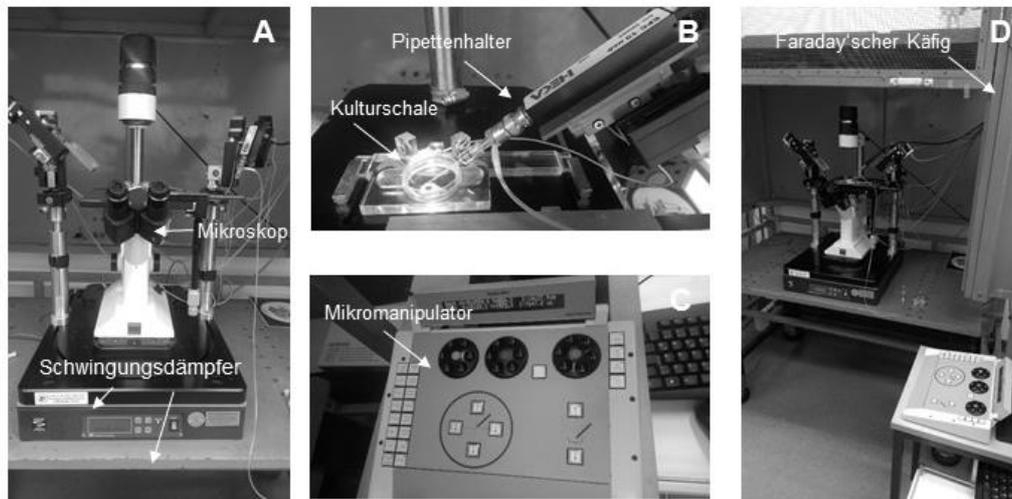


Abb. 8 Patch-Clamp Stand. **A)** Das Mikroskop der Messeinheit befindet sich zum Schutz vor Erschütterungen auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Die Messeinheit wird von einem Faraday'schen Käfig umgeben. **B)** Darstellung der Messkammer, sowie der Mikropipette zur Ableitung von Ionenkanalströmen. **C)** Darstellung der Steuereinheit des Mikromanipulators. **D)** Gesamtüberblick des Patch-Clamp Stands.

2.9.3 Zellkulturen für die Patch-Clamp-Messung von $I_{Ca(V)}$

Zur Isolation von $I_{Ca(V)}$ wurden DRG-Neuronen, wie unter 2.8.1 beschrieben, präpariert. Für die Untersuchung des Einflusses von Cisplatin auf $I_{Ca(V)}$ wurden die DRG-Neurone für 24 h bzw. für die jeweilige, durch das Experiment vorgegebene, Zeit kultiviert.

2.9.4 Patch-Clamp Messungen von $I_{Ca(V)}$

Zur Isolation von $I_{Ca(V)}$ wurden „whole-cell“ Patch-Clamp Messungen an DRG-Neuronen (Durchmesser $<25 \mu\text{m}$) durchgeführt. Hierfür wurden Mikropipetten paarweise aus filamentartigem Borosilikatglas (1,5 mm AD x 0,86 mm ID x 100 mm L; Bio Medical Instruments) mit einem Pipetten-Puller (PIP6, HEKA, Deutschland) unter Einwirkung von Zug und Hitze gezogen. Die dadurch entstandenen Mikropipetten wiesen bei Kontakt mit der Badlösung einen Widerstand von 3-7 M Ω auf. Zur Ableitung von $I_{Ca(V)}$ wurden die Pipetten mit ISCC-Lösung (2.6.2) befüllt. Die Patch-Clamp Messung erfolgte bei einer definierten Spannung („Voltage-Clamp“) von -80 mV. Vor

Beginn der Messung wurde das Kulturmedium aus den Kulturschalen entfernt und gegen CCCES (2.6.2) getauscht. Mit Hilfe des Mikromanipulators (SM-5; Luigs & Neumann, Deutschland) wurde die Mikropipette nahe an die Membran des zu messenden DRG-Neurons gebracht, so dass das Gigaseal erreicht wurde. Das Membranpotential wurde bei -80 mV angelegt und die VGCC durch Depolarisation auf 0 mV für 150 ms aktiviert. Anschließend konnte mit verschiedenen Strom-Spannungsprotokollen (2.9.5) gemessen werden.

Die Isolation der einzelnen VGCC-Subtypen erfolgte durch die kombinierte Gabe von selektiven Calciumkanalblockern. $I_{Ca(V)}$ des L-Typs wurden durch Nimodipin (1 μ M) blockiert. Die Inhibition von P-/Q-Typ $I_{Ca(V)}$ erfolgte durch Agatoxin (0,2 μ M). T-Typ Ströme wurden durch Pimozide (100 nM) und $I_{Ca(V)}$ des N-Typs durch ω -Conotoxin (1 μ M) blockiert.

2.9.5 Patch-Clamp Protokolle

Stromzeitverlauf von $I_{Ca(V)}$

Zur Bestimmung der Stromzeitverläufe von $I_{Ca(V)}$ und $I_{Ca(V)}$ -Subtypen wurden die DRG-Neurone ausgehend von ihrem Haltepotential von -80 mV wiederholt auf 0 mV für 150 ms depolarisiert. Nach der Aufnahme von zehn Kontrolldepolarisationen erfolgte die Applikation von Cisplatin und weitere Depolarisationen wurden bis zum Erreichen eines Steady-States aufgezeichnet.

Strom-Spannungskurve von $I_{Ca(V)}$

Zur Aufzeichnung von Strom-Spannungskurven (IV) wurde das Haltepotential auf -60 mV festgelegt und die Neuronen schrittweise mit einem Inkrement von 10 mV auf +50 mV depolarisiert. Nach Aufnahme von zwei Kontroll-IVs wurde Cisplatin appliziert und es folgte die Aufnahme weiterer IVs.

Aktivitätsabhängigkeit von $I_{Ca(V)}$

Zur Bestimmung der Aktivitätsabhängigkeit des Cisplatin-Effekts auf $I_{Ca(V)}$ wurden die Neurone von -80 mV auf 0 mV wiederholt depolarisiert. Nach zehn Kontrolldepolarisationen erfolgten die Applikation von Cisplatin, sowie eine Messpause von 150 s. Anschließend wurden weitere Depolarisationen aufgezeichnet.

Einfluss der Proteinkinase C an der Modulation von $I_{Ca(V)}$ durch Cisplatin

Zur Überprüfung des Einflusses von Proteinkinase C (PKC) an der von Cisplatin-vermittelten Zunahmen von $I_{Ca(V)}$ von N-Typ VGCC wurden die DRG-Neurone für 10 min mit Chelerythrinchlorid (PKC-Inhibitor) inkubiert und anschließend Stromzeitverläufe vor und nach Applikation von Cisplatin aufgezeichnet.

Die vor der Applikation von Cisplatin ausgelösten Membranströme wurden aufgezeichnet und als Kontrollwerte definiert und dienten als prozentuale Bezugsgröße für die Änderung der Strom-Amplitude nach Cisplatin-Applikation.

Stromdichte-Messung

Wurden die DRG-Neuronen für 24 h oder 48 h mit Cisplatin inkubiert, erfolgten Stromdichte-Messungen von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und mit Cisplatin behandelten Zellen. Hierfür wurden die Neuronen zehnmals von -80 mV auf 0 mV depolarisiert. Es wurde der mittlere Strom in nA ermittelt, der Quotient aus mittlerem Strom [nA] und der Kapazität [nF] der jeweiligen Zelle berechnet und als Stromdichte [nA/nF] definiert.

Einfluss der Calmodulinkinase II auf die Stromdichten von N-Typ VGCC

Zur Ermittlung des Einflusses der Calmodulinkinase II (CaMK II) auf die Stromdichte von N-Typ VGCC wurden kultivierte DRG-Neuronen mit KN-93 (CaMK II-Inhibitor) 10 min vorbehandelt und mit Cisplatin für 24 h ko-inkubiert und Stromdichte-Messungen durchgeführt.

2.9.6 Auswertung der Patch-Clamp Messungen

Die Auswertung der Patch-Clamp Messungen erfolgte mit Hilfe der Patchmaster Software und Microsoft Excel.

Die Korrektur der „Leck-Ströme“ erfolgte durch ein P/4-Protokoll der Patchmaster Software. Bei „Leck-Strömen“ handelt es sich um Ströme, welche über einen Pfad fließen, der nicht zur Leitung des Stroms vorgesehen ist. Dadurch kann es zur Verfälschung der Messergebnisse kommen.

Kam es unter Kontrollbedingungen bereits zu einer kontinuierlichen Abnahme des gemessenen Stroms („Rundown“) wurde dieser korrigiert. Die Berechnung des „Rundowns“ erfolgte über die zehn gemessenen Ströme vor Applikation.

Die Berechnungen der Stromänderungen erfolgten prozentual. Hierbei wurden alle Ströme auf den Mittelwert der Kontrollströme vor Applikation normalisiert (=100 %).

Die statistische Auswertung der elektrophysiologischen Daten erfolgte mit Hilfe des Student-t-Tests (zweiseitig). Eine Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ akzeptiert.

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm „Standard Error of Mean“ (SEM) angegeben.

2.10 Immunozyto- und immunohistochemische Färbungen

2.10.1 Zellkulturen für immunozytochemische (ICC) Färbungen nach Cisplatin-Inkubation

Für ICC-Färbungen wurden DRG-Neurone, wie unter 2.8.1 beschrieben, präpariert. Die DRG-Neurone wurden mit Cisplatin inkubiert und für 24 h kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte DRG-Neurone.

2.10.2 Anfertigung von Kryoschnitten für die immunohistochemischen (IHC) Färbungen nach *in vivo* Cisplatin-Applikation

Für die Anfertigung von Kryoschnitten von DRGs wurden Tiere einmalig mit Cisplatin (2,3 mg/kg) (i.p.) für 24 h behandelt. Anschließend erfolgte die schmerzfreie Tötung in Isofluran-Narkose und die Entnahme der DRGs. Als Kontrolle dienten DRGs unbehandelter Tiere. Die DRGs wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu Anfertigung der Schnitte bei -80°C aufbewahrt.

Die Anfertigung der 9 μm dicken Schnitte erfolgte an einem Kryostaten. Die Schnitte wurden aufgenommen und auf einen Objektträger (Super Frost Gold, Deutschland) aufgetragen. Bis zu den IHC Färbungen wurden die Schnitte im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.10.3 Immunozytochemische Färbungen

Zur Bestimmung des Proteinlevels der verschiedenen VGCC-Subtypen, sowie zur Bestimmung der apoptotischen Zellen nach Cisplatin-Exposition für 24 h, wurden ICC durchgeführt.

Zu Beginn der ICC wurde das Kulturmedium entfernt und die DRG-Neurone für 15 min mit 4 %-igem PFA fixiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift in PBS für jeweils 5 min. Zur Permeabilisierung der Membran wurden die Neurone mit Permeabilisationslösung für 15 min behandelt und anschließend dreimal in PBS für 5 min gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden die DRG-Neurone für 30 min mit Block-Lösung behandelt. Es folgte dreimaliges Waschen in PBS für je 5 min. Je nach Versuch wurden unterschiedliche Primär- und Sekundärantikörper verwendet (Tab. 2.10). Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in PBS/A für 1 h. Nach einmaligem Waschen in PBS/T für 5 min, folgten zwei Waschrunde in PBS. Die Inkubation des fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte in PBS/A für 1 h im Dunkeln. Es folgte das einmalige Waschen in PBS/T, sowie zweimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 min (dunkel). Zur Darstellung der Kern-DNA wurden die DRG-Neurone für 15 min mit DAPI (1:100, PBS) behandelt. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit Immu-Mount eingedeckelt.

Tab. 10 Verwendete Antikörper und Verdünnungen für ICC

Nachzuweisendes Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
L-Typ VGCC	Anti-Cav1.1, Kaninchen, 1:200	Alexa Fluor 555, Goat anti Rabbit 1:500
N-Typ VGCC	Anti-Cav2.2, Kaninchen, 1:200	Alexa Fluor 555, Goat anti Rabbit 1:500

P-/Q-Typ VGCC	Anti-Cav2.1, Kaninchen, 1:200	Alexa Fluor 555, Goat anti Rabbit 1:500
T-Typ VGCC	Anti-Cav3.1, Kaninchen, 1:200	Alexa Fluor 555, Goat anti Rabbit 1:500
β -III-Tubulin (Neuronenmarker)	Anti- β -III-Tubulin, Maus, 1:500	Alexa Fluor 488, Goat anti Mouse 1:500
Caspase-3 (Apoptosemarker)	Anti-Caspase-3, Kaninchen 1:500	Alexa Fluor 555, Goat anti Rabbit 1:500

2.10.4 Immunohistochemische Färbungen

Zur Bestimmung des Proteinlevels der N-Typ VGCC nach *in vivo* Cisplatin-Applikation wurden IHC durchgeführt.

Zur Durchführung von IHC wurden DRG-Schnitte, wie unter 2.10.2 beschrieben, angefertigt. Die IHC erfolgte wie unter 2.10.3 beschrieben. Jedoch wurden die Schnitte nicht in PFA, sondern in Methanol bei -20°C fixiert. Eine Permeabilisation war nicht nötig. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.11 dargestellt.

Tab. 11 Verwendete Antikörper und Verdünnungen für IHC

Nachzuweisendes Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
N-Typ VGCC	Anti-Cav2.2, Kaninchen, 1:200	Alexa Fluor 555, Goat anti Rabbit 1:500

2.10.5 Immunozytischer Assay (ICA) zur Darstellung von Platin/DNA-Addukten

Zur Darstellung von Cisplatin/DNA-Addukten wurden DRG-Schnitte, wie unter 2.10.2 beschrieben, angefertigt und ICA-Färbungen durchgeführt.

Zu Beginn der ICA-Färbungen wurden die Zellen der jeweiligen Schnitte mittels Methanol für 30 min bei -20°C auf dem Objektträger fixiert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Die Entspiralisierung der DNA erfolgte in Alkalilösung (60% 70 mM NaOH / 140 mM NaCl, 40 % Methanol) für 5 min bei 4°C. Hierdurch sollte eine bessere Zugänglichkeit des Antikörpers an die DNA gewährleistet werden. Nach erneutem Waschen der Schnitte in PBS, erfolgte der Verdau der Zellproteine und die Inaktivierung von endogenen DNAsen und RNAsen durch die Inkubation in Pepsinlösung (800 µg/ml) für 10 min bei 37°C. Nachfolgend wurden die Schnitte mit einer Pepsin- bzw. Proteinkinase K-Lösung (100 µg/ml) behandelt. Im Anschluss wurden die Schnitte für 10 min in einem Gemisch aus PBS/Glycin (1:1) gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte für 30 min mit Block-Lösung behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers (Tab. 12) in PBS/A bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte einmal in PBS/T und anschließend in PBS für jeweils 5 min gewaschen. Die Inkubation des fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers (Tab. 12) erfolgte für 1 h bei 37°C in einer Feuchtkammer. Anschließend wurden die Schnitte erneut in PBS/T und PBS für jeweils 5 min gewaschen. Zur Darstellung der Kern-DNA wurden die Schnitte für 15 min mit DAPI (1:100, PBS) behandelt. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde eine Antifading Mounting Solution auf die Objektträger aufgetragen und die Schnitte eingedeckelt.

Tab. 12 Verwendete Antikörper und Verdünnungen für ICA

Nachzuweisendes Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Cisplatin/DNA-Addukte	R-C18, Ratte, 0,02 µg/ml	Cy3 Rabbit anti Rat, 1:500

2.10.6 Auswertung der ICC und IHC

Die Aufnahmen der ICC und IHC wurden an einem Axioplan (Zeiss, Deutschland) aufgenommen. Die Auswertung der Fluoreszenz bei Expressionsstudien wurde mit Hilfe der Software „Image J“ (NIH, USA) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Messung der Fluoreszenz aller positiv markierten Neuronen.

Die Berechnung des Fluoreszenzwertes (corrected total cell fluorescence, CTCF) erfolgte mit folgender Formel:

CTCF = Integrated Density – (Area of selected cell x Mean of fluorescence of background readings)

Die gemessenen/errechneten CTCF-Werte der behandelten Zellen wurden auf die CTCF-Werte der Kontrollzellen normalisiert (Kontrolle = 1).

Zur Bestimmung des apoptotischen Anteils an DRG-Neuronen wurden alle β -III-Tubulin markierten Neurone gezählt und der Anteil an Caspase-3 positiv markierten Neuronen berechnet.

Alle Werte wurden als Mittelwert \pm “Standard Error of Mean” (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Students-t-Tests (zweiseitig). Eine Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ akzeptiert.

2.10.7 Auswertung der ICA

Die Auswertung der ICA-Färbungen erfolgte durch optische Kontrolle. Zellen galten als positiv, wenn diese im Overlay der DAPI- und Cisplatin-Färbung violett erschienen. Eine quantitative Auswertung, zur Bestimmung des Cisplatin-Gehalts wurde nicht durchgeführt.

2.11 Testungen des Schmerz-assoziierten und motorischen Verhaltens

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Verhaltenstestungen wurden von einem verblinden Experimentator durchgeführt. Zur Einhaltung der Tierschutzrichtlinien wurde versuchsbegleitend der Allgemeinzustand der Tiere durch die Beobachtung ihres Verhaltens, des Bewegungsmusters, sowie durch Kontrolle des Gewichts überprüft.

2.11.1 Behandlung- und Zeitverlaufsschema

Die Behandlung und Testung der Tiere erfolgte nach einem vorab definierten Behandlungs- und Zeitverlaufsschema (Abb. 9).

An den ersten drei Tagen des Experiments wurden die Kontrollwerte (Baseline) aller unbehandelten Tiere aufgenommen. Ab Tag vier erfolgten die Applikationen. Cisplatin wurde in zwei Zyklen zu jeweils vier Tagen, mit einer viertägigen Pause zwischen den einzelnen Zyklen verabreicht. Die Applikation erfolgte i.p. Die Gabe von ω -Conotoxin bzw. NaCl erfolgte i.v. täglich für 12 Tage.

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt (n=7 je Gruppe). Jedes Tier bekam ihrer Gruppe und dem Behandlungsplan entsprechende Applikationen.

Gruppe 1: Cisplatin (1,5 mg/kg) + NaCl

Gruppe 2: Cisplatin (1,5 mg/kg) + ω -Conotoxin (0,02 μ g/kg)

Gruppe 3: Cisplatin (1,5 mg/kg) + ω -Conotoxin (0,2 μ g/kg)

Hieraus ergaben sich kumulative Gesamtdosen von Cisplatin von 18 mg/kg für jede Gruppe. Gruppe 2 erhielt insgesamt zusätzlich ω -Conotoxin in einer Gesamtdosis von 0,24 μ g/kg, Gruppe 3 ω -Conotoxin in einer Gesamtdosis von 2,4 μ g/kg.

Die ersten Verhaltenstestungen erfolgten vor Beginn der Applikationen und dienten der Aufnahme von Kontrolldaten. Nach Applikationsbeginn erfolgten die ersten Testungen an Tag 8, während der zwei Zyklen der Cisplatin-Applikation. Weitere Testungen folgen nach Beendigung der Applikationen an den Tagen 17, 24 und 31.

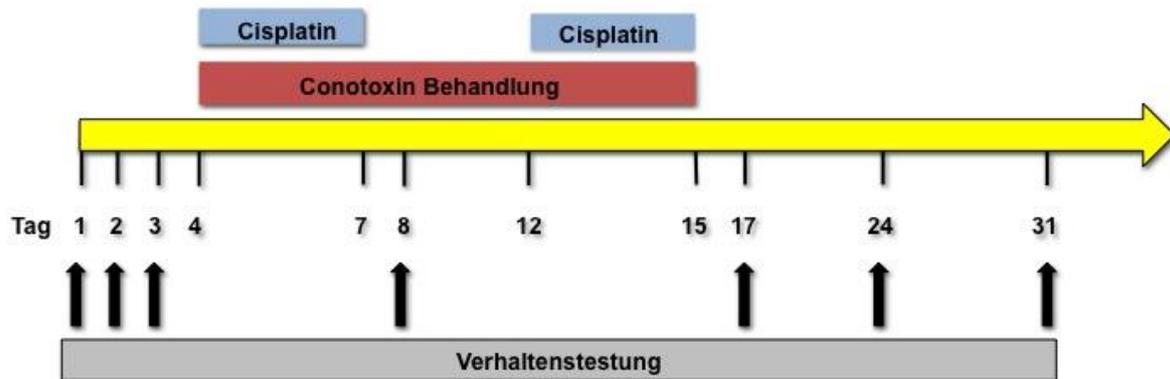


Abb. 9 Behandlungs- und Zeitverlaufsschema der Testungen des Schmerz-assoziierten Verhaltens nach Applikation von Cisplatin und ω -Conotoxin *in vivo*. Die Aufnahme der Baseline aller unbehandelten Tiere erfolgte an den Tagen 1-3. Die Behandlung der Tiere mit Cisplatin und Cisplatin/ ω -Conotoxin erfolgte ab Tag 4 und endete an Tag 15. Die Testungen der behandelten Tiere erfolgten an den Tagen 8, 17, 24 und 31 (Original; M. Leo).

2.11.2 Rotarod

Zur Überprüfung der motorischen Fähigkeiten wurden Rotarod-Testungen durchgeführt. Hierfür wurden die unbehandelten Tiere an Tag 1 und 2 des Experimentes trainiert. An Tag 3 erfolgte die Aufzeichnung.

Die Geschwindigkeit des Rotarods betrug 15 Umdrehungen pro Minute (rpm). Die Zeitmessung der Laufdauer begann mit dem Laufen der Tiere und endete automatisch mit dem Herunterfallen vom Rotarod. Es wurden je Tier und Testung drei Werte dokumentiert und Mittelwerte gebildet. Die Testungen der behandelten Tiere erfolgten an Tag 8, 17, 24 und 31.

2.11.3 Testung der taktilen Allodynie

Zur Testung der taktilen Allodynie befanden sich die Tiere in transparenten Plastikboxen (17 cm x 17 cm x 13 cm) auf einem Gitterrost aus Edelstahl (Größe der Poren 0,6 cm x 0,6 cm). Die Testung der taktilen Allodynie erfolgte mit sogenannten von Frey Haaren (Ugobasile) verschiedener Stärke, welche einen definierten Druck auf die Pfote des Tiers ausüben (Abb. 10). Hierbei wurde das von Frey Haar senkrecht an die Plantarsole der Tiere herangeführt und für etwa drei Sekunden gehalten, so dass dieses eine Flexion aufwies. Als Schmerz-assoziierte Reaktion bzw. als Unbe-

haglichkeit (positive Antwort) wurde ein sofortiges Wegziehen, Anheben oder Schütteln der Pfote gedeutet. blieb eine Reaktion aus wurde dies als negative Antwort vermerkt (Chaplan et al., 1994). Konnte kein eindeutiges Ergebnis festgestellt werden, wurde der Vorgang wiederholt.

Die verschiedenen Stärken der von Frey Haare wurden sequentiell nach der „Up-and-Down“ Methode dem Tier präsentiert (Dixon, 1980; Chaplan et al., 1994). Mit Hilfe dieser Methode werden die Stimuli in sequentieller Weise präsentiert. Dieses erfolgte entweder auf- oder absteigend. Je nach beobachteter Reaktion wurde für den nächsten Stimulus eine Haarstärke tiefer (positive Reaktion), oder höher (negative Reaktion) verwendet. Pro Testung und Tier wurden sechs Testungen vorgenommen. So wurden jeweils die linke und rechte Hinterpfote dreimal getestet.

An den Tagen 1-3 erfolgten die Aufzeichnungen der Kontrollwerte aller unbehandelten Tiere. Die Testungen der behandelten Tiere erfolgten an Tag 8, 17, 24 und 31.



Abb. 10 Testung der taktilen Allodynie. Links: Von Frey Haare auf Edelstahl-Gitterrost. (Quelle: Ugobasile). Rechts: Stimulation von Ratten mit von Frey Haaren. (Quelle: Neurodetective International).

2.11.4 Testung der Hitze-Hyperalgesie

Die Testung der Hitze-Hyperalgesie erfolgte mit dem Hargreaves-Test (Hot-Plate Test). Dafür wurden die Tiere in Plastikboxen (s. 2.11.4) auf einer Plexiglasplatte gehalten (Abb. 12). Mit Hilfe der Hot-Plate (Intensität 50) wurden die Hinterpfoten der Ratten erhitzt und die Rückzugsschwelle der Tiere ermittelt. Die Hitzequelle wurde dabei mittig im hinteren Drittel der Hinterpfote (Abb. 11) platziert. Als deutliches Schmerz-assoziiertes Verhalten wurden das Anheben und Schütteln der Pfote gedeutet (positive Antwort). Das Entfernen der Pfote von der Hitzequelle hatte einen

automatischen Zeitstopp zur Folge. Erfolgte kein Anheben der Pfote innerhalb von 33,3 s führte dies zum automatischen Stopp der Hitzeeinwirkung.

An den Tagen 1-3 wurden die Kontrollwerte der unbehandelten Tiere aufgezeichnet. Die Testung der behandelten Tiere erfolgte an den Tagen 8, 17, 24 und 31. Es wurden je drei Messungen der linken und rechten Hinterpfote aufgezeichnet.

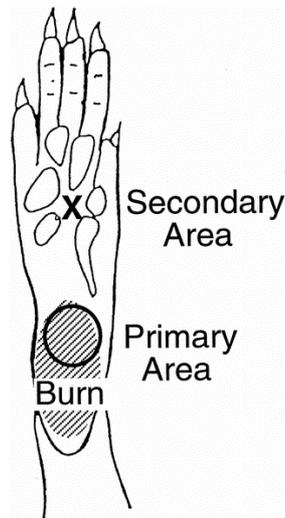


Abb. 11 Areal zur Testung der taktilen Allodynie und der Hitze-Hyperalgesie. Die Testung der taktilen Allodynie erfolgte an der Basis der 3. und 4. Zehe der Hinterpfote (secondary Area). Das Areal zur Testung der Hitze-Hyperalgesie ist durch den Kreis markiert (Primary Area) (aus Nozaki-Taguchi and Yaksh, 2002).



Abb. 12 Aufbau zur Testung der Hitze-Hyperalgesie. Die Testung der Hitze-Hyperalgesie erfolgte mit Hilfe der sogenannten „Hot-Plate“ (Hargreaves-Testung). Hierbei befinden sich die Tiere in einer Plastikbox auf einer Plexiglasscheibe. Unter ihnen befindet sich die Hitze-Quelle, welche mittig unter das letzte Drittel der Pfote platziert wird. (Quelle: Ugobasile, Italien).

2.11.5 Auswertung der Verhaltenstestungen

Für die Testung der motorischen Fähigkeit mit Hilfe des Rotarods wurden je Tier und je Testung drei Zeiten gemessen und der Mittelwert gebildet.

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm „Standard Error of Mean“ angegeben und graphisch dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch ANOVA (Analysis of variance) und wurde mit einem Tukey *post hoc* Test analysiert. Eine Signifikanz wurde akzeptiert, wenn $p < 0,05$ betrug.

Die Ergebnisse der Messung der taktilen Allodynie wurden nach der „Up-and-Down“ Methode ermittelt (Dixon, 1980). Dies beschreibt die Schwelle, bei welcher die getesteten Tiere in 50 % der Fälle ihre Pfote zurückziehen (Chaplan et al., 1994). Hierbei entspricht jede Haarstärkenmarkierung dem Zehnerlogarithmus der jeweiligen Kraft in mg multipliziert mit dem Faktor 10. Die hieraus resultierenden Abfolgen von positiven (X) und negativen (O) Antworten (z.B. XOXXOO) wurden tabellarisch aufgezeichnet.

Die Berechnung der 50 % Rückzugsschwellen erfolgte durch die Verwendung folgender Formel:

$$50\% \text{ Gramm Schwelle} = (10 [X_f + \delta]) / 10000$$

- Mit: X_f = Wert (in logarithmischen Einheiten) des letzten verwendeten von Frey Haars
 k = Wert (aus Tabelle, siehe Dixon, 1980) für das jeweilige Muster positiver und negativer Antworten
 δ = Mittlere Differenz (in logarithmischen Einheiten) zwischen den Stimuli

Schwellenwerte wurden für jedes Tier bei jeder Testung aufgezeichnet und anschließend die Mittelwerte und der „Standard Error of Mean“ für die jeweiligen Gruppen berechnet. Zur Testung der Hitze-Hyperalgesie wurden beide Hinterpfoten der Tiere jeweils dreimal mit einem Abstand von 5 min zwischen den einzelnen Messungen getestet. Die Werte wurden in Abhängigkeit von der Zeit des Experimentes graphisch aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte durch ANOVA (Analysis of vari-

ance) und wurde mit einem Tukey *post hoc* Test analysiert. Eine Signifikanz wurde akzeptiert, wenn $p < 0,05$ betrug.

3. Ergebnisse

3.1 Modulation von $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neuronen durch Cisplatin

Zur Bestimmung des Einflusses von Cisplatin auf $I_{Ca(V)}$ wurden DRG-Neurone der Ratte präpariert und für 24 h kultiviert. Die Isolation von $I_{Ca(V)}$ erfolgte mit Hilfe der „whole cell“ Patch-Clamp Technik. Es wurden die unter 2.9.5 beschriebenen Patch-Clamp Protokolle verwendet.

3.1.1 Zeitverlauf von $I_{Ca(V)}$

Die Depolarisation von DRG-Neuronen, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV auf 0 mV, führte zu einem einwärtsgerichteten Strom durch die VGCC. Nach 10 Depolarisationen unter Kontrollbedingungen wurden Cisplatin-Konzentrationen von 0,01 μM bis 50 μM appliziert (Abb. 13 bis 15). Dabei führte Cisplatin in allen verwendeten Konzentrationen zu einer Reduktion von $I_{Ca(V)}$ (Abb. 13).

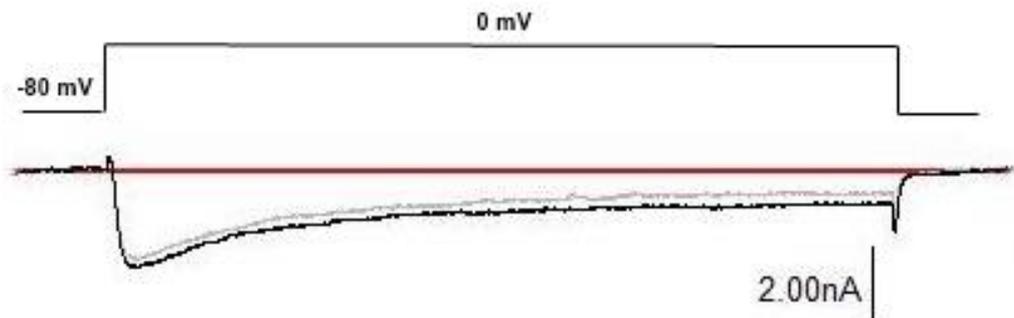


Abb. 13 Beispielhafte Darstellung von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen vor und nach Applikation verschiedener Konzentrationen von Cisplatin. Die Depolarisation der Zelle, ausgehend vom Haltepotential von -80 mV auf 0 mV führt zu einem einwärtsgerichteten Stromfluss durch die VGCC. Nach Applikation von Cisplatin in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM und 50 μM kam es zu einer Reduktion des Stroms. Schwarze Linie: Kontrolle; graue Linie: Strom nach Applikation von Cisplatin.

0,5 μM Cisplatin reduzierte $I_{Ca(V)}$ auf $67,4 \pm 6,2 \%$ mit einem Steady-State nach 580 s (Abb. 14 A). 5 μM Cisplatin führte zu einer Reduktion von $I_{Ca(V)}$ auf $56,8 \pm 6,1 \%$ mit einem Steady-State nach 620 s (Abb. 14 B). Die Stromreduktion anderer Cisplatin-Konzentrationen sind Tabelle 13 zusammenfassend dargestellt.

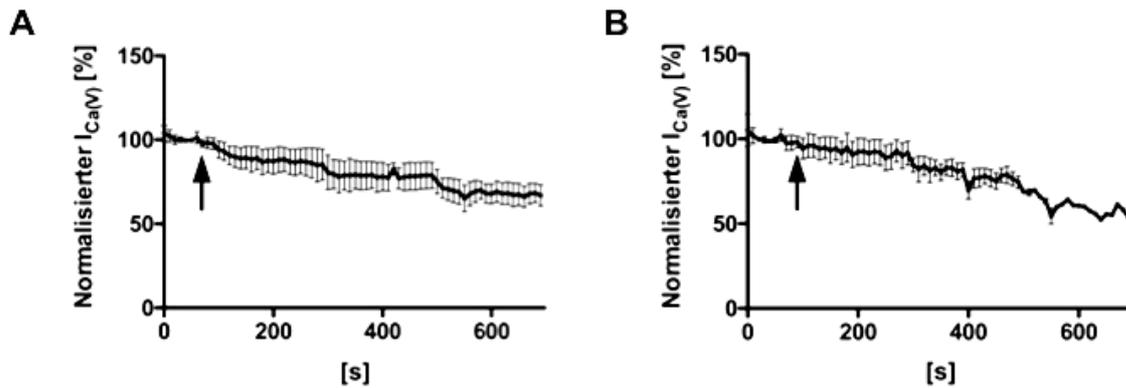


Abb. 14 Zeitverlauf von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen nach wiederholter Depolarisation auf 0 mV und Applikation von Cisplatin. Nach zehn Depolarisationen erfolgte die Applikation von Cisplatin (Pfeil). Cisplatin führte jeweils zu einer Reduktion von $I_{Ca(V)}$ (A-B). $I_{Ca(V)}$ ist jeweils auf den gemittelten Strom unter Kontrollbedingungen normalisiert. **A)** 0,5 μ M Cisplatin (n=5). **B)** 5 μ M Cisplatin (n=5).

Tab. 13 Reduktion von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen durch Cisplatin

Cisplatinkonzentration [μ M]	$I_{Ca(V)}$ nach Applikation [%]	Zeitpunkt des Steady-State [s]	N
0,01	86,1 \pm 0,2	380	5
0,1	80,7 \pm 8,8	530	5
0,5	67,4 \pm 6,2	580	5
1	70,7 \pm 9,0	360	5
5	56,8 \pm 6,1	620	5
50	24,4 \pm 31,3	270	7

$I_{Ca(V)}$ wurde in DRG-Neuronen durch Cisplatin konzentrationsabhängig reduziert. Mit ansteigender Konzentration erfolgte eine zunehmende Reduktion von $I_{Ca(V)}$ (Abb. 15). Die ermittelten Blockaden von $I_{Ca(V)}$ sind in Tabelle 14 dargestellt. Mit keiner der hierbei verwendeten Konzentrationen konnte eine vollständige Blockade (> 80 %) erzielt werden.

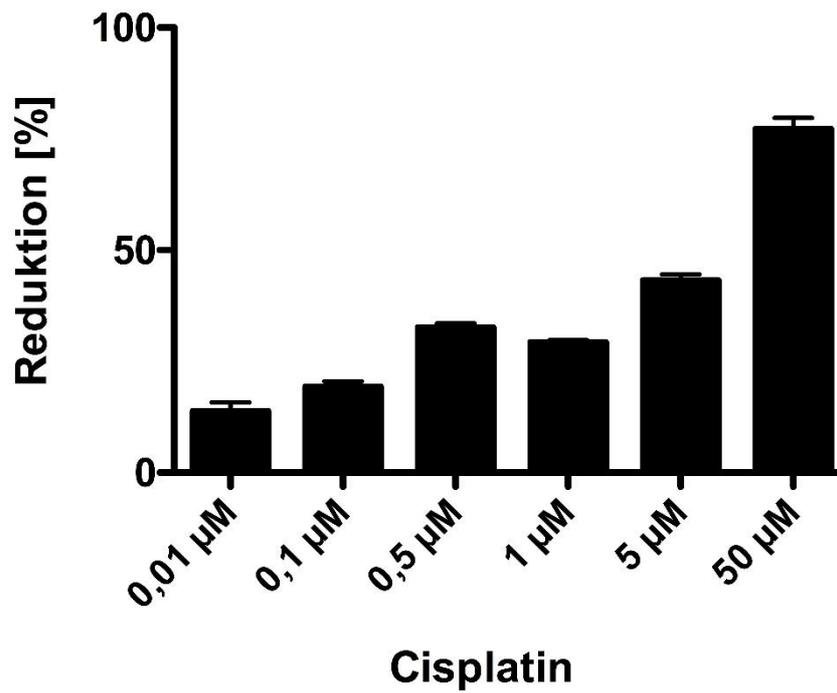


Abb. 15 Prozentuale Blockade/Reduktion von I_{Ca(V)} in kultivierten DRG-Neuronen nach Applikation von Cisplatin. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Reduktion von I_{Ca(V)}.

Tab. 14 Blockade von I_{Ca(V)} nach Applikation von Cisplatin

Cisplatin-Konzentration [µM]	Stromblockade [%]
0,01	13,8 ± 2,0
0,1	19,3 ± 1,1
0,5	32,6 ± 0,8
1	29,3 ± 0,5
5	43,2 ± 1,3
50	77,2 ± 2,5

3.1.2 IV von $I_{Ca(V)}$

Zur Untersuchung des Einflusses von Cisplatin auf die Strom-Spannungskurve von $I_{Ca(V)}$ wurden die Zellen ausgehend vom Haltepotential (-80 mV) mit einem Inkrement von 10 mV auf +50 mV depolarisiert. Die Messung erfolgte vor und nach Applikation von 0,5 μ M bzw. 5 μ M Cisplatin.

Unter Kontrollbedingungen wurde der maximale $I_{Ca(V)}$ bei einer Depolarisation auf -10 mV (0,5 μ M; Abb. 16 A), bzw. bei einer Depolarisation auf -20 mV (5 μ M; Abb. 16 C) bestimmt. Die Applikation von 0,5 μ M und 5 μ M Cisplatin reduzierte den Spitzenstrom über einen Spannungsbereich von -60 mV bis +50 mV (Abb. 16 B und D). Eine Verschiebung des Spitzenstroms erfolgte nicht (Abb. 16 A und C). Die Umkehrpotentiale blieben unverändert.

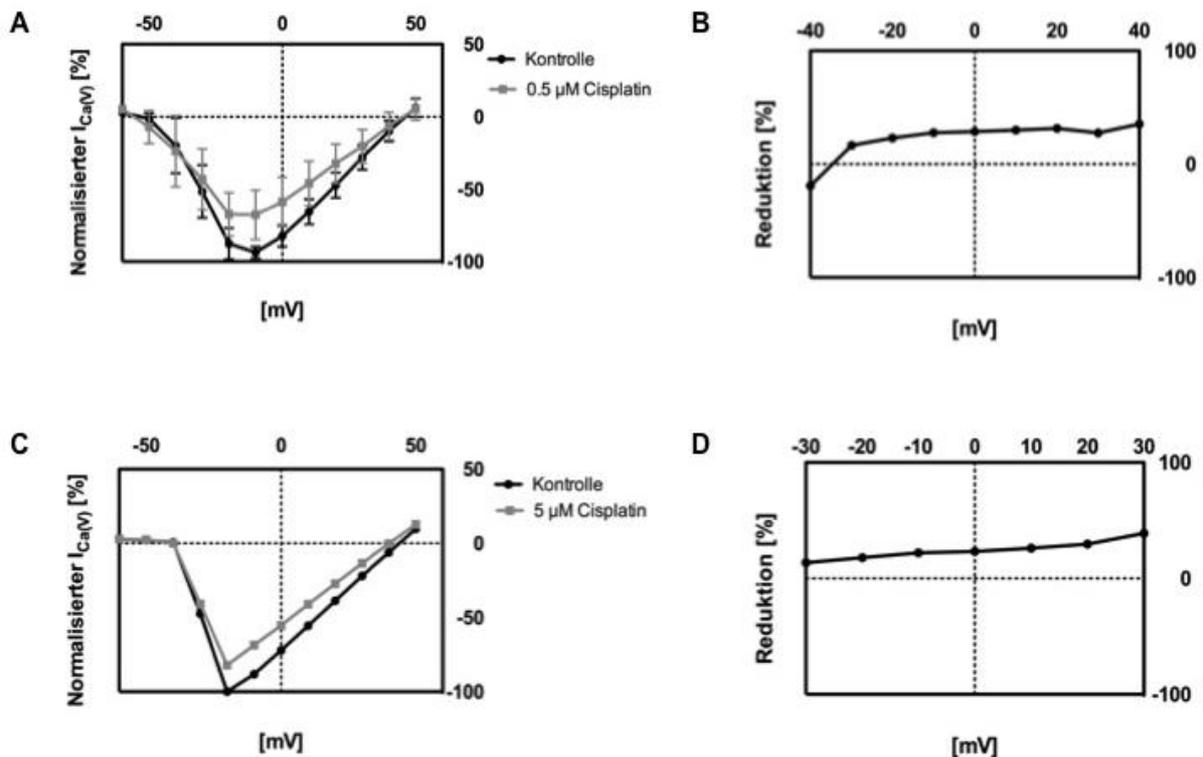


Abb. 16 Strom-Spannungs-Kurven von $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen vor und nach Applikation von Cisplatin. **A)** Die schwarze Linie zeigt $I_{Ca(V)}$ unter Kontrollbedingungen, die grau gestrichelte Linie zeigt $I_{Ca(V)}$ nach Applikation von 0,5 μ M Cisplatin. Es zeigte sich eine Reduktion von $I_{Ca(V)}$. **B)** Spannungsabhängigkeit des Effekts von 0,5 μ M Cisplatin. Die Reduktion von $I_{Ca(V)}$ durch Cisplatin erfolgte im Spannungsbereich von -30 mV bis +40 mV. **C)** Die schwarze Linie zeigt $I_{Ca(V)}$ unter Kontrollbedingungen, die grau gestrichelte Linie zeigt $I_{Ca(V)}$ nach Applikation von 5 μ M Cisplatin. Es konnte eine Reduktion von $I_{Ca(V)}$ nach Cisplatin festgestellt werden. **D)** Spannungsabhängigkeit des Effekts von 5 μ M Cisplatin. Die Reduktion von $I_{Ca(V)}$ durch Cisplatin erfolgte im Spannungsbereich von -40 mV bis +30 mV. (n=5 je Bedingung).

3.2 Aktivitätsabhängigkeit des Effekts von Cisplatin auf $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neuronen

Zur Überprüfung der Aktivitätsabhängigkeit (Use-dependency) des Effekts von Cisplatin auf VGCC wurden Zeitverläufe von $I_{Ca(V)}$ aufgenommen. Hierzu erfolgte eine Messunterbrechung von 150 s nach Applikation von Cisplatin.

Die Reduktion von $I_{Ca(V)}$ nach Cisplatin ist aktivitätsabhängig (Abb. 17). Nach der Applikation von Cisplatin (0,5 oder 5 μM) beträgt $I_{Ca(V)}$ nach der Applikationspause noch $99,4 \pm 0,4 \%$ (0,5 μM , Abb. 17 A) bzw. $99,3 \pm 0,4 \%$ (5 μM , Abb. 17 B). Im weiteren Verlauf kam es zu einer Reduktion von $I_{Ca(V)}$ mit einem Steady-State nach jeweils 390 s.

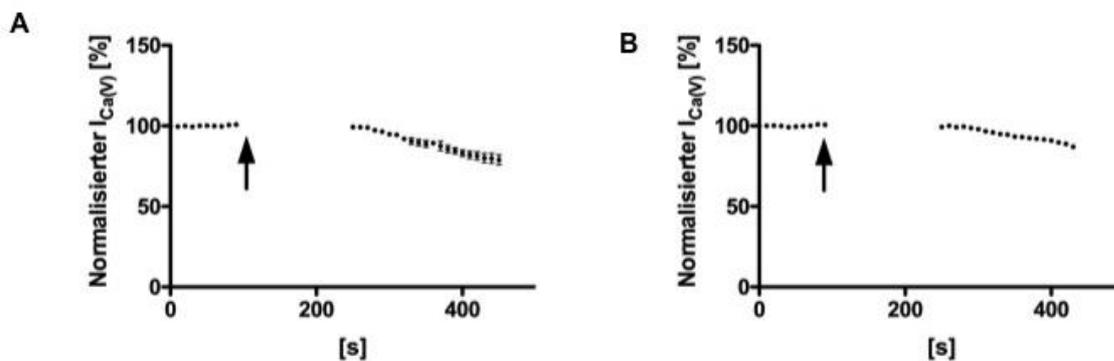


Abb. 17 Use-Dependency des Cisplatin-Effekts auf $I_{Ca(V)}$ in kultivierten DRG-Neuronen. Nach Aufnahme von 10 Kontrollströmen ausgehend von -80 mV auf 0 mV erfolgte die Applikation von 0,5 μM bzw. 5 μM Cisplatin (Pfeil). Es erfolgte eine Messunterbrechung für 150 s. Für die verwendeten Konzentrationen wurde ein aktivitätsabhängiger Effekt auf $I_{Ca(V)}$ nachgewiesen. **A)** 0,5 μM Cisplatin **B)** 5 μM Cisplatin. $I_{Ca(V)}$ ist jeweils auf den gemittelten Strom unter Kontrollbedingungen normalisiert.

3.3 Modulation von $I_{Ca(V)}$ von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen durch Cisplatin

Zur Bestimmung des Einflusses von Cisplatin auf die verschiedenen Subtypen von VGCC wurden diese in DRG-Neuronen durch die Kombination hoch selektiver Calciumkanalblocker (2.9.4) mit der Patch-Clamp Technik isoliert.

3.3.1 Zeitverlauf von $I_{Ca(V)}$ von VGCC-Subtypen

Die Messung des Zeitverlaufs von $I_{Ca(V)}$ Subtypen nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin erfolgte wie bereits für die Ströme der naiven VGCC beschrieben (3.1.1).

Die Depolarisation von -80 mV auf 0 mV führte zu einem einwärtsgerichteten Stromfluss durch alle Subtypen der VGCC (Abb. 18).

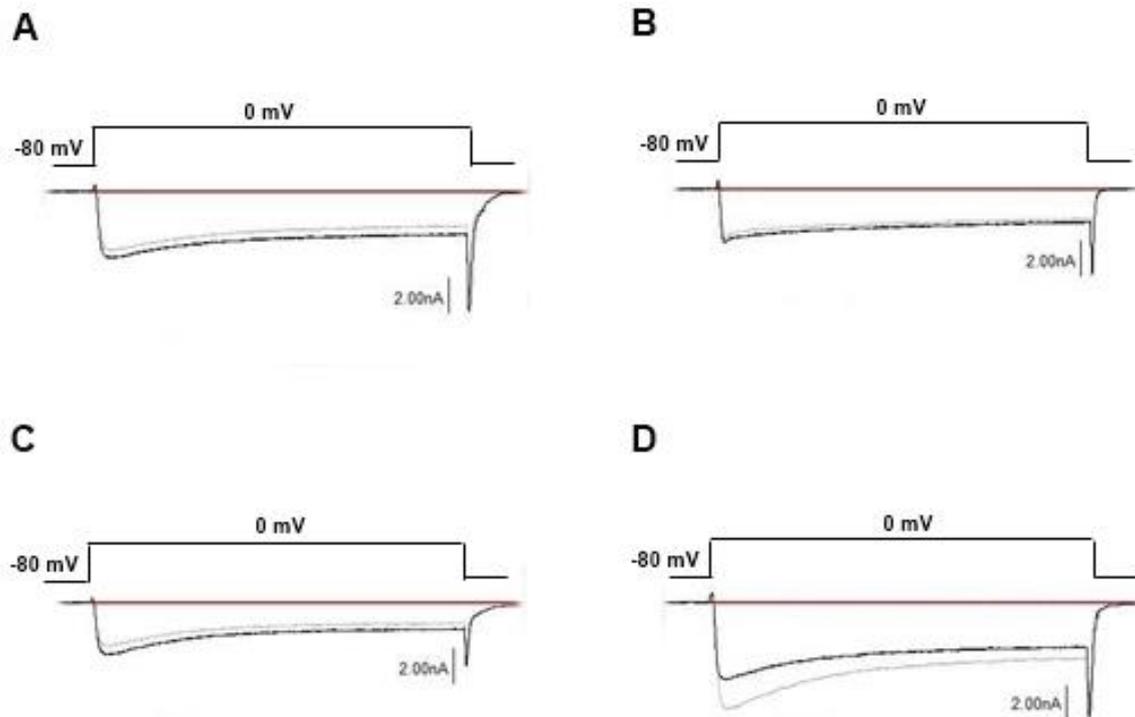


Abb. 18 Beispielströme von $I_{Ca(V)}$ durch VGCC-Subtypen in kultivierten DRG-Neuronen vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin. A-D) Die Isolation von $I_{Ca(V)}$ erfolgte durch die kombinierte Gabe von hoch selektiven Calciumkanalblockern. Durch die Depolarisation der DRG-Neurone von -80 mV (Haltepotential) auf 0 mV kommt es zu einem einwärtsgerichteten Stromfluss (schwarze Linie). Die Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin führt zu einer Veränderung von $I_{Ca(V)}$ (graue Linie). **A) L-Typ $I_{Ca(V)}$. **B)** P-/Q-Typ $I_{Ca(V)}$. **C)** T-Typ $I_{Ca(V)}$. **D)** N-Typ $I_{Ca(V)}$.**

Dabei zeigte sich, dass die einzelnen VGCC-Subtypen unterschiedlich durch Cisplatin moduliert werden. So führte eine Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin bei L-Typ $I_{Ca(V)}$ nach 420 s zu einer Reduktion auf $75,8 \pm 2,3 \%$ (Abb. 19 A). P-/Q-Typ $I_{Ca(V)}$ wurden nach 430 s auf $87,8 \pm 3,7 \%$ reduziert (Abb. 19 B). Der $I_{Ca(V)}$ des T-Typ Kanals wurde durch die Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin nach 470 s auf $69,4 \pm 2,8 \%$ reduziert (Abb. 19 C). Im Gegensatz dazu, führte Cisplatin bei N-Typ $I_{Ca(V)}$ zu einer Vergrößerung auf $130,3 \pm 7,4 \%$ nach 440 s (Abb. 19 D).

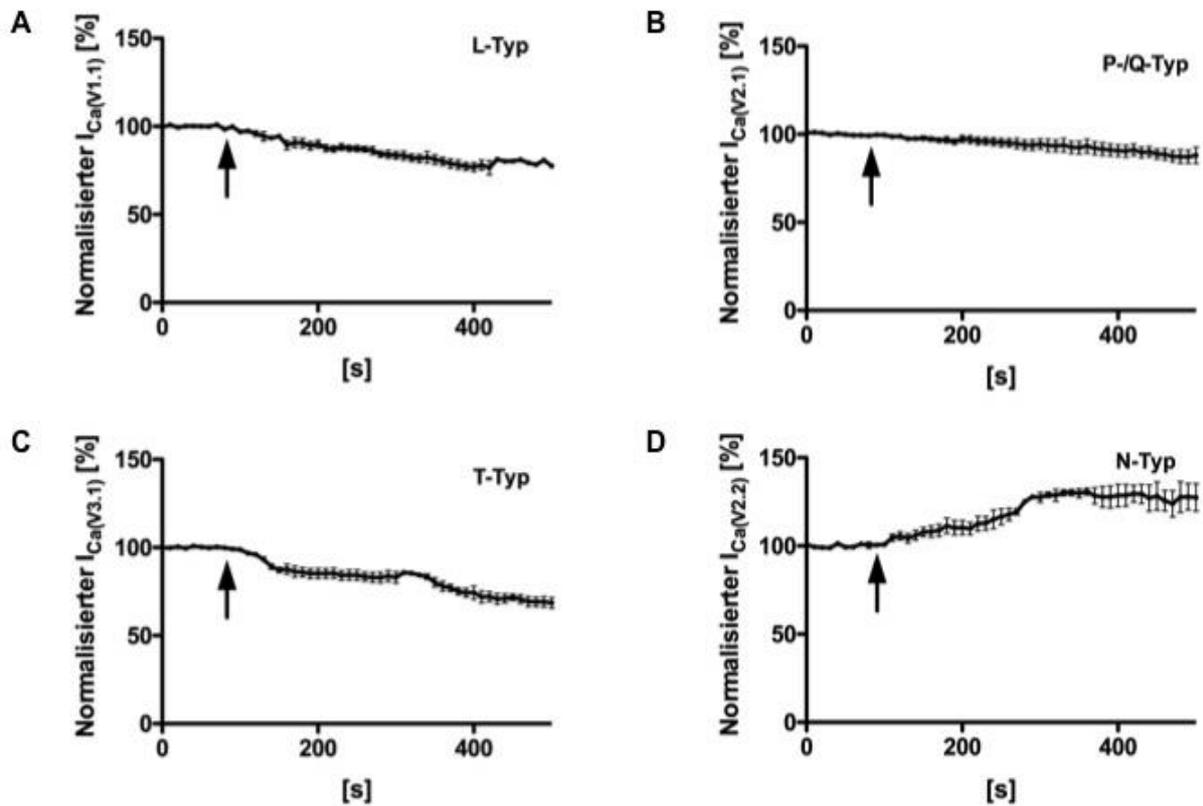


Abb. 19 Zeitverläufe von $I_{Ca(V)}$ durch VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen nach wiederholter Depolarisation von -80 mV auf 0 mV, vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin. Die Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin (Pfeil) führt zu unterschiedlichen Modulationen von $I_{Ca(V)}$ der verschiedenen Subtypen. **A)** Die Applikation von Cisplatin führt zu einer Verringerung von $I_{Ca(V)}$ durch den L-Typ Kanal ($n=5$). **B)** $I_{Ca(V)}$ des P-/Q-Typs wurden auf $87,8 \pm 3,7 \%$ reduziert ($n=5$). **C)** Die Applikation von Cisplatin führte zur Reduktion von $I_{Ca(V)}$ des T-Typs auf $69,4 \pm 2,9 \%$ ($n=5$). **D)** Durch die Applikation von Cisplatin kam es zu einer Erhöhung von $I_{Ca(V)}$ des N-Typs auf $130,3 \pm 7,4 \%$ ($n=5$).

$I_{Ca(V)}$ des L-Typs wurde um $24,2 \pm 2,3 \%$ vermindert. $I_{Ca(V)}$ des T-Typs wurde um $33,5 \pm 0,4 \%$ reduziert. $I_{Ca(V)}$ des P-/Q-Typs wurde um $12,3 \pm 3,7 \%$ reduziert. Die Erhöhung von $I_{Ca(V)}$ durch den N-Typ VGCC betrug $24,2 \pm 2,3 \%$ (Abb. 20).

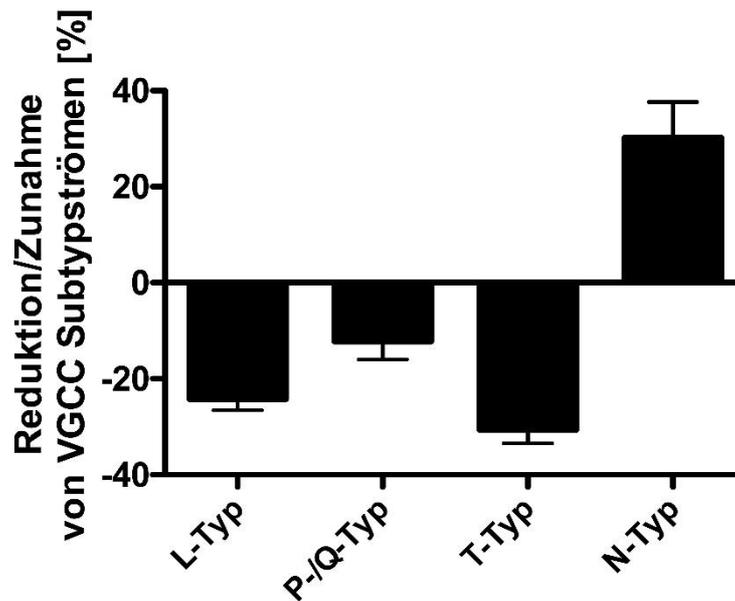


Abb. 20 Modulation der $I_{Ca(V)}$ durch VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin. Die Ströme der VGCC-Subtypen wurden unterschiedlich durch Cisplatin moduliert. L-Typ, P-/Q-Typ und T-Typ $I_{Ca(V)}$ wurden reduziert, $I_{Ca(V)}$ des N-Typs erhöht.

3.3.2 IV von $I_{Ca(V)}$ von VGCC-Subtypen

Für den L-Typ VGCC konnte unter Kontrollbedingungen der maximale $I_{Ca(V)}$ bei einer Depolarisation auf 0 mV gemessen werden. Die Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin führte zu einer Reduktion des Spitzenstroms. Eine Verschiebung des Spitzenstroms zeigte sich nicht (Abb. 21 A). Die Reduktion des Stroms durch Cisplatin erfolgte in den Spannungsbereichen von -20 mV bis $+40 \text{ mV}$ (Abb. 21 B).

Für den P-/Q-Typ konnte unter Kontrollbedingungen ein Spitzenstrom bei -40 mV gemessen werden. Nach Cisplatin-Applikation kam es zu keiner Verschiebung des Spitzenstroms (Abb. 21 C). Eine Stromreduktion erfolgte über den Spannungsbereich von -40 mV bis $+30 \text{ mV}$ (Abb. 21 D).

Die Untersuchung der IV der T-Typ VGCC zeigte unter Kontrollbedingungen einen Spitzenstrom bei einer Depolarisation auf -10 mV . Durch die Applikation von Cisplatin kam es zur Reduktion dieses Stroms. Eine Verschiebung des Spitzenstroms konnte nicht beobachtet werden (Fig. 21 E). Die Reduktion des Stroms erfolgte im Spannungsbereich von -20 mV bis $+30 \text{ mV}$ (Fig. 21 F).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Subtypen führte die Applikation von Cisplatin bei $I_{Ca(V)}$ von N-Typ VGCC zu einer Erhöhung des Spitzenstroms (Abb. 21 G). Die Erhöhung des N-Typ $I_{Ca(V)}$ erfolgte im Spannungsbereich von -20 mV bis +20 mV (Abb. 21 H).

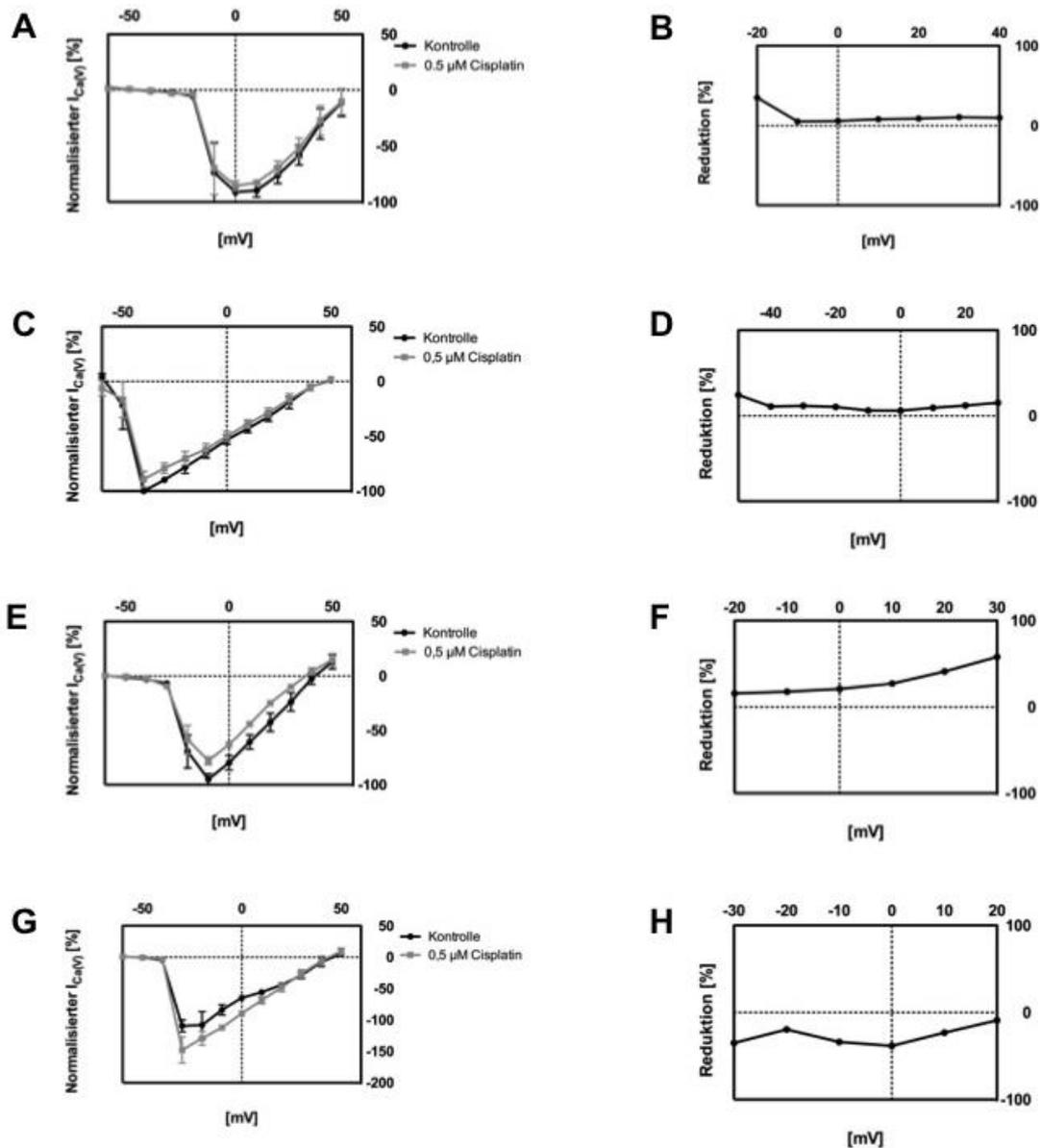


Abb. 21 Strom-Spannungs-Kurven (IV) von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen vor und nach Applikation von Cisplatin. A), C), E), F) IV von VGCC-Subtypen vor und nach Applikation von 0,5 μ M Cisplatin. Die schwarze Linie markiert $I_{Ca(V)}$ unter Kontrollbedingungen, die grau gestrichelte Linie markiert $I_{Ca(V)}$ nach Applikation von Cisplatin. $I_{Ca(V)}$ des L-Typs (A), des P-/Q-Typs (C) und des T-Typs (E) werden durch Cisplatin reduziert, $I_{Ca(V)}$ des N-Typs hingegen erhöht (F). B), D), G), H) Spannungsabhängigkeiten des Effekts von 0,5 μ M Cisplatin. Die Reduktion von $I_{Ca(V)}$ des L-Typs erfolgt in den Bereichen von -20 mV bis +40 mV (B); $I_{Ca(V)}$ des P-/Q-Typs zwischen -40 mV und +30 mV (D); $I_{Ca(V)}$ des T-Typs zwischen -20 mV bis +30 mV (G). Die Erhöhung des N-Typ $I_{Ca(V)}$ erfolgt im Spannungsbereich von -20 mV bis +20 mV (H) (n=5 je VGCC-Subtyp).

3.4 Modulation von $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Exposition

Zur Überprüfung des Einflusses von Cisplatin-Expositionen auf $I_{Ca(V)}$, wurden DRG-Neurone für 24 h bzw. 48 h einmalig mit 0,5 μ M oder 5 μ M Cisplatin behandelt. Die Isolation von $I_{Ca(V)}$ wurde mit der „whole cell“ Patch-Clamp Technik durchgeführt. Die Aufnahme der Kontrollströme erfolgte an unbehandelten Zellen. Anschließend wurde die Stromdichte jeder Zelle bestimmt.

Unter Kontrollbedingungen betrug die durchschnittliche Membrankapazität $0,037 \pm 0,001$ nF bzw. $37,5 \pm 1,02$ pF. Der mittlere $I_{Ca(V)}$ betrug $0,782 \pm 0,17$ nA, bei einer durchschnittlichen Membrankapazität von $0,03979 \pm 0,0001$ nF. Die Stromdichte betrug $19,52 \pm 4,46$ nA/nF.

Eine Exposition der DRG-Neurone mit 0,5 μ M Cisplatin für 24 h führte zu einer signifikanten Änderung des mittleren $I_{Ca(V)}$ auf $2,35 \pm 0,30$ nA, bei einer durchschnittlichen Membrankapazität von $0,038 \pm 0,0017$ nF. Dies entspricht einer Stromdichte von $65,69 \pm 8,61$ nA/nF (***) ($p < 0,001$). Die Exposition mit 5 μ M Cisplatin führte zu einer Erhöhung der Stromdichte auf $2,84 \pm 0,367$ nA, bei einer durchschnittlichen Membrankapazität von $0,037 \pm 0,0007$ nF. Dies ergab eine Stromdichte von $75,08 \pm 9,61$ nA/nF (***) ($p < 0,001$).

Die Exposition von 0,5 μ M bzw. 5 μ M Cisplatin für 48 h führte zu einer Zunahme der Stromdichte in den DRG-Neuronen. Für die 48 h Exposition von 0,5 μ M Cisplatin konnte ein mittlerer Strom von $2,16 \pm 0,12$ nA gemessen werden. Die durchschnittliche Membrankapazität der gemessenen Zellen lag bei $0,038 \pm 0,0007$ nF. Dies entsprach einer Stromdichte von $56,93 \pm 3,66$ nA/nF (***) ($p < 0,001$). Für eine 48-stündige Exposition von 5 μ M konnte ein mittlerer Strom von $2,83 \pm 1,19$ nA gemessen werden. Die durchschnittliche Membrankapazität lag bei $0,033 \pm 0,0028$ nF. Daraus resultierte eine Stromdichte von $81,81 \pm 5,61$ nA/nF (Abb. 22).

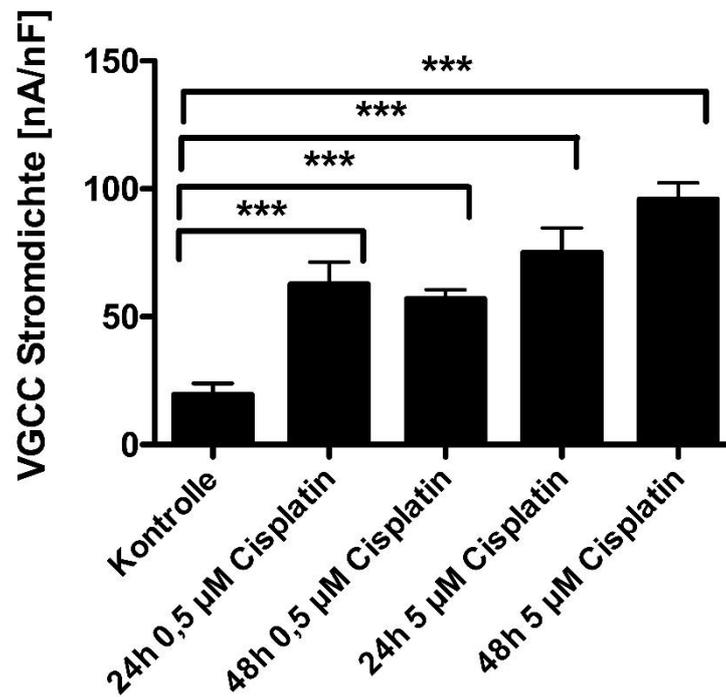


Abb. 22 Modulation der Stromdichte von VGCC kultivierter DRG-Neuronen durch langzeitige Cisplatin-Exposition. Die Exposition von Cisplatin in den Konzentrationen 0,5 µM oder 5 µM für 24 h bzw. 48 h führte zu einer signifikanten Zunahme der Stromdichte (n=9 je Konzentration und Inkubationsdauer).

Auch bei der Messung der IV führte 0,5 µM bzw. 5 µM Cisplatin für 24 h und 48 h zu einer Erhöhung der Stromdichte (Abb. 23). Unter Kontrollbedingungen konnte die maximale Stromdichte bei einer Depolarisation auf -20 mV gemessen werden. Die maximale Stromdichte betrug $40,04 \pm 0,2$ nA/nF. Die Exposition von 0,5 µM Cisplatin für 24 h führte zu einer Erhöhung der Stromdichte auf $106,62 \pm 0,44$ nA/nF. Eine Veränderung der maximalen Stromdichte erfolgte nicht. Auch hier wurde diese bei einer Depolarisation auf -20 mV ausgelöst. Die Erhöhung der Stromdichte erfolgte über die gesamte Spannungsbreite. Wurden die DRG-Neurone für 24 h mit 5 µM Cisplatin behandelt, konnte eine maximale Stromdichte von $138,24 \pm 0,17$ nA/nF nachgewiesen werden. Die maximale Stromdichte wurde bei Depolarisationen auf -30 mV gemessen. Die Exposition mit 0,5 µM Cisplatin für 48 h führte zu einer maximalen Stromdichte von $109,53 \pm 0,19$ nA/nF. Eine Verschiebung der maximalen Stromdichte wurde bei einer Depolarisation auf -20 mV gemessen. Auch die Exposition der Zellen mit 5 µM Cisplatin für 48 h führte zu einer Erhöhung der maximalen

Stromdichte. Diese lag bei $147,15 \pm 0,31$ nA/nF. Es zeigte sich keine Verschiebung der maximalen Stromdichte.

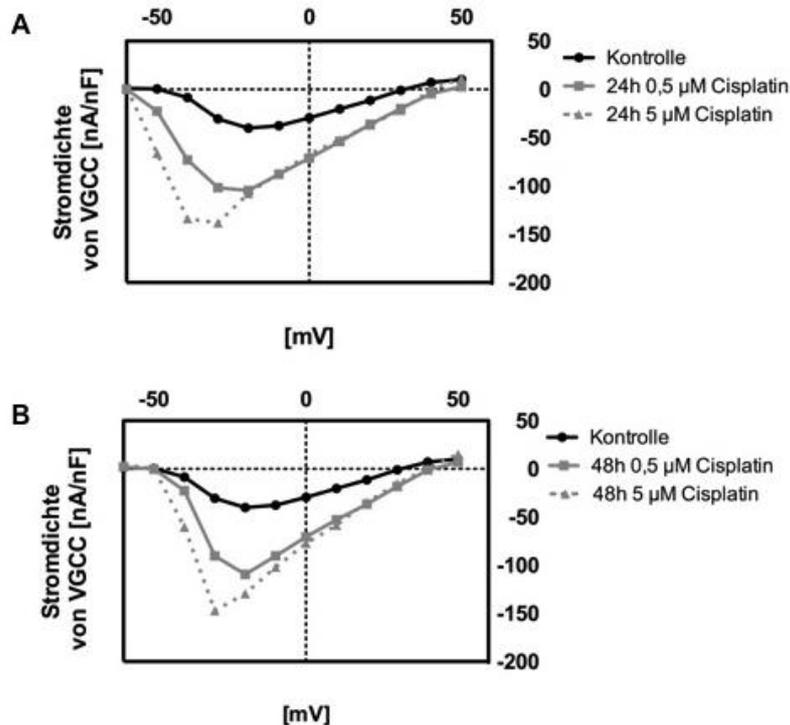


Abb. 23 Strom-Spannungskennlinien $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neurone nach Exposition mit $0,5 \mu\text{M}$ bzw. $5 \mu\text{M}$ Cisplatin für 24 h. A-B) IV; Darstellung der gemessenen Stromdichten bei einer Depolarisation von -60 mV auf $+50$ mV. Sowohl die Exposition der DRG-Neuronen mit $0,5 \mu\text{M}$ bzw. $5 \mu\text{M}$ für 24 h (A), und 48 h (B) führte zu einer Erhöhung der maximalen Stromdichten der VGCC in Bezug auf die unbehandelten Kontrollzellen. Nach Exposition mit $5 \mu\text{M}$ Cisplatin zeigte sich nach 24 h (A) und 48 h (B) eine Verschiebung der maximalen Stromdichte von -20 mV (Kontrolle) auf -30 mV ($n=8$ je Bedingung).

3.5 Modulation von $I_{Ca(V)}$ von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Exposition

Zur Überprüfung des Einflusses der Exposition mit Cisplatin auf Subtypen von VGCC wurden DRG-Neurone für 24 h bzw. 48 h einmalig mit $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin behandelt. Zur Isolation von $I_{Ca(V)}$ wurde die „whole cell“ Patch-Clamp Technik mit spezifischen Kanalblockern durchgeführt. Die Aufnahme der Kontrollströme erfolgte an unbehandelten Zellen. Es erfolgte eine Bestimmung der Stromdichte für jeden Subtypen.

Die mittlere Kapazität der gemessenen Zellen zur L-Typ Isolation betrug $0,032 \pm 0,001$ nF. Wurden die unbehandelten Stromdichten gemessen, so betragen diese $50,32 \pm 6,15$ nA/nF. Wurden die DRG-Neurone mit $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin für 24 h behandelt, so lag die mittlere Stromdichte bei $34,73 \pm 5,0$ nA/nF. Durch die Exposition mit Cisplatin für 48 h wurde kein signifikanter Unterschied, gegenüber der Kontrolle festgestellt. Die Stromdichte betrug hier $33,83 \pm 2,62$ nA/nF (ns; $p > 0,05$) (Abb. 24).

Bei der Untersuchung des P-/Q-Typs zeigte sich keine Veränderung der Stromdichte durch Cisplatin ($0,030 \pm 0,001$ nF) (ns; $p > 0,05$). Die mittlere Stromdichte der unbehandelten P-/Q-Typ Ströme lag bei $64,78 \pm 7,04$ nA/nF. Eine Exposition mit $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin für 24 h und 48h führte zu keiner signifikanten Änderung Stromdichte ($60,09 \pm 6,14$ nA/nF) (ns; $p > 0,05$) und ($52,73 \pm 4,45$ nA/nF) (ns; $p > 0,05$) (Abb. 24).

Bei der Isolation von T-Typ VGCC führte die Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin, sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h zu keiner Veränderung der mittleren Stromdichte. Die Zellen wiesen im Mittel eine Kapazität von $0,036 \pm 0,001$ nF auf. Die Stromdichte der unbehandelten Zellen betrug $32,24 \pm 2,08$ nA/nF. Die Exposition der Zellen mit Cisplatin für 24 h und 48h führte zu keiner signifikanten Änderung der Stromdichte von $27,73 \pm 1,16$ nA/nF (24 h) (ns; $p > 0,05$) und $27,26 \pm 2,44$ nA/nF (48 h) (ns; $p > 0,05$) (Abb. 24).

Bei der Isolation des N-Typ VGCC zeigte sich eine mittlere Kapazität der gemessenen DRG-Neuronen von $0,030 \pm 0,001$ nF. Wurden die Zellen für 24 h oder 48 h mit $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin exponiert, führte das zu einer signifikanten Erhöhung der mittleren Stromdichte auf $101,04 \pm 9,16$ nA/nF (***) ($p < 0,001$) bzw. $113,35 \pm 10,12$ nA/nF (***) ($p < 0,001$) (Abb. 24).

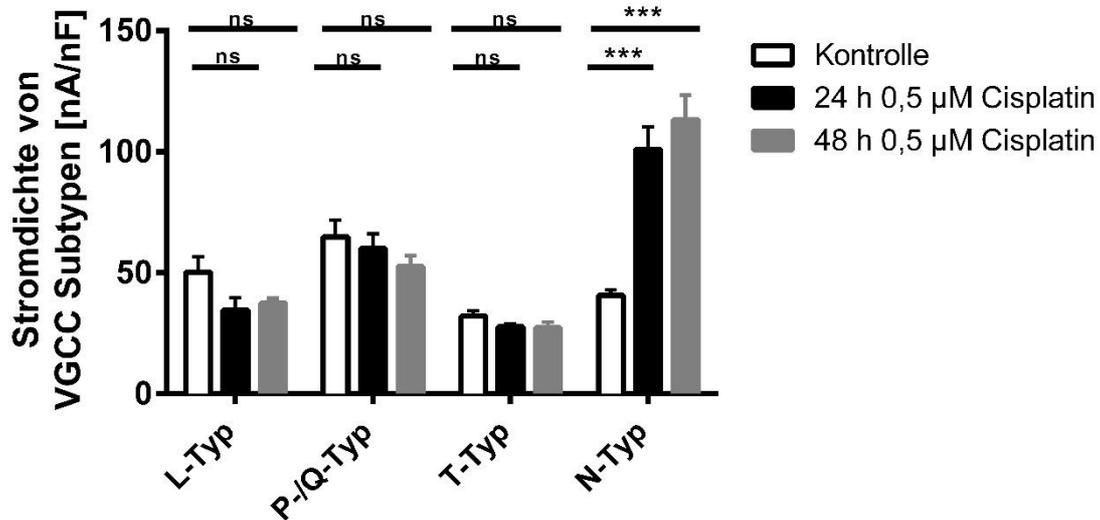


Abb. 24 Modulation der Stromdichte von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Exposition. Die Exposition von 0,5 µM Cisplatin für 24 h bzw. 48 h führte nur bei N-Typ VGCC zu einer signifikanten Veränderung der Stromdichte (n=8 je Subtyp und Bedingung).

3.6 Einfluss einer einmaligen *in vivo* Cisplatin-Applikation auf $I_{Ca(V)}$ und N-Typ $I_{Ca(V)}$

Zur Überprüfung des Einflusses von *in vivo* Cisplatin-Applikationen auf $I_{Ca(V)}$ von VGCC, sowie von N-Typ VGCC wurde den Tieren eine einmalige Injektion (i.p) mit Cisplatin (2,3 mg/kg) verabreicht. Nach 24-stündiger Exposition wurden die DRG-Neuronen entnommen, kultiviert und nach weiteren 24 h die Stromdichten mit Hilfe der „Whole cell“ Patch-Clamp Technik gemessen. Als Kontrolle dienten DRG-Neuronen aus unbehandelten Tieren.

Die für die Messung der Stromdichte der naiven VGCC verwendeten DRG-Neuronen wiesen eine mittlere Kapazität von $0,029 \pm 0,001$ nF auf. Die Stromdichte der unbehandelten Kontrolltiere betrug $33,39 \pm 0,41$ nA/nF. Erfolgte eine 24-stündige *in vivo* Exposition mit Cisplatin (2,3 mg/kg) konnte eine signifikant erhöhte Stromdichte von $105,70 \pm 4,93$ nA/nF nachgewiesen werden (***, p<0,001) (Abb. 25 A). Dieses entspricht einer Erhöhung der Stromdichte um Faktor $3,16 \pm 0,046$ (***, p<0,001) (Abb. 25 B).

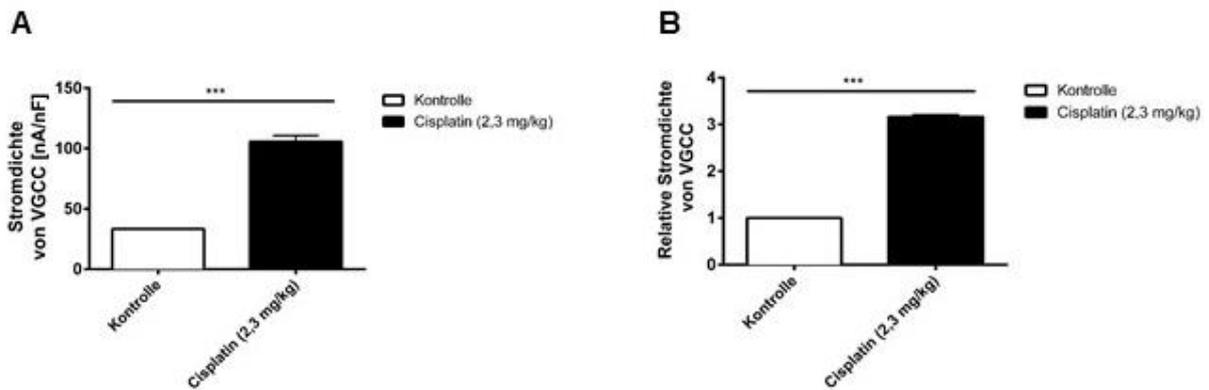


Abb. 25 Modulation von VGCC Stromdichten nach *in vivo* Cisplatin-Applikation. Die *in vivo* Applikation mit Cisplatin führte zu einer signifikanten Erhöhung der Stromdichte von VGCC **(A)** um den Faktor $3,16 \pm 0,046$ **(B)** nach 24 h (n=10 je Bedingung).

Bei der Bestimmung der Stromdichte von N-Typ VGCC (Abb. 26) zeigten die verwendeten Zellen eine mittlere Kapazität von $0,026 \pm 0,0008$ nF. Die mittlere Stromdichte der unbehandelten Kontrollzellen lag bei $43,65 \pm 0,28$ nA/nF. Auch hier kam es durch die *in vivo* Cisplatin-Exposition zu einer signifikanten Erhöhung der mittleren Stromdichte. Diese betrug nach der Behandlung $195,46 \pm 4,28$ nA/nF (***) ($p < 0,001$) (Abb. 26 A). Dieses entspricht einer Erhöhung der Stromdichte um Faktor $4,47 \pm 0,021$ (***) ($p < 0,001$) (Abb. 26 B).

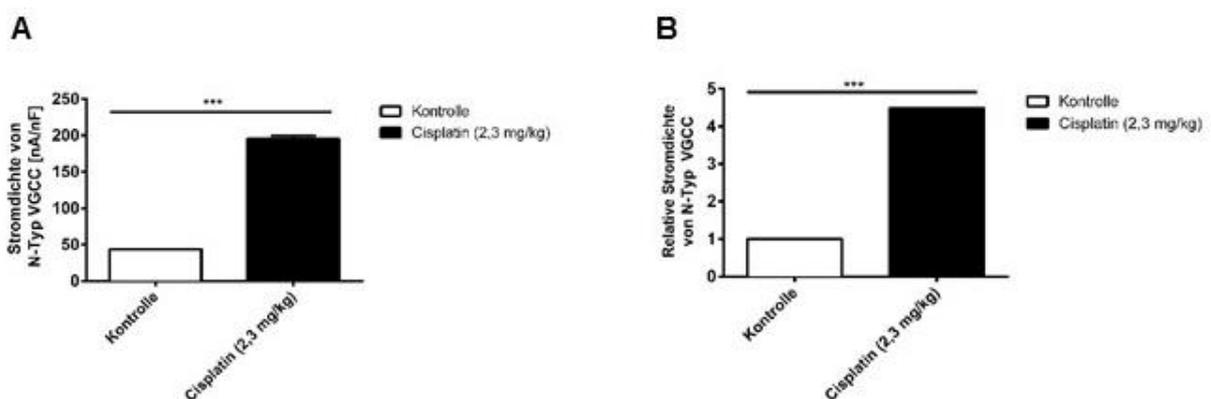


Abb. 26 Modulation der N-Typ VGCC Stromdichten nach *in vivo* Cisplatin-Applikation. Die *in vivo* Applikation mit Cisplatin führte nach 24 h zu einer signifikanten Erhöhung der Stromdichte von VGCC des N-Typs **(A)** um den Faktor $4,47 \pm 0,021$ **(B)** (n=10 je Bedingung).

3.7 Einfluss von Proteinkinase C auf Regulation von N-Typ $I_{Ca(V)}$ kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Applikation

Zur Überprüfung des Einflusses der PKC auf die Stromregulation der N-Typ VGCC nach Cisplatin-Applikation wurden Kulturen von DRG-Neuronen für 10 min mit 5 μM Chelerythrinchlorid behandelt und anschließend Stromzeitverlaufsmessungen vor und nach Applikation von Cisplatin durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Wie unter 3.3.1 gezeigt, führte Cisplatin zu einem erhöhten N-Typ $I_{Ca(V)}$. Hierbei kam es zu einer Erhöhung auf $130,3 \pm 7,4 \%$ (Abb. 27 A). Dieses konnte bei den mit Chelerythrinchlorid behandelten Zellen nicht gezeigt werden. Es zeigte sich keine Veränderung des Stroms nach Cisplatin-Applikation. Auch nach einer Messzeit von 500 s betrug $I_{Ca(V)}$ des N-Typ VGCC noch $94,6 \pm 1,1 \%$ (Abb. 27 B).

Dies deutet auf eine PKC-vermittelte Stromerhöhung der N-Typ VGCC durch Cisplatin hin.

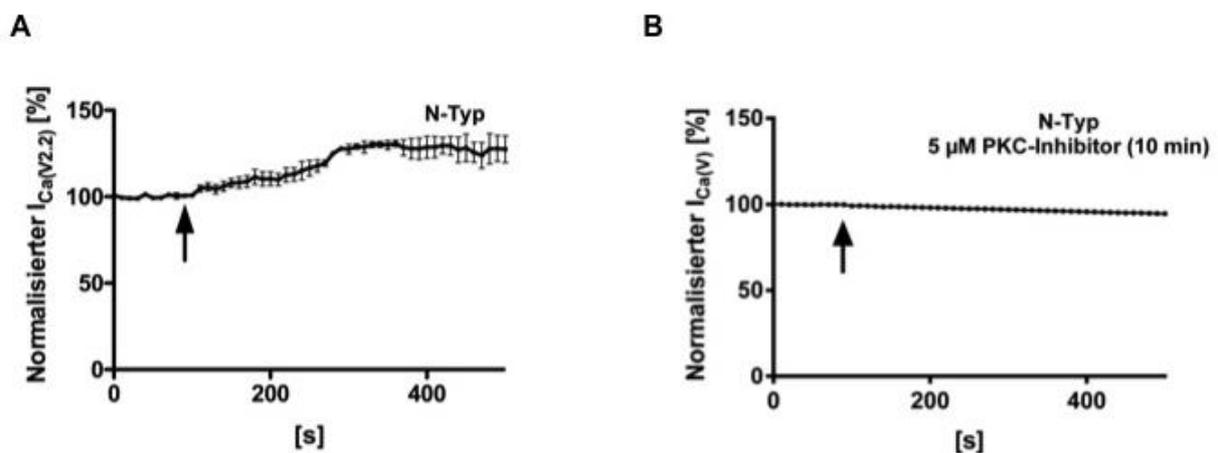


Abb. 27 Einfluss von PKC auf die Ströme von N-Typ VGCC kultivierter DRG-Neurone nach Cisplatin-Applikation. A) In unbehandelten Kontrollzellen führte die Applikation von 0,5 μM Cisplatin (Pfeil) zu einer Erhöhung des Stroms durch die N-Typ VGCC. **B)** Wurden die kultivierten DRG-Neuronen vor Messbeginn für 10 min mit 5 μM Chelerythrinchlorid (PKC-Inhibitor) vorbehandelt, konnte nach Applikation von 0,5 μM Cisplatin (Pfeil) keine Veränderung des Stroms durch die N-Typ VGCC festgestellt werden (n=5 je Bedingung).

3.8 Einfluss von Calmodulinkinase II auf die Erhöhung der N-Typ VGCC Stromdichten kultivierter DRG-Neuronen nach Cisplatin-Exposition

Zur Überprüfung des Einflusses der Calmodulinkinase II (CaMK II) auf die Erhöhung der N-Typ Ströme nach Cisplatin-Exposition für 24 h wurden Kulturen von DRG-Neuronen präpariert und mit 1 μM KN-93, zur Inhibition der CaMK II, sowie mit 0,5 μM Cisplatin exponiert und Stromdichtenmessungen der N-Typ VGCC durchgeführt. Als Kontrolle dienten sowohl unbehandelte DRG-Neuronen, als auch Neuronen, die für 24h mit 0,5 μM Cisplatin exponiert wurden.

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass es durch die Inhibition der CaMK II zu keiner Erhöhung der Stromdichte der N-Typ VGCC durch Cisplatin kam. So wiesen unbehandelte Kontrollzellen eine relative Stromdichte von $1 \pm 0,02$ auf. Eine Exposition der DRG-Neurone mit Cisplatin für 24 h führte zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Stromdichte auf $2,96 \pm 0,03$ (***, $p < 0,001$). Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Exposition mit 1 μM KN-93 verhindert werden. Das entspricht einer signifikanten Verringerung der nach Cisplatin-Exposition gemessenen relativen Stromdichte (***, $p < 0,001$) (Abb. 28).

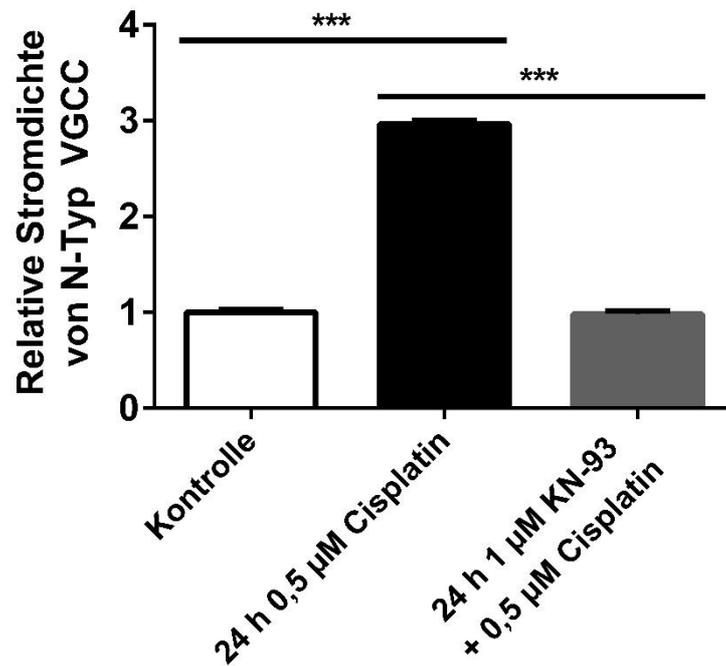


Abb. 28 Einfluss der CaMK II auf die Erhöhung der N-Typ VGCC Stromdichte von kultivierten DRG-Neuronen nach 24 h Cisplatin-Exposition. Die Exposition der kultivierten DRG-Neuronen für 24 h mit 0,5 μ M Cisplatin führte zu einer signifikanten Erhöhung der Stromdichte von N-Typ VGCC gegenüber unbehandelten Kontrollzellen (***; $p < 0,001$). Wurden die Zellen für 24 h mit 1 μ M KN-93 (CaMK II-Inhibitor), sowie mit 0,5 μ M Cisplatin exponiert, kam es zu keiner Erhöhung der Stromdichte von N-Typ VGCC (***; $p < 0,001$). DRG-Neurone, welche mit KN-93 und Cisplatin exponiert wurden, zeigten eine N-Typ Stromdichte ähnlich der der Kontrollen (ns; $p > 0,05$) ($n = 10$ pro Bedingung).

3.9 Einfluss von Cisplatin-Expositionen auf das Proteinlevel von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neuronen

Zur Überprüfung des Einflusses von Cisplatin auf das Proteinlevel von VGCC-Subtypen wurden DRG-Neurone kultiviert und für 24 h mit 0,5 μ M Cisplatin exponiert. Anschließend wurden ICC-Färbungen gegen β -III-Tubulin, als neuronalen Marker (rot), sowie gegen den jeweiligen VGCC-Subtyp (grün) durchgeführt. Zusätzlich wurde DAPI (blau) zur Darstellung der Zellkern-DNA verwendet. Es wurde die Fluoreszenz der jeweiligen Subtyp-positiven Neuronen gemessen.

Die ICC zeigten, dass Zellen, die nicht β -III-Tubulin (rot) positiv markiert waren auch nicht positiv gegen die jeweiligen VGCC-Subtypen (grün) markiert waren. Im Gegensatz dazu waren alle β -III-positiven Zellen mit den jeweiligen Subtypen ko-lokalisiert (Abb. 29 A).

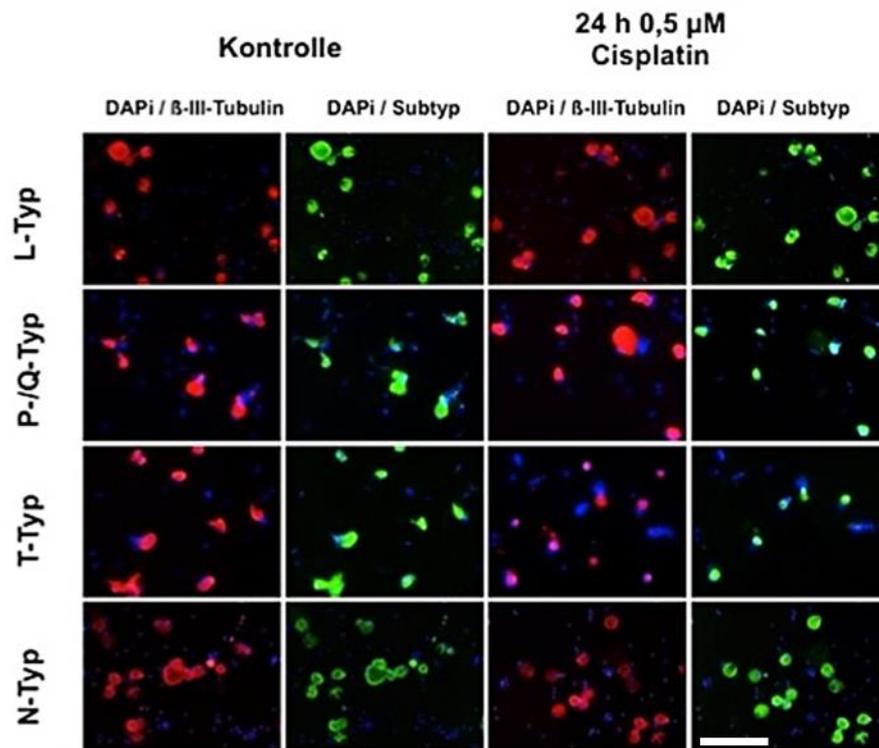
Die Exposition mit 0,5 μ M Cisplatin führt nach 24 h zu keiner signifikanten Veränderung des Proteinlevels der VGCC L-Typ, P-/Q-Typ, oder T-Typ Subtypen in DRG-Neuronen. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich für den L-Typ VGCC ein relatives Proteinlevel von $1 \pm 0,20$, nach Exposition mit Cisplatin lag diese bei $0,88 \pm 0,17$ (ns; $p > 0,05$).

Für die P-/Q-Typ VGCC ergab sich in der Kontrolle ein relatives Proteinlevel von $1 \pm 0,15$, nach Exposition mit Cisplatin lag diese bei $1,01 \pm 0,10$ (ns; $p > 0,05$).

Der Wert des Proteinlevels der T-Typ VGCC betrug bei unbehandelten Zellen $1 \pm 0,08$. Wurden die Zellen mit Cisplatin behandelt, betrug der Wert $0,87 \pm 0,09$ (ns; $p > 0,05$).

N-Typ VGCC zeigten eine signifikante Veränderung ihres Proteinlevels nach Cisplatin-Exposition. Es kam zu einer signifikanten Zunahme des Proteinlevels um Faktor $3,12 \pm 0,15$ (***) ($p < 0,001$) (Abb. 29 B).

A



B

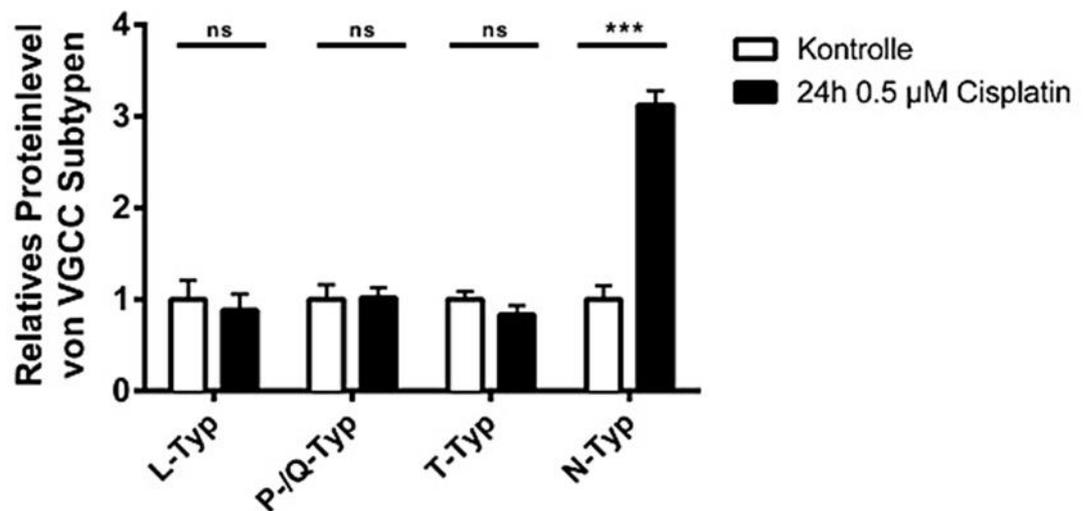


Abb. 29 Relatives Proteinlevel von VGCC-Subtypen kultivierter DRG-Neurone nach Exposition mit 0,5 µM Cisplatin für 24 h. **A)** ICC-Färbungen gegen β-III-Tubulin (rot), als neuronalen Marker und VGCC-Subtypen (grün), sowie DAPI-Färbungen (blau) gegen die Kern-DNA. Alle β-III-Tubulin positiven Zellen waren auch positiv für den jeweiligen VGCC-Subtyp. Bei DAPI markierten Zellen handelt es sich um nicht-neuronale Zelltypen. **B)** Die Exposition mit 0,5 µM Cisplatin für 24 h führte zu keiner signifikanten Veränderung des relativen Proteinlevels der L-Typ, P-/Q-Typ oder T-Typ Calciumkanäle (ns; $p > 0,05$). Lediglich der N-Typ VGCC zeigte eine Zunahme des relativen Proteinlevels nach Cisplatin-Exposition (***; $p < 0,001$). Maßstab: 100 µm. (n=3 Ansätze pro Subtyp).

3.10 Einfluss von *in vivo* Cisplatin-Applikationen auf das Proteinlevel von N-Typ VGCC in DRG-Neuronen

Zur Untersuchung des Einflusses von *in vivo* Cisplatin-Applikationen auf das Proteinlevel von VGCC des N-Typs wurde Tieren einmalig Cisplatin (2,3 mg/kg) injiziert (i.p.). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere. Die DRGs wurden nach 24 h entnommen und histologische Schnitte angefertigt. Anschließend wurden IHC-Färbungen gegen N-Typ VGCC angefertigt und die Fluoreszenz gemessen.

Die IHC-Färbungen beweisen, dass es möglich war VGCC des N-Typs (grün) zu markieren. In Arealen, die nicht mit DRG-Neuronen besetzt waren, verlaufen a.e. Nervenfasern (weiße Pfeile, Abb. 30 A).

Die Auswertung der Fluoreszenz-Intensität zeigte, dass es durch die *in vivo* Exposition mit Cisplatin (2,3 mg/kg) zu einer signifikanten Zunahme des Proteinlevels der N-Typ VGCC kommt. Die Neuronen der DRGs unbehandelter Tiere wiesen ein relatives Proteinlevel von $1 \pm 0,08$ auf. Die 24-stündige Cisplatin-Exposition führte zu einem signifikant erhöhten Proteinlevel von $3,41 \pm 0,07$ (***) ($p < 0,001$) (Abb. 30 B).

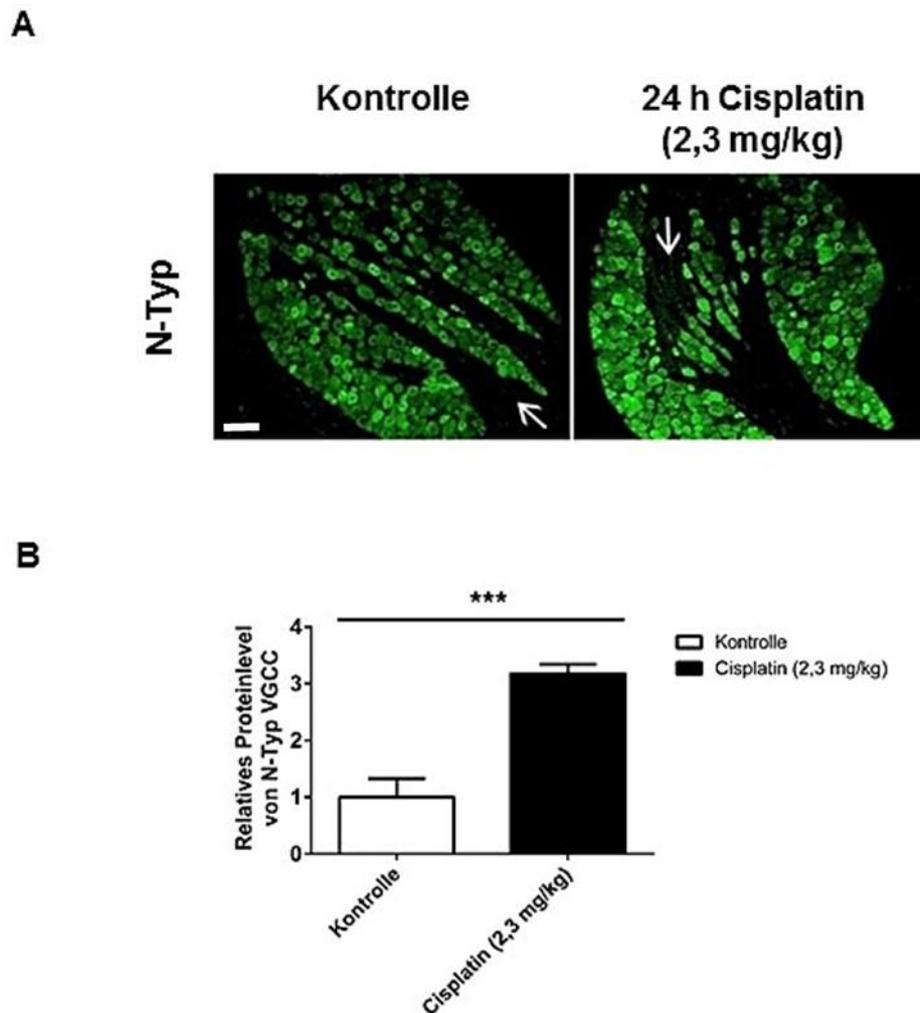


Abb. 30 Relatives N-Typ VGCC Proteinlevel in DRG-Neuronen nach *in vivo* Cisplatin-Applikation. **A)** IHC-Färbungen gegen N-Typ VGCC (grün) in DRG-Neuronen. Weiße Pfeile markieren Areale, welche von Fasern der DRG-Neuronen durchzogen werden. **B)** Nach *in vivo* Exposition von 24 h mit Cisplatin (2,3 mg/kg; i.p) kommt es zu einer signifikanten Zunahme der relativen Expression von N-Typ VGCC um den Faktor $3,41 \pm 0,07$ ($p < 0,001$). Maßstab: 100 μm . (n=6 pro Bedingung).

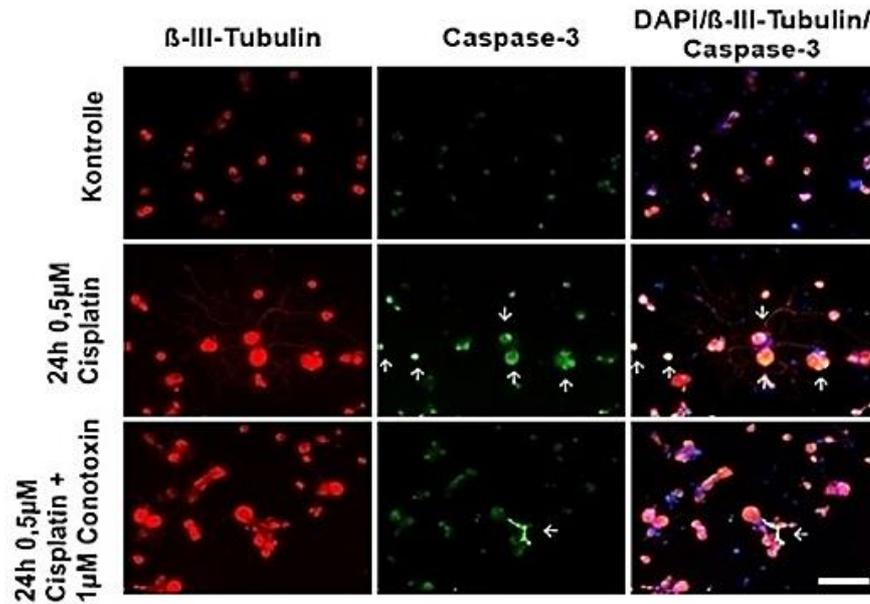
3.11 Einfluss von Cisplatin und ω -Conotoxin auf die Apoptoserate kultivierter DRG-Neuronen

Zur Überprüfung des Einflusses von Cisplatin auf die Induktion apoptotischer Prozesse wurden DRG-Neuronen kultiviert und für 24 h mit 0,5 μM Cisplatin exponiert. Zusätzlich wurden Kulturen mit 1 μM ω -Conotoxin für 15 min inkubiert und für 24 h mit 0,5 μM Cisplatin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte DRG-Neuronen. Anschließend wurden ICC-Färbungen gegen β -III-Tubulin (rot), als neuronalen Mar-

ker, sowie gegen aktivierte Caspase-3 (akt.-Caspase-3) (grün), als Apoptose-Marker durchgeführt. Zur Darstellung der Kern-DNA wurde zusätzlich mit DAPI (blau) gefärbt.

Die Färbungen zeigten (siehe 3.6), dass es sich nicht bei allen in der Kultur befindlichen Zellen um DRG-Neurone handelt. Apoptotische Neuronen waren an der Ko-Färbung von β -III-Tubulin und akt.-Caspase-3 zu erkennen (Abb. 31 A; weiße Pfeile). Unbehandelte Kontrollzellen wiesen einen Anteil an akt.-Caspase-3 positiven Neuronen von $4,4 \pm 0,4$ % auf. Wurden die DRG-Neuronen für 24 h mit $0,5 \mu\text{M}$ Cisplatin exponiert, führte dieses zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils an akt.-Caspase-3 positiven Neuronen. Dieser Anstieg betrug $26,2 \pm 0,7$ % (***, $p < 0,001$). Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit $1 \mu\text{M}$ ω -Conotoxin führte zu einer Verringerung der durch Cisplatin-induzierten Aktivierung der Caspase-3. Mit ω -Conotoxin exponierte DRG-Neuronen waren zu $4,6 \pm 0,2$ % akt.-Caspase-3 positiv (***, $p < 0,001$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zu unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden (ns; $p > 0,05$) (Abb. 31 B).

A



B

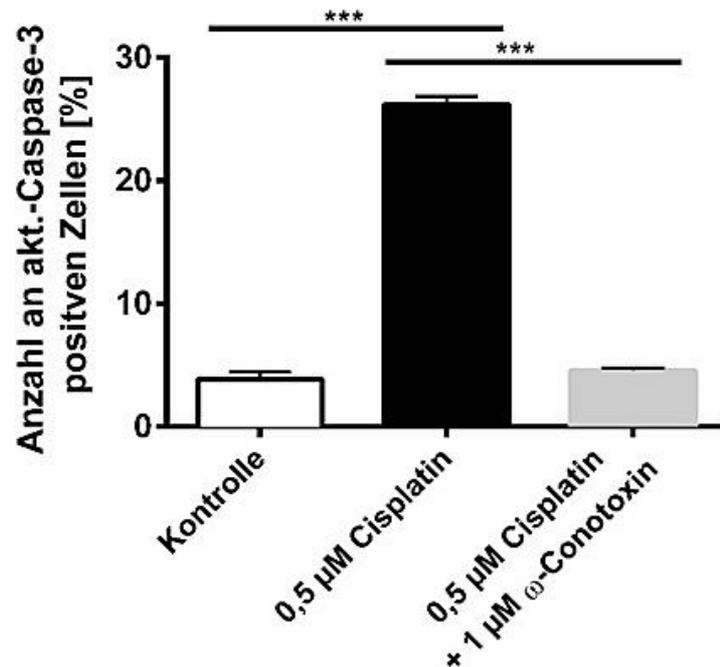


Abb. 31 Einfluss von Cisplatin auf die Aktivierung von Caspase-3 in kultivierten DRG-Neuronen A) ICC-Färbungen gegen β -III-Tubulin (rot), als neuronaler Marker und akt.-Caspase-3 (grün), als Apoptosemarker, sowie Färbungen mit DAPI (blau) zur Darstellung der Kern-DNA. B) Die Exposition mit 0,5 μ M Cisplatin für 24 h führte zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils an akt.-Caspase-3 positiven Neuronen (***, $p < 0,001$) (Pfeil). Bei Präinkubation mit 1 μ M ω -Conotoxin war dies nicht nachweisbar (***, $p < 0,001$). Maßstab: 100 μ m. (n=3 Ansätze pro Bedingung).

3.12 Schmerz-assoziiertes und motorisches Verhalten nach repetitiver Cisplatin-Applikation

Zur Testung des Einflusses von repetitiven Cisplatin-Applikationen auf das schmerz-assoziierte und motorische Verhalten von Ratten, sowie zur Überprüfung der neuroprotektiven Wirkung von ω -Conotoxin *in vivo*, wurden die Tiere, wie unter 2.11.1 beschrieben, behandelt und das Verhalten zu definierten Zeitpunkten getestet. Zur Übersicht werden die einzelnen Gruppen und deren Behandlung in Tab. 15 nochmals zusammengefasst.

Tab. 15 Gruppen der Verhaltenstestung

Gruppe	Behandlung
1	Cisplatin (1,5 mg/kg) + NaCl
2	Cisplatin (1,5 mg/kg) + ω -Conotoxin (0,02 μ g/kg)
3	Cisplatin (1,5 mg/kg) + ω -Conotoxin (0,2 μ g/kg)

3.12.1 Testung des motorischen Verhaltens nach repetitiver Cisplatin-Applikation

Zur Überprüfung des Einflusses der repetitiven Cisplatin-Applikation auf die Motorik der Versuchstiere wurden Rotarod-Testungen durchgeführt.

Die Tiere wurden zwei Tage lang an das Rotarod gewöhnt, so dass an Tag 3 mit der Aufzeichnung der Kontrolldaten aller Tiere begonnen wurde. Hier wiesen die naiven Tiere eine mittlere Laufdauer von $114,3 \pm 3,1$ s auf. Anschließend erfolgte die Behandlung der Tiere mit Cisplatin und mit Cisplatin/ ω -Conotoxin.

In Gruppe 1, die mit Cisplatin (1,5 mg/kg) + NaCl behandelt wurde, zeigte die Messung an Tag 8 eine Verringerung der Laufdauer auf dem Rotarod ($90,7 \pm 4,2$) (***)

$p < 0,001$). Auch bei den Folgetestungen an Tag 17, 24, und 31 nach Abschluss der Cisplatin-Behandlung blieb diese vermindert. An Tag 31 betrug der Verbleib auf dem Rotarod nur noch $74,8 \pm 2,1$ s (***, $p < 0,001$).

In Gruppe 2 und Gruppe 3, in welcher die Tiere mit Cisplatin (1,5 mg/kg) und ω -Conotoxin (mit 0,02 oder 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) behandelt wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Laufdauer an den Tagen 8, 17, 24 und 31 im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt (ns; $p > 0,05$ je Gruppe). Auch zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen ω -Conotoxin-Konzentrationen konnte kein Unterschied festgestellt werden (ns; $p > 0,05$) (Abb. 32).

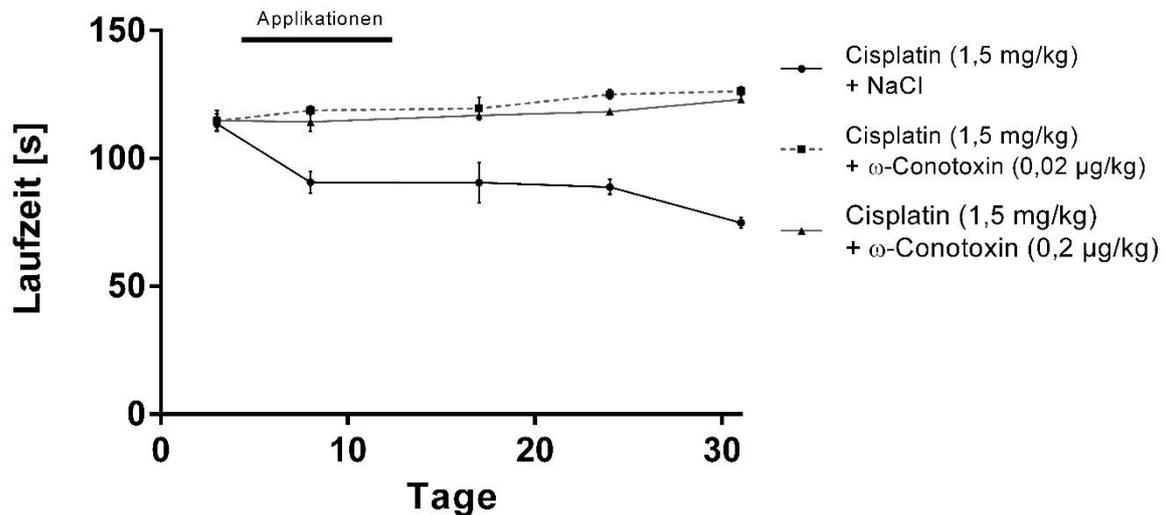


Abb. 32 Einfluss von repetitiver Cisplatin-Applikation auf das motorische Verhalten. Die Behandlung mit Cisplatin (1,5 mg/kg) + NaCl führte zu einer deutlichen Verringerung der Laufdauer auf dem Rotarod (***, $p < 0,001$). Durch die zusätzliche Gabe von ω -Conotoxin konnte keine Verringerung der Laufdauer auf dem Rotarod beobachtet werden (ns; $p > 0,05$) ($n=7$ Tiere je Gruppe).

3.12.2 Testung der Thermhyperalgesie nach repetitiver Cisplatin-Applikation

Zur Überprüfung der Thermhyperalgesie nach repetitiver Cisplatin-Applikation wurden Hot-Plate Testungen durchgeführt. Die Aufnahme der Kontrolldaten erfolgte über die Tage 1-3. Hier zeigten die naiven Tiere im Mittel eine Rückzugsschwelle von $17,9 \pm 0,8$ s.

Tiere der Gruppe 1, welche mit Cisplatin (1,5 mg/kg) + NaCl behandelt wurden zeigten an Tag 8 eine Reduktion ihrer Rückzugsschwelle auf $11,6 \pm 0,6$ s (***, $p < 0,001$). Diese Reduktion konnte auch an Tag 17, 24 und 31 beobachtet werden. An Tag 31 erfolgte der Rückzug der Pfote nach $10,1 \pm 0,2$ s (***, $p < 0,001$).

Wurden die Tiere neben Cisplatin (1,5 mg/kg) auch mit ω -Conotoxin (0,02 μ g/kg) (Gruppe 2) behandelt, zeigte sich, dass diese eine erhöhte Rückzugsschwelle gegenüber den Kontrollwerten aufwiesen (***, $p < 0,001$). So war an Tag 8 die Rückzugsschwelle auf $26 \pm 0,8$ s angestiegen. An den Tagen 17, 24 und 31 konnten ebenso erhöhte Rückzugsschwellen beobachtet werden. An Tag 31 lag diese bei $26,9 \pm 0,6$ s (***, $p < 0,001$).

Die Tiere der Gruppe 3, welche zusätzlich zu Cisplatin ω -Conotoxin in einer Konzentration von 0,2 μ g/kg bekamen, zeigten ebenfalls ein solches Verhalten. Hier konnte an Tag 8 eine Rückzugsschwelle von $25,3 \pm 0,7$ s festgestellt werden (***, $p < 0,001$). Bei den Folgemessungen an den Tagen 17, 24 und 31 wurde auch eine erhöhte Rückzugsschwelle gemessen (***, $p < 0,001$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 2 und 3 konnte nicht festgestellt werden (ns; $p > 0,05$) (Abb. 33).

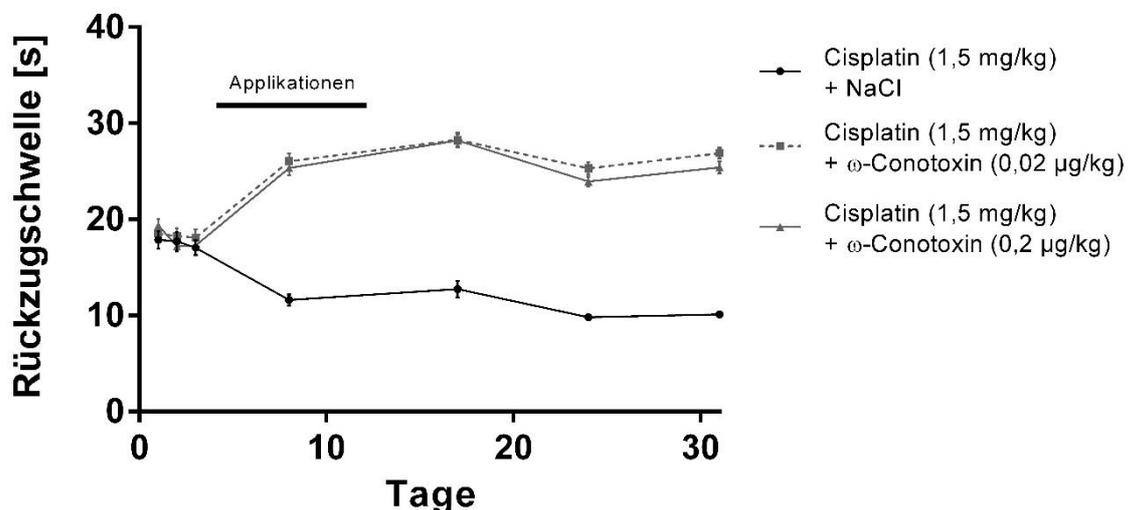


Abb. 33 Thermhyperalgesie-Messung nach repetitiver Cisplatin-Applikation. Die Behandlung mit Cisplatin (1,5 mg/kg) + NaCl führte zu einer deutlichen Verringerung der Rückzugsschwelle. Durch die zusätzliche Gabe von ω -Conotoxin konnte eine Verringerung der Rückzugsschwelle nicht beobachtet werden (ns; $p > 0,05$). Die Schwelle wurde erhöht (***, $p < 0,001$). (n=7 Tiere pro Bedingung).

3.12.3 Testung der taktilen Allodynie nach repetitiver Cisplatin-Applikation

Zur Überprüfung der taktilen Allodynie nach repetitiver Cisplatin-Applikation wurden von Frey Testungen durchgeführt.

Die Aufnahme der Kontrolldaten erfolgte über die Tage 1-3. Hier zeigten die naiven Tiere im Mittel eine Rückzugsschwelle von $21,6 \pm 0,04$ g.

Tiere, welche mit Cisplatin (1,5 mg/kg) + NaCl (Gruppe 1) behandelt wurden, wiesen bereits an Tag 8 des Experimentes eine Verringerung der Rückzugsschwelle $9,8 \pm 1,98$ g (***) ($p < 0,001$) auf. In den Folgetestungen an den Tagen 17, 24 und 31 des Experimentes konnte eine Verringerung der Rückzugsschwelle gegenüber den Baseline-Messungen festgestellt werden. An Tag 31 verringerte sich die Rückzugsschwelle auf zu $4,9 \pm 0,6$ g (***) ($p < 0,001$).

Die Tiere der Gruppe 2 und der Gruppe 3 zeigten keine signifikanten Abweichungen von den Werten der naiven Tiere (ns; $p > 0,05$). Wurden die Tiere neben Cisplatin mit ω -Conotoxin ($0,02 \mu\text{g/kg}$) (Gruppe 2) behandelt, führte dies an Tag 8 zu einer Verringerung der Rückzugsschwelle auf $18,7 \pm 1,7$ g (ns; $p > 0,05$). An den Tagen der Folgemessung stiegen die Werte an. So betrug der Wert der Rückzugsschwelle an Tag 31 $21,7 \pm 0,00$ g (ns; $p > 0,05$).

Die Rückzugsschwelle der Tiere der Gruppe 3 war an Tag 8 gegenüberüber den Kontrolldaten reduziert und betrug $18,9 \pm 1,1$ g, ab Tag 17 erfolgte ein Anstieg auf bis $21 \pm 0,3$ g an Tag 31 (ns; $p > 0,05$) (Abb. 34).

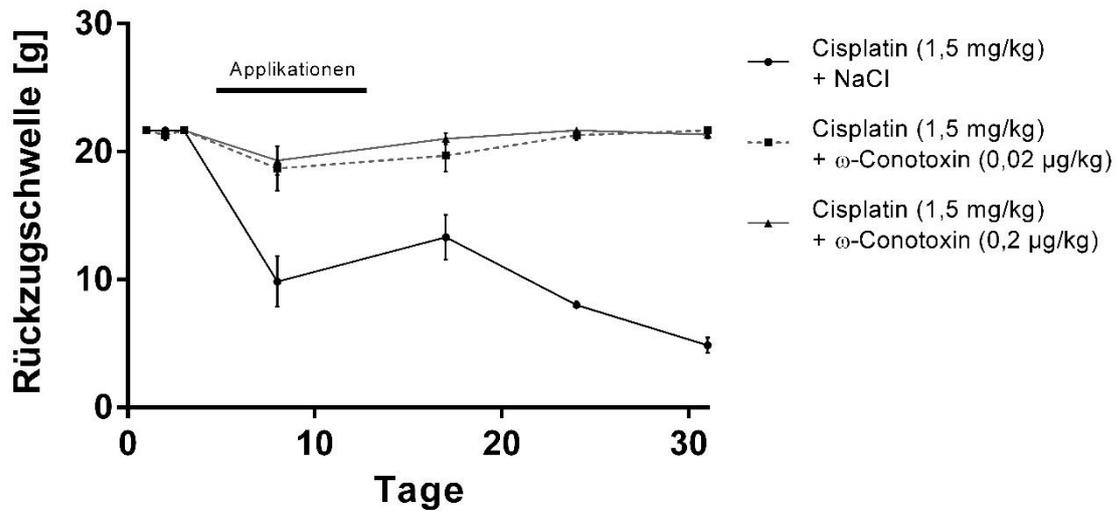


Abb. 34 Testung der taktilen Allodynie nach repetitiver Cisplatin-Applikation. Die Behandlung mit Cisplatin (1,5 mg/kg) + NaCl führte zu einer Verringerung der Rückzugsschwelle (***) ($p < 0,001$). Durch die zusätzliche Gabe von ω -Conotoxin konnte keine Verringerung der Rückzugsschwelle beobachtet werden (ns; $p > 0,05$). ($n=7$ Tiere pro Bedingung).

3.13 Proteinlevel von N-Typ VGCC nach repetitiver Cisplatin- und ω -Conotoxin-Applikation

Zur Überprüfung des Einflusses von repetitiven Cisplatin- und ω -Conotoxin-Applikationen auf das Proteinlevel von N-Typ VGCC wurden nach Abschluss der Verhaltensexperimente die DRGs der Versuchstiere entnommen und wie unter 2.10.2 beschrieben, Schnitte von diesen angefertigt. Anschließend wurden IHC-Färbungen gegen N-Typ VGCC durchgeführt, die Intensität der Fluoreszenz gemessen und als relatives Proteinlevel ermittelt. Als Kontrolle dienten DRG-Schnitte unbehandelter Tiere.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Intensität zeigte, dass die repetitive *in vivo* Applikation von Cisplatin (1,5 mg/kg) zu einer signifikanten Zunahme des Proteinlevels der N-Typ VGCC gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren führte.

Die DRG-Neuronen der Kontrolltiere wiesen ein relatives Proteinlevel von $1 \pm 0,005$ auf. Die repetitive Cisplatin-Applikation hingegen führte zu einem relativen Proteinlevel der N-Typ VGCC von $1,82 \pm 0,003$ (***) ($p < 0,001$). Wurden die Tiere zusätzlich mit

ω -Conotoxin (0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) behandelt, führte dies mit $0,99 \pm 0,002$ zu keiner signifikanten Veränderung des Proteinlevels gegenüber den Kontrolltieren (ns; $p > 0,05$), jedoch zu einer signifikanten Verringerung gegenüber den Tieren, die nur mit Cisplatin behandelt wurden (***) ($p < 0,001$). Dieser Effekt konnte auch für die zusätzliche Behandlung mit ω -Conotoxin in einer Konzentration von 0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ beobachtet werden. Mit einem relativen Proteinlevel von $0,86 \pm 0,006$ wurden keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrolltieren beobachtet (ns; $p > 0,05$). Es wurde jedoch eine signifikante Verringerung des relativen N-Typ VGCC Proteinlevels gegenüber den nur mit Cisplatin behandelten Tieren (***) ($p < 0,001$) beobachtet. Ein signifikanter Unterschied des N-Typ VGCC Proteinlevels zwischen den beiden Konzentrationen von ω -Conotoxin zeigte sich nicht (ns; $p > 0,05$).

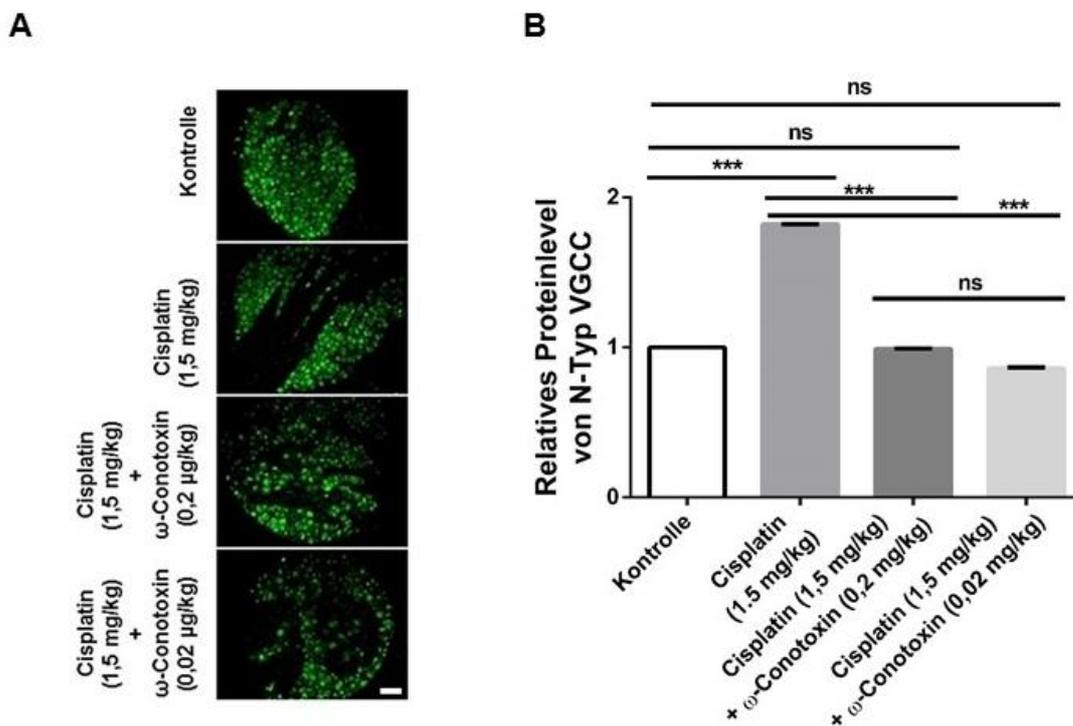


Abb. 35 Relatives Proteinlevel von N-Typ VGCC in DRG-Neuronen nach repetitiver *in vivo* Cisplatin- und ω -Conotoxin-Applikation. **A)** IHC-Färbungen von N-Typ VGCC in DRG-Neuronen. **B)** Relatives Proteinlevel von N-Typ VGCC in DRG-Neuronen nach repetitiven *in vivo* Cisplatin- und Cisplatin/ ω -Conotoxin-Applikationen. Die Exposition der Tiere mit Cisplatin führte zu einer signifikanten Erhöhung des relativen Proteinlevels von N-Typ VGCC. Die zusätzliche Applikation von ω -Conotoxin führte zu einer signifikanten Verringerung der Cisplatin-vermittelten Zunahme des Proteinlevels. Hierbei zeigte sich keine signifikante Veränderung des Proteinlevels in Bezug auf die Kontrollwerte. Maßstab: 100 μm . ($n=3$ Schnitte pro Bedingung).

3.14 Nachweis von Cisplatin/DNA-Addukten in DRG-Neuronen nach repetitiver *in vivo* Cisplatin-Applikation

Zum Nachweis von Cisplatin/DNA-Addukten in DRG-Neuronen nach repetitiven *in vivo* Cisplatin-Applikationen wurden direkt nach Abschluss der Verhaltensexperimente die DRGs der Versuchstiere entnommen und wie unter 2.10.2 beschrieben, Schnitte von diesen angefertigt. Anschließend wurden ICA-Färbungen zur Darstellung von Cisplatin/DNA-Addukten (siehe 2.10.5) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte für die Tiere, die mit Cisplatin (1,5 mg/kg) (kumulative Dosis von 12 mg/kg Cisplatin), sowie für die Tiere, die mit einer Kombination aus Cisplatin (1,5 mg/kg) + ω -Conotoxin (0,2 μ g/kg) (kumulative Dosis von 2,4 μ g/kg ω -Conotoxin) behandelt wurden.

Die optische Auswertung der Ergebnisse der Adduktanfärbungen hat gezeigt, dass es durch die DAPI-Färbung der Zellkern-DNA (blau) zu einer Markierung aller im DRG befindlichen Zelltypen kommt. Die Zellkerne der Neuronen (weiße Pfeile) erscheinen hierbei wesentlich größer und weniger intensiv markiert, als die umliegenden Gliazellen (Mantelzellen). Die Färbungen gegen Cisplatin (rot) haben gezeigt, dass nur in den Mantelzellen Cisplatin/DNA-Addukte nachgewiesen werden konnten. Eine Platinierung der DNA der DRG-Neurone war nicht sichtbar. Durch die zusätzliche Behandlung mit ω -Conotoxin (0,2 μ g/kg) konnte kein optischer Unterschied festgestellt werden.

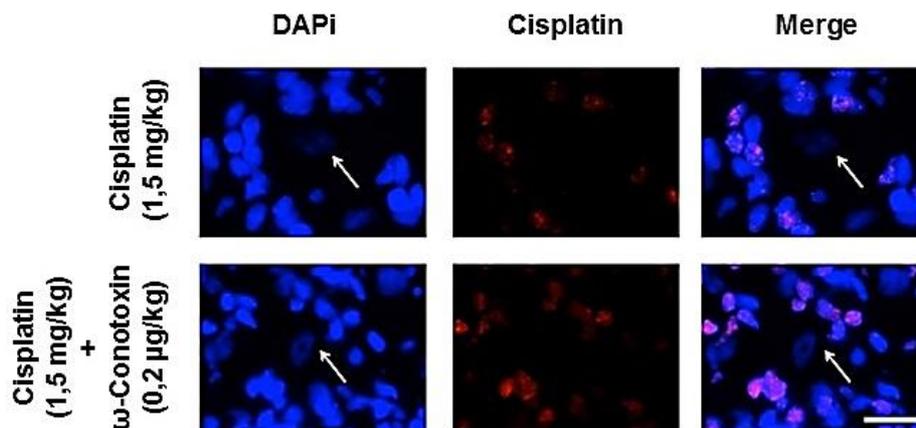


Abb. 36 Nachweis von Cisplatin/DNA-Addukten in DRGs nach repetitiver *in vivo* Cisplatin-Applikation. Im Rahmen von ICA-Färbungen konnten keine Cisplatin/DNA-Addukte in den Zellkernen von DRG-Neuronen nach repetitiven *in vivo* Cisplatin-Applikation nachgewiesen werden. Lediglich die die Neuronen umgebenden Mantelzellen wiesen starke Platinierungen ihrer DNA nach repetitiven *in vivo* Cisplatin-Applikationen auf. DAPI = blau; Cisplatin = rot; positive Zellen = violett; DRG-Neurone = weißer Pfeil. Maßstab: 100 μ m.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Cisplatin Ströme von VGCC in DRG-Neuronen modulieren kann. Die Modulation der einzelnen VGCC-Subtypen erfolgte hierbei unterschiedlich. Der N-Typ VGCC wies sowohl direkt nach Applikation, als auch nach längerer Exposition mit Cisplatin einen erhöhten Strom bzw. eine erhöhte Stromdichte auf. Auch erfolgte eine Zunahme des Proteinlevels dieser Kanäle. Durch die Vorbehandlung mit ω -Conotoxin konnte eine Cisplatin-bedingte Apoptose verhindert werden. Die repetitive Applikation mit ω -Conotoxin führte in Verhaltenstestungen zum Ausbleiben früher Anzeichen einer Cisplatin-induzierten Polyneuropathie. Dieser Effekt konnte auch nach Beendigung der Behandlung anhaltend beobachtet werden. Die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit werden in den folgenden Abschnitten diskutiert und in den aktuellen Kontext der Forschung eingeordnet.

4.1 Modulation von VGCC durch Cisplatin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Cisplatin auf VGCC und auf VGCC-Subtypen von kleinen DRG-Neuronen untersucht.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass es durch Cisplatin zu einer Störung der Calciumhomöostase in verschiedenen Zelltypen kommt. So führte eine Behandlung mit Cisplatin in Adenokarzinomzellen der Lunge zu einem geringeren Level an intrazellulärem Calcium (Liang and Huang, 2000). Auch eine Modulation des intrazellulären Calciums durch Cisplatin in HeLa-S3 und U2OS Zellen (Splettstoesser and Büsselberg, 2005), sowie in BGC823 Zellen (Magenkarzinomzellen) konnte gezeigt werden (Xing et al., 1999). Oxaliplatin führte in Untersuchungen an DRG-Neuronen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Kawashiri et al., 2012; Adams and Berecki, 2013).

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit der mögliche Einfluss von Cisplatin auf die Modulation von VGCC in DRG-Neuronen untersucht werden, da diese für die intrazelluläre Calciumhomöostase von Neuronen eine wichtige Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Cisplatin zu einer konzentrations- und aktivitätsabhängigen Reduktion der Ströme von VGCC führt. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits für andere spannungsabhängige Ionenkanäle, wie Kalium- oder Nat-

riumkanäle gezeigt werden (Tomaszewski and Busselberg, 2007). Hier führte Cisplatin zu einer Reduktion der VGCC-Ströme kleiner DRG-Neuronen, jedoch nicht zu einer Reduktion der Ströme großer DRG-Neuronen (Tomaszewski and Busselberg, 2007). Dies entspricht den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen zur Untersuchung des Einflusses von Cisplatin-Applikationen auf naive VGCC. Jedoch konnten im weiteren Verlauf dieser Studie unterschiedliche Modulationen der verschiedenen Subtypen von VGCC nachgewiesen werden. Diese werden im Kapitel 4.2 und den entsprechenden Unterpunkten (4.2.1-4.2.4) diskutiert.

Die Mechanismen der Modulation von VGCC durch Cisplatin sind bisher unklar. Für andere di- oder trivalente Kationen wie Zn^{2+} , Al^{3+} , oder Pb^{2+} wurde eine direkte Blockade der Ionenkanäle gezeigt (Busselberg et al., 1994; Busselberg, 1995; Florea and Busselberg, 2006). Da gezeigt wurde, dass die VGCC-Reduktion von der DRG-Neuronengröße abhängig ist, ist dies für Cisplatin weniger wahrscheinlich (Tomaszewski and Busselberg, 2007). Insbesondere in kleinen (a.e. nozizeptiven) Neuronen zeigt sich eine ausgeprägte Reduktion von $I_{Ca(V)}$. Dies legt nahe, dass durch Cisplatin eine indirekte Modulation von $I_{Ca(V)}$ stattfindet, z.B. über die Regulation von intrazellulären Signalwegen und deren Proteinen, wie beispielsweise Proteinkinasen.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Einfluss von Cisplatin auf VGCC der DRG-Neuronen über 24 h und 48 h zu einer signifikanten Erhöhung der Stromdichte von VGCC führt. Dies lässt vermuten, dass es durch die erhöhte Stromdichte der VGCC zu einem erhöhten Einstrom von Calcium in die DRG-Neuronen kommt, was einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge haben kann. Um dieses genauer zu überprüfen, sollte in zukünftigen Projekten das intrazelluläre Calcium vor und nach Cisplatin-Applikationen bzw. Expositionen gemessen werden. Hierfür bieten sich beispielsweise Calcium-Imaging Studien an.

Der in dieser Arbeit nachgewiesene Anstieg der Stromdichte durch die Exposition mit Cisplatin lässt sich nicht alleine mit der Regulierung der VGCC durch beispielweise Proteinkinasen erklären, da eine dauerhafte Phosphorylierung der VGCC, auf Grund von eintretenden Dephosphorylierungsprozessen durch Phosphatasen unwahrscheinlich erscheint. So weisen Phosphorylierungen durch Serin/Threonin-Kinasen eine relative Halbwertszeit von wenigen Stunden auf, wohin gegen Phosphorylierun-

gen durch Tyrosin-Kinasen nur wenige Minuten anhalten (Alberts et al., 2014). Hier liegt die Vermutung nahe, dass es durch die Behandlung der Neuronen zu einer Veränderung des Proteinlevels, möglicherweise durch Expression, der VGCC kommt. Ein vermehrtes Proteinlevel von funktionellen VGCC hätte somit bei jeder Depolarisation einen vermehrten Calciumeinstrom in die DRG-Neuronen zur Folge.

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur Modulation von VGCC durch Cisplatin unterstützen somit die der Arbeit zu Grunde liegenden Hypothese. Auch wenn es, wie zuvor beschrieben, zu einer Reduktion des $I_{Ca(V)}$ kommt, deutet die Erhöhung der Stromdichte auf eine Störung der Calciumhomöostase durch vermehrten Calciumeinstrom, z.B. über ein erhöhtes Proteinlevel bzw. vermehrte Expression der VGCC, hin. Auf Grund einer ungleichen Verteilung der einzelnen Subtypen in den DRG-Neuronen, kann ein Anstieg des $I_{Ca(V)}$ eines Subtyps, durch die Reduktion der anderen Subtypen von der im Gesamten stärkeren Reduktion überdeckt werden (Westenbroek et al., 1998; Murakami et al., 2001). Auch zwei unterschiedliche Wirkungsweisen von Cisplatin sind möglich (kurzfristig vs. langfristig), sodass eine signalvermittelte schnellen Regulation der VGCC durch Proteinkinasen unabhängig von anderen Prozessen auftreten kann (Boland et al., 1991; Barrett and Rittenhouse, 2000; Cho et al., 2001). Zusätzlich kann es durch die langfristige Behandlung der DRG-Neurone mit Cisplatin jedoch auch zu einer Aktivierung von Genexpressionsprozessen und dadurch zu einem vermehrten Einbau von VGCC in die Membran der Zellen kommen (Murphy et al., 1991; Wheeler et al., 2008; Wheeler et al., 2012). Dieses könnte zu der beobachteten Erhöhung der Stromdichte beitragen.

Studien zur Rolle von VGCC bei Polyneuropathien sind z.T. widersprüchlich. So konnte bei Modellen zur diabetischen Polyneuropathie gezeigt werden, dass es zu einer Zunahme der Stromdichte bzw. der Funktion von VGCC in DRG-Neuronen kommt (Jagodic et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte bei anderen fokalen Nervenläsionsmodellen eine Abnahme der Calciumstromdichte in DRG-Neuronen nachgewiesen werden (Fuchs et al., 2007; Hogan, 2007). Durch elektrophysiologische Untersuchung von DRG-Neuronen aus Ratten mit neuropathischen Schmerzen nach einer CCI konnte eine Reduktion der Calciumstromdichte, gegenüber DRG-Neuronen von Tieren mit normalen sensorischen Funktionen, festgestellt werden (Hogan, 2007).

Studien zur Rolle von VGCC bei Platin-induzierten schmerzhaften Polyneuropathien sind nicht beschrieben. Die unterschiedlichen Ergebnisse anderer Modelle unterstreichen jedoch, dass sowohl einheitliche als auch parallele Prozesse in die Pathogenese involviert sein können.

4.2 Modulation von VGCC-Subtypen durch Cisplatin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Cisplatin auf die Ströme verschiedener Subtypen von spannungsabhängigen Calciumkanälen, sowie auf deren Proteinlevel hin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die verschiedenen Subtypen von VGCC unterschiedlich durch Cisplatin moduliert wurden.

4.2.1 Modulation von L-Typ VGCC durch Cisplatin

Die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigen, dass Cisplatin zu einer Reduktion von $I_{Ca(V)}$ des L-Typs führt. Änderungen der Stromdichte und des Proteinlevels von L-Typ VGCC nach Cisplatin-Inkubation traten nicht auf.

L-Typ VGCC scheinen in der Pathogenese von Polyneuropathien, gegenüber anderen Subtypen, nur eine geringe Rolle zu spielen. Dies könnte durch ihre Lokalisation in der Membran des Somas von DRG-Neuronen begründet sein. Hierdurch kommt ihnen keine Beteiligung an der Freisetzung von Neurotransmittern bei der Schmerztransduktion zu (Hell et al., 1993a). Dennoch konnte in verschiedenen Studien mit Schmerzmodellen eine Modulation der Funktion dieser Kanäle beobachtet werden. So konnte beispielsweise eine Abnahme von L-Typ VGCC-Strömen nach Verletzungen von sensorischen Nervenbahnen beschrieben werden. In Patch-Clamp Messungen wurde gezeigt, dass neben VGCC des N-Typs, L-Typ Kanäle den größten Beitrag zu $I_{Ca(V)}$ unter Kontrollbedingungen leisten. Jedoch erfuhren diese auch nach Spinalnervligaturen (SNL) die stärkste Reduktion (McCallum et al., 2011). Auch bei inflammatorischen Schmerzmodellen und nach SNL konnten Verringerungen des L-Typ $I_{Ca(V)}$ nachgewiesen werden (Fuchs et al., 2007; McCallum et al., 2011). Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Oxaliplatin-induzierte Kälte-Hyperalgesie bei Ratten durch die Behandlung mit dem L-Typ VGCC Blocker Nifedipin vermindert werden konnte (Kawashiri et al., 2012).

Durch Cisplatin kommt es zu einer Reduktion des $I_{Ca(V)}$, die Stromdichte, sowie das Proteinlevel dieses Subtyps verändern sich jedoch nicht. Somit scheinen L-Typ VGCC in der Genese von Cisplatin-induzierten Polyneuropathien eher von untergeordneter Bedeutung.

4.2.2 Modulation von P-/Q-Typ VGCC durch Cisplatin

Bei der Isolation von P-/Q-Typ VGCC führte Cisplatin im Vergleich zu anderen Kanaltypen zu einer geringeren Reduktion von $I_{Ca(V)}$. Eine Veränderung der Stromdichte oder Hinweise für eine Änderung des Proteinlevels von P-/Q-Typ VGCC zeigten sich nicht.

VGCC des P-/Q-Typs sind überwiegend in den synaptischen Endigungen der Neurone lokalisiert. Hier durch besitzen sie eine wichtige Funktion bei der Freisetzung von Neurotransmittern (Westenbroek et al., 1995; Westenbroek et al., 1998).

Die Rolle von P-/Q-Typ VGCC bei der Nozizeption wird jedoch kontrovers diskutiert (Matthews et al., 2001; Striessnig & Koschak, 2008). Nach SNL und in inflammatorischen Neuropathiemodellen wurde eine Reduktion der Ströme beschrieben (Fuchs et al., 2007; McCallum et al., 2011). Konkordant zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte auch im SNL-Modell durch die Verwendung des P-/Q-Typ Blockers ω -Agatoxin gezeigt werden, dass P-/Q-Kanäle für neuropathische Prozesse von geringer Bedeutung sind (Matthews and Dickenson, 2001).

4.2.3 Modulation von T-Typ VGCC nach Cisplatin

VGCC des T-Typs sind hauptsächlich auf den Dendriten von Neuronen lokalisiert, kommen jedoch auch in deren synaptischen Endigungen vor (Cain & Snutch, 2001). Die Aktivierung von T-Typ VGCC erfolgt nahe dem Ruhemembranpotential, daher sind sie wichtig für die Regulation neuronaler Erregbarkeit (Nelson et al., 2006).

In den letzten Jahren wurde in einer Vielzahl von Studien die Bedeutung von T-Typ VGCC für die Signalwege der Nozizeption gezeigt (Bourinet et al., 2005; Ikeda et al., 2006; Choi et al., 2007; Latham et al., 2009). Als Modell wurden dabei jedoch diabetische- und fokale Neuropathien benutzt. Studien zur Rolle von T-Typ VGCC bei Cisplatin-induzierten Polyneuropathien sind nicht beschrieben.

In der vorliegenden Studie führte Cisplatin zwar zu einer Reduktion der T-Typ $I_{Ca(V)}$, ein Einfluss auf die Stromdichte der T-Typ VGCC, sowie auf das Proteinlevel wurde jedoch nicht beobachtet.

In-Situ-Hybridisierungsstudien haben gezeigt, dass alle Isoformen des T-Typ VGCC auf DRG-Neuronen lokalisiert sein können (Talley et al., 1999). Mit Hilfe von Patch-Clamp Studien konnte gezeigt werden, dass jedoch nur Cav3.2 eine funktionelle Bedeutung in nozizeptiven DRG-Neuronen hat (Chen et al., 2003; Bourinet et al., 2005; Nelson et al., 2006; Messinger et al., 2009). In Studien mit Tiermodellen zu neuropathischen Schmerzen, die durch fokale Nervenläsionen verursacht werden, rief die CCI eine Reduktion der Stromdichte von T-Typ VGCC in DRG-Neuronen mittlerer Größe hervor (McCallum et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnte in akut dissoziierten kleinen Neuronen von L4-5 DRGs der Ratte, die sich ipsilateral zur CCI befanden, eine signifikante Erhöhung der T-Typ Stromdichte gezeigt werden. Zellen mittlerer Größe hingegen wiesen keine Zunahme der Stromdichte auf (Jagodinic et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse konnten Yue und Kollegen zeigen. Auch hier wurden nach Nervenläsionen in kleinen, aber nicht in mittleren oder großen DRG-Neuronen erhöhte T-Typ Ströme nachgewiesen (Yue et al., 2013). Im Rahmen von diabetischen Polyneuropathien konnten erhöhte T-Typ VGCC Stromdichten in kleinen DRG-Neuronen nachgewiesen werden (Hall et al., 1995). Wurden Cav3.2 Knock-out Modelle zu STZ (Streptozotocin)-induzierten diabetischen Neuropathien verwendet, konnte eine mechanische und thermale Hyperalgesie *in vivo* verhindert werden (Messinger et al., 2009).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit stehen damit im Kontrast zu den verschiedenen Neuropathiemodellen, was auf eine andere Pathogenese hinweist, bei der T-Typ VGCC eher von geringerer Bedeutung sind.

4.2.4 Modulation von N-Typ VGCC nach Cisplatin

Auf Grund der Lokalisation des N-Typ VGCC in den axonalen Endigungen von DRG-Neuronen kommt ihnen eine tragende Rolle beim präsynaptischen Calciumeintritt und der damit verbundenen Freisetzung von Neurotransmittern zu (Westenbroek et al., 1992; Westenbroek et al., 1995; Westenbroek et al., 1998; Reid et al., 2003). Innerhalb der Nerventerminale von DRG-Neuronen sind N-Typ VGCC mit Substanz P

ko-lokalisiert, das ein Neuropeptid mit Wichtigkeit für Schmerz und Nozizeption darstellt (Westenbroek et al., 1995; Murakami et al., 2001).

Cisplatin führte zu einer deutlichen Zunahme von N-Typ $I_{Ca(v)}$. Auch die Inkubation mit Cisplatin hatte eine Zunahme der Stromdichte zur Folge. In ICC-Färbungen konnte ein erhöhtes Proteinlevel der N-Typ VGCC nach Cisplatin-Exposition, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen werden.

Veränderungen der N-Typ Funktionen in sensorischen Neuronen werden immer wieder für die Entwicklung von chronischen und neuropathischen Schmerzen verantwortlich gemacht (Snutch, 2005; Zamponi et al., 2009; Park and Luo, 2010; Pexton et al., 2011). Bereits in anderen neuropathischen Modellen bzw. Schmerzmodellen konnte für den N-Typ VGCC eine wichtige Rolle aufgezeigt werden. So konnte in Studien mit Tiermodellen zu schmerzhaften Polyneuropathien nach Nervenläsionen eine starke Zunahme der $\alpha 2\delta 1$ Untereinheit, wie sie in VGCC des N-Typs vorkommt, nachgewiesen werden (Luo et al., 2001; Newton et al., 2001; Narita et al., 2007; Bauer et al., 2009). Luo und Kollegen konnten zeigen, dass das Expressionslevel dieser Untereinheit in den DRG-Neuronen mit der Entwicklung von Allodynien korreliert (Luo et al., 2001). Jedoch wurde auch eine Reduktion der Ströme des N-Typs nach Nervenläsion in anderen elektrophysiologischen Arbeiten gezeigt (McCallum et al., 2011).

Die Bedeutung von N-Typ VGCC für die synaptische Transmission zwischen sensorischen Fasern der DRGs und den Hinterwurzelneuronen konnte an Studien mit Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Mäuse denen der N-Typ VGCC fehlte, zeigten sich weniger sensitiv für Inflammationen und neuropathische Schmerzen (Hatakeyama et al., 2001; Saegusa et al., 2001). So zeigten solche Tiere in Verhaltenstestungen stark reduzierte nozizeptive Antworten (Hatakeyama et al., 2001). Wurden SNL an N-Typ-Knockout-Mäusen durchgeführt, wiesen diese weniger neuropathische Symptome, wie mechanische Allodynien oder thermale Hyperalgesien, auf (Saegusa et al., 2001). Die bedeutende Rolle von N-Typ VGCC bei Schmerzprozessen konnte auch durch Inhibitions-Studien an verschiedenen Tiermodellen zu CCI oder diabetischen Neuropathien gezeigt werden. So führte die Blockade der N-Typ VGCC zu deutlichen Schmerzverminderungen (Ikeda et al., 2003; Altier and Zamponi, 2004; Snutch, 2005; Zamponi et al., 2009).

Auf Grund der Bedeutung von N-Typ VGCC für die Genese von schmerzhaften Polyneuropathien nach Nervenläsionen und für die Transduktion von Schmerzempfinden, sowie den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, liegt die Vermutung nahe, dass N-Typ VGCC auch eine wichtige Rolle bei der Genese von schmerzhaften Polyneuropathien nach Cisplatin-Behandlung spielen könnten. Das erhöhte Proteinlevel der N-Typ VGCC durch Cisplatin-Exposition könnte auf eine vermehrte Expression des N-Typs hinweisen. Um dieses genauer zu untersuchen, wären PCR-Messungen auf mRNA-Level notwendig. Jedoch gilt es hierbei zu bedenken, dass ein erhöhtes Level an mRNA, auf Grund von Kontrollprozessen auf verschiedenen Ebenen der Genexpression, nicht zwangsläufig zu einem vermehrten Einbau von funktionellen Proteinen führen muss (Alberts et al., 2014). Eine weitere Möglichkeit, wären immunozytochemische, oder -histochemische Färbungen gegen den N-Typ nach Cisplatin-Exposition bei inhibierter Proteinsynthese. Auf Grund der in dieser Arbeit jedoch durchgeführten Inhibition der Calcium/Calmodulinkinase II, die eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung von CREB und damit bei der Expression von Genen spielt, und dem dadurch ausgebliebenen Anstieg der N-Typ VGCC Stromdichte nach Cisplatin-Exposition, deutet dies auf eine Zunahme des Proteinlevels nach vermehrter Genexpression hin.

Durch das erhöhte Proteinlevel von N-Typ VGCC wäre es somit denkbar, dass es zu einem vermehrten Calciumeinstrom in die synaptischen Endigungen kommt, wodurch eine Steigerung der Freisetzung des Neurotransmitters Substanz P mit nozizeptiver Folge bedingt sein kann (Snutch, 2005). Somit könnte der N-Typ VGCC auch für die anhaltende oder verstärkte Schmerzempfindung der betroffenen Patienten ein wichtiger Faktor sein. Zusätzlich kann der vermehrte Calciumeinstrom über diese Kanäle eine Störung der Calciumhomöostase mit der Aktivierung von apoptotischen Prozessen hervorrufen (Mattson and Chan, 2003).

4.2.5 Regulation von VGCC-Subtypen durch Cisplatin

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des N-Typ Stroms nach Cisplatin-Gabe PKC vermittelt ist.

Die PKC stellt ein mögliches Protein zur Regulation der Funktion der einzelnen VGCC-Subtypen durch Cisplatin dar.

Bei der PKC handelt es sich um eine Serin/Threonin-Proteinkinase. Ihre Funktion wird zum einen durch Phosphorylierungsprozesse hervorgerufen. Zum anderen durch die Bindung von „second messengern“ wie 1,2-Diacylglycerin (DAG) (Newton, 1995, 1997; Sieber et al., 1998).

Eine Modulation der Aktivität und Funktion von VGCC-Subtypen durch PKC konnte bei der Reduktion von L-Typ Strömen durch Bradykinin, beispielsweise in DRG-Neuronen nachgewiesen werden (Boland et al., 1991; Baumgarten et al., 1992). Auch eine PKC-abhängige Reduktion über Neurokinin-1 Aktivierung wurde in HEK-Zellen beschrieben. Ströme von T-Typ VGCC konnten in Studien mit HEK-Zellen über diesen Signalweg ebenfalls vermindert werden (Yang et al., 2009; Rangel et al., 2010). Ströme durch P-/Q-Typ VGCC werden ebenfalls PKC-abhängig reduziert (Cho et al., 2001). Kontroverse Effekte zeigen sich bei der PKC-abhängige Regulation von N-Typ VGCC. Während in sensorischen Neuronen von Hühnern eine PKC-abhängige Inhibition von N-Typ $I_{Ca(V)}$ beobachtet wurde (Rane et al., 1989; Luebke and Dunlap, 1994), konnten in den Zellen von Fröschen und Säugern hingegen, PKC-vermittelt, erhöhte Ströme von N-Typen in „whole-cell“ Patch-Clamp gemessen werden, wie sie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnten (Hamid et al., 1999; Barrett and Rittenhouse, 2000).

Dies zeigt, dass die unterschiedliche Modulation von VGCC-Subtypen nach Cisplatin-Applikation durch PKC möglich ist.

Eine Möglichkeit zur Aktivierung der PKC durch Cisplatin könnten membranständige Oberflächenrezeptoren darstellen. Der Einfluss von Cisplatin auf unterschiedliche Oberflächenrezeptoren ist unklar. So konnte bisher kein eigenständiger Rezeptor für Cisplatin nachgewiesen werden, jedoch konnte für den „Epidermal Growth Factor-receptor“ (EGFR) gezeigt werden, dass die Behandlung von verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise humane Gliomzellen, mit Cisplatin zur Aktivierung des EGFR und dessen Signalwegen führte (Benhar et al., 2002). Innerhalb dieser Signalwege kommt es zur Aktivierung der PKC. So führt die Bindung eines Agonisten an EGFR zur Aktivierung der Phospholipase-C (PLC), die durch Hydrolyse Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) spaltet. Der „second messenger“ DAG führt dann zur Aktivierung der PKC.

Diese könnte daher die N-Typ VGCC, sowie die weiteren Subtypen in ihrer Funktion regulieren.

Parallel wird durch IP_3 zusätzlich Calcium aus dem ER freigesetzt. Der Anstieg des Calciums begünstigt die Aktivierung regulatorischer Proteine z.B. Calmodulin (CaM), das unter anderem zur Aktivierung von CaM-abhängigen Kinasen (CaMK) führt (Wheeler et al., 1994; Clapham, 2007; Wheeler et al., 2008). CaMKs aktivieren „cAMP response element-binding protein“ (CREB), wodurch Gentranskription vermittelt werden kann. Dieser Prozess könnte somit auch zum vermehrten Einbau von N-Typ VGCC führen. Eine Calcium-vermittelte Genexpression, die zum Einbau neuer Ionenkanäle in die Membran eines Neurons führt, ist besonders für das Phänomen der Langzeit-Potenzierung im Rahmen der Gedächtnisbildung untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Einstrom von Calcium durch NMDA-Rezeptoren zur Aktivierung von PKC und CaMK II führt. Dies wiederum führt zur CREB-basierten Genexpression und zum vermehrten Einbau von AMPA- und Kainat-Rezeptoren (Schwartzkroin and Wester, 1975; Bliss and Collingridge, 1993; Nicoll and Malenka, 1995). Auch für VGCC des L-Typs konnte in hippokampalen, sowie in kortikalen Neuronen eine solche Signalkaskade beschrieben werden (Murphy et al., 1991; Impey et al., 1996; Wheeler et al., 2008). Eine N-Typ vermittelte Gentranskription über CREB durch CaMK konnte jedoch nur für hippokampale Neuronen nachgewiesen werden (Wheeler et al., 2012).

Cisplatin könnte somit zu einem CaMK II-vermittelten Einbau von N-Typ VGCC in die Membran der DRG-Neuronen führen und daher das Korrelat der erhöhten Stromdichte sein. Dieses wird insbesondere durch die in dieser Arbeit durchgeführten Stromdichtenmessungen der N-Typ VGCC bei Inhibition der CaMK II unterstützt. Durch die Inhibition von CaMK II führte die Exposition der kultivierten DRG-Neuronen mit Cisplatin zu keiner Erhöhung der Stromdichte.

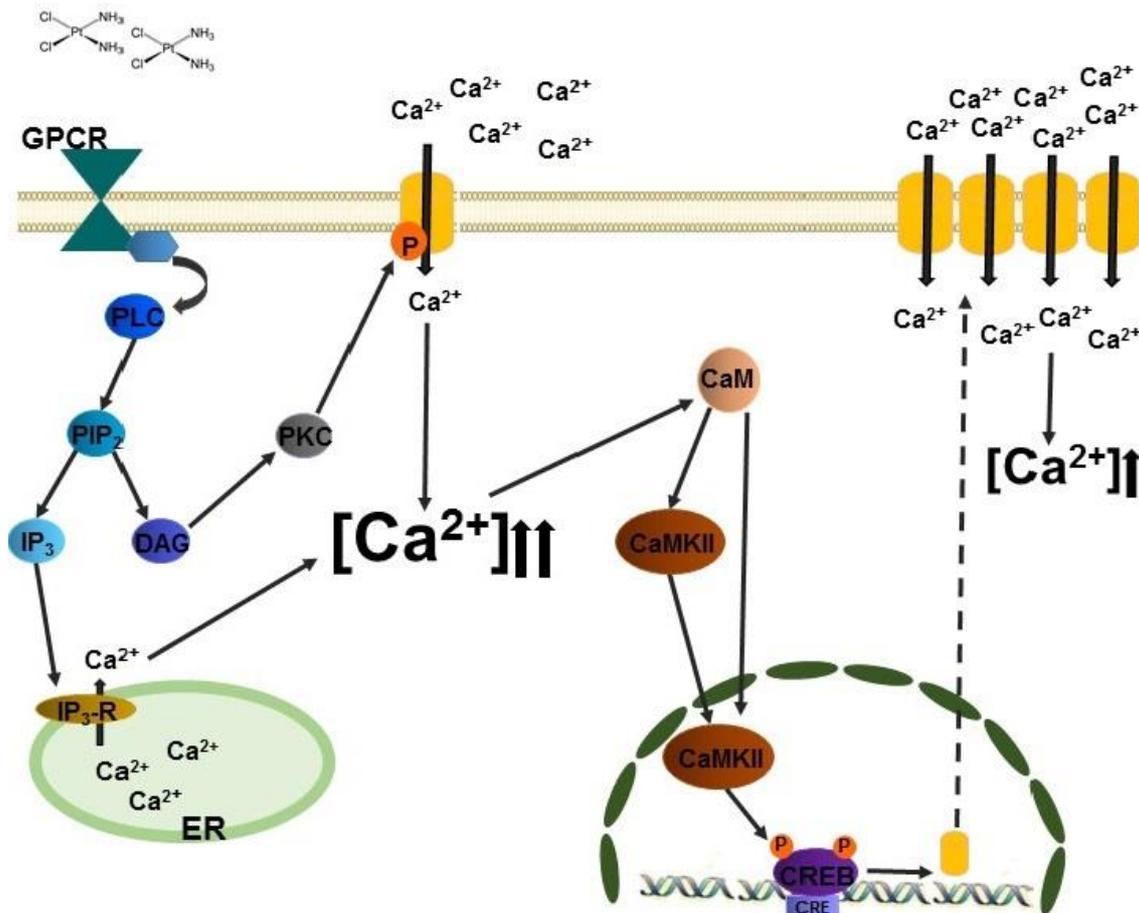


Abb. 37 Mögliche Mechanismen der Regulation der N-Typ VGCC-Ströme in DRG-Neuronen durch Cisplatin. Durch die Bindung von Cisplatin an Membranrezeptoren, wie beispielsweise EGFR, kommt es zur Aktivierung von PLC. PLC spaltet PIP₂ in IP₃ und DAG. DAG aktiviert PKC, dies führt über die Phosphorylierung von N-Typ VGCC zu einem verstärkten Calcium-Einstrom. Zusätzlich kann IP₃ über die Bindung an das endoplasmatische Retikulum (ER) zur Freisetzung von Calcium in das Zytosol führen. Der Anstieg des intrazellulären Calciums führt über Calmodulin (CaM) zur Aktivierung von Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaMK). CaMK können CREB phosphorylieren und führen damit zur Genexpression von N-Typ VGCC (Original; M. Leo).

4.3 Einfluss von Cisplatin und ω -Conotoxin auf die Apoptose von DRG-Neuronen

Die Untersuchungen zum Einfluss von Cisplatin auf das Überleben von DRG-Neuronen haben gezeigt, dass Cisplatin zu einer Zunahme der Apoptoserate von DRG-Neuronen führt. Unter zusätzlicher Ko-Exposition mit ω -Conotoxin war dies vermindert.

In verschiedenen Studien konnte die neurotoxische Wirkung von Cisplatin auf DRG-Neuronen nachgewiesen werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Cisplatin zur Translokation des Bax-Proteins in die Mitochondrien führt, mit der Folge einer Freisetzung von Cytochrom c, und der Aktivierung von Caspase-3, die zur Apoptose führt (Gill and Windebank, 1998; McDonald and Windebank, 2002). Des Weiteren kommt es durch die Behandlung mit Cisplatin zur Bildung von Addukten mit der mitochondrialen DNA in den DRG-Neuronen. Dies führt zu Veränderungen der mitochondrialen DNA (mtDNA) Replikation und Transkription, welches in eine mitochondrialen Dysfunktion resultieren kann (Podratz et al., 2011).

Neben diesen Mechanismen, ist auch eine Regulation der Apoptose über Calcium möglich (Abb. 36). Durch die Zunahme des Proteinlevels von N-Typ VGCC, kann ein kritischer Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in DRG-Neurone zu einem verstärkten Einstrom von Calcium in die DRG-Neuronen führen. Die dadurch entstehende Calciumüberladung in den Mitochondrien initiiert die Freisetzung von Cytochrom c. Dies kann anschließend über die Aktivierung von Caspasen zur Einleitung der Apoptose führen (Mattson and Chan, 2003). Eine direkte Aktivierung der Caspasen (Caspase-12 → Caspase-3) durch Calcium oder die Aktivierung der Caspase-3 durch Calcium-aktivierte Calpaine ist ebenfalls möglich (Mattson and Chan, 2003; Smaili et al., 2013).

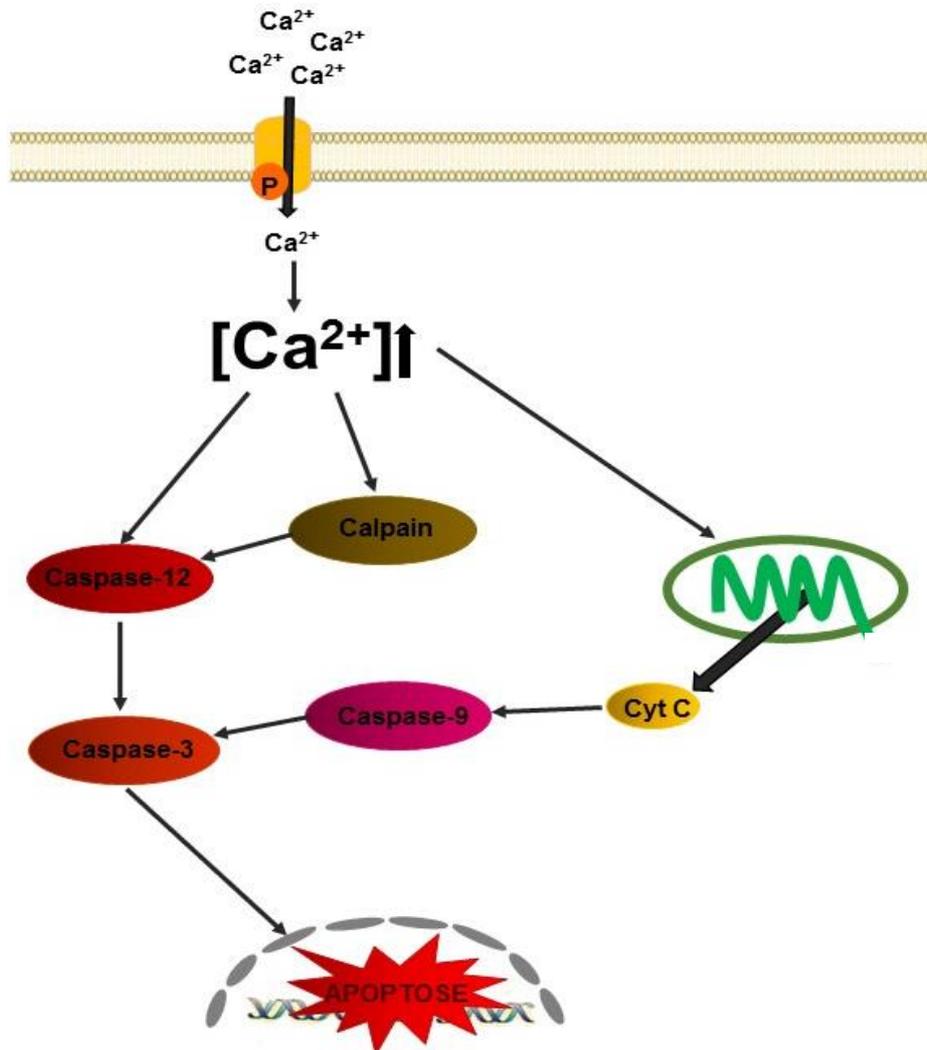


Abb. 38 Mechanismen der Calcium-basierten Neurotoxizität von Cisplatin. Durch die Behandlung der DRG-Neuronen kommt es zu einem vermehrten Einbau von N-Typ VGCC in die Membran. Der kritische Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt zur mitochondrialen Aufnahme von Calcium und damit zur Freisetzung von Cytochrom c. Cytochrom c aktiviert über Caspase-9 Caspase-3. Dies wiederum hat die Apoptose zur Folge. Alternativ kann eine Apoptose über Aktivierung von Calpain oder durch die Aktivierung der Caspase-12 erfolgen (Original; M. Leo).

4.4 Einfluss von Cisplatin und ω -Conotoxin auf das Schmerz-assoziierte und motorische Verhalten

Die Ergebnisse der Verhaltenstestungen zeigen, dass ω -Conotoxin das Auftreten von klinischen Zeichen einer Polyneuropathie verhindert.

ω -Conotoxin ist ein marines Toxin, das aus dem Gift der Kegelschnecke *Conus magus* isoliert wird (Bowersox and Luther, 1998; Schmidtko et al., 2010; Rigo et al., 2013). Es handelt sich um einen selektiven N-Typ VGCC Blocker, der in synthetischer Form (Ziconotid) auch in der Behandlung von chronischen Schmerzen eingesetzt wird (Staats et al., 2004; Prommer, 2006). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass die intrathekale Gabe von Ziconotid zu einer langanhaltenden Unterdrückung von Schmerz-assoziiertem Verhalten, wie taktilen Allodynien oder thermalen Hyperalgesien, führte (Malmberg and Yaksh, 1995; Bowersox and Luther, 1998; Vanegas and Schaible, 2000; Snutch, 2005; Wallace, 2006).

16 Tage nach der letzten Applikation von ω -Conotoxin konnten bei den mit Cisplatin/ ω -Conotoxin behandelten Versuchstieren in der vorliegenden Arbeit keine polyneuropathischen Symptome nachgewiesen werden. Da es sich bei ω -Conotoxin um ein Peptid mit kurzer Halbwertszeit handelt, kann hier eine präventive Wirkung angenommen werden. Eine Erklärung für diesen Effekt könnte hierbei eine mögliche Inhibition der N-Typ Überexpression und damit der Calciumüberladung der Zelle sein. Konkordant dazu konnte gezeigt werden, dass das Auftreten einer mechanischen Allodynie mit dem Auftreten von $\alpha\delta 1$ Untereinheiten zusammenhängt (Luo et al., 2001).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass ω -Conotoxin, durch eine selektive Inhibition der N-Typ VGCC vermittelten Calciumüberladung, zu einer verminderten Toxizität von Cisplatin führen könnte. Da der Einsatz von Ziconotid bereits klinisch erfolgt, wäre eine Übertragung der Hypothese im Sinne einer „bench-to bedside“-Studie denkbar. Bei ω -Conotoxin handelt es sich um einen selektiven N-Typ VGCC Blocker und da diese spannungsgesteuerten Ionenkanäle nur neuronal vorkommen, handelt es sich um einen Neuronen-spezifischen Therapieansatz, welcher die Behandlung des eigentlichen Tumors nicht limitieren sollte. Im Gegensatz dazu könnte der Versuch der Inhibition der Platin-Aufnahme durch die Blockade, der diesen Transport vermittelnden Strukturen, wie „Organic Cation Transporter“ (OCT) oder Kupfer-Transporter, die Aufnahme des Zytostatikums in die Tumorzelle stark einschränken (Mendus, 2010).

4.5 Platin-Addukte vs. Störung der Calciumhomöostase

In der Literatur wird die Bildung von Platin/DNA-Addukten für die Schädigung oder Störung der DRG-Neurone und der daraus resultierenden Polyneuropathien nach Cisplatin-Behandlungen verantwortlich gemacht (Dzagnidze et al., 2007).

Als möglicher Mechanismus der Neurotoxizität von Cisplatin wird deshalb dessen Wirkung als Inhibitor der DNA-Replikation diskutiert. Da es sich bei DRG-Neuronen jedoch um postmitotische Zellen handelt und eine Replikation der DNA nicht mehr stattfindet, erscheint dies als alleiniges Erklärungsmodell unwahrscheinlich.

So konnte zwar in Studien durch die Gabe von Erythropoietin die elektrophysiologischen Anzeichen einer CIN signifikant verringert werden, eine Verhinderung der Bildung von Platin/DNA-Addukten bzw. eine Verringerung dieser, konnte nicht nachgewiesen werden (Yoon et al., 2009). Auch scheint es so, dass in proliferierenden Zellen, sowie in Tumorzellen zwar die DNA-Synthese durch die Gabe von Cisplatin stark gehemmt wird, eine Hemmung der RNA- und Protein-Synthese hingegen weniger deutlich und wenn, nur für kurze Zeit erfolgt, so dass eine Aufrechterhaltung des Proteinhaushaltes stattfinden könnte. Für eine anhaltende Hemmung der RNA- und Protein-Synthese wäre die Applikation von Cisplatin in Konzentrationen nötig, welche weit über den therapeutischen Dosen liegen würden (Lippert and Beck, 1983). Dies spricht somit dafür, dass neuronale DNA zwar platinieren kann, aber dies nicht zwangsläufig zum Untergang der Zellen führen muss, da weiterhin RNA und Protein-Synthese stattfinden kann. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit durch die vermehrte Expression bzw. durch das erhöhte Proteinlevel von N-Typ VGCC in den behandelten DRG-Neuronen bestätigt werden. Ebenfalls konnte in dieser Arbeit an Untersuchungen der DRGs aus den Tieren der Verhaltenstestungen gezeigt werden, dass auch 16 Tage nach Beendigung der Cisplatin-Applikationen keinerlei Cisplatin/DNA-Addukte in den DRG-Neuronen der behandelten Tiere nachgewiesen werden konnten. Da es bei den mit Cisplatin behandelten Tieren jedoch zur Ausprägung deutlicher neuropathischer Symptome kam und diese auch nach Beendigung der Behandlungen anhielten, könnte das darauf hindeuten, dass Platin/DNA-Addukte keine alleinige Rolle für die Genese früher neuropathischer Anzeichen nach Cisplatin-Behandlungen spielen. Vielmehr deutet das gezeigte Ausbleiben dieser Sympto-

me durch die zusätzliche Behandlung mit ω -Conotoxin darauf hin, dass es sich primär um einen Calcium-bedingten Effekt handelt.

Auch die in der Literatur beschriebenen Mechanismen der Induktion der Apoptose durch Cisplatin, stellen keinen eindeutigen Beweis für eine alleinige Rolle der Platin/DNA-Addukte an der Genese von CIN dar (Gill and Windebank, 1998; McDonald and Windebank, 2002). So kann beispielsweise eine Cytochrom-c-vermittelte Aktivierung der Caspasen auch durch eine Calciumüberladung bedingt sein (Mattson and Chan, 2003). Für eine Beteiligung von Calcium bzw. VGCC an der Genese der CIN sprechen die in dieser Arbeit, insbesondere die in den Verhaltenstestungen, erzielten Ergebnisse durch die Blockade der N-Typ VGCC mit ω -Conotoxin.

Trotz dieser Ergebnisse kann zum jetzigen Zeitpunkt eine Rolle der Platin/DNA-Addukte an der Genese der CIN nicht ausgeschlossen werden und bedarf in Zukunft genauerer Untersuchungen. Insbesondere die deutliche Adduktbildung in den Mantelzellen deutet darauf hin, dass auch die Schädigung dieses Zelltyps zur Neurotoxizität von Cisplatin beitragen kann. Hierbei wäre vor allem eine Rolle bei dem Phänomen des „Coastings“ in Betracht zu ziehen.

4.6 Ausblick

In zukünftigen Projekten sollten in erster Linie die in dieser Arbeit beschriebenen regulativen Mechanismen, sowie folgende Punkte, genauer untersucht werden:

- Untersuchung des Einflusses von Cisplatin auf verschiedene Oberflächenrezeptoren wie Bradykinin-, Neuregulin- und EGF-Rezeptoren
- Untersuchungen des zeitlichen Expressionsmusters von N-Typ VGCC bei langfristiger Cisplatin-Behandlung
- Untersuchung der Glia-Zellen in den DRGs, da diese auch Platin/DNA-Addukte anreichern können

Hierdurch könnten ein breiteres Verständnis für die Mechanismen der Genese, sowie weitere Erkenntnisse für neue und noch effektivere Möglichkeiten zur Behandlung bzw. Verhinderung von schmerzhaften Polyneuropathien durch Cisplatin gewonnen

werden. Insbesondere die Untersuchung der Glia-Zellen, welche die DRG-Neurone umgeben, stellt einen interessanten und wichtigen Ansatz für zukünftige Projekte dar.

5. Zusammenfassung

Auch heute noch spielen Platin-haltige Zytostatika eine wichtige Rolle in der Therapie diverser Krebserkrankungen. Neben ihrer Effektivität in der Behandlung des Tumors führen sie jedoch immer wieder zu schweren Nebenwirkungen. Eine der häufigsten Nebenwirkungen, mit starkem Einfluss auf das Wohlbefinden der Betroffenen, sind schmerzhaft periphere Polyneuropathien. Im Gegensatz zu den Mechanismen der Wirkung von Platin-haltigen Zytostatika auf Tumorzellen, sind die Mechanismen für die Entstehung von Polyneuropathien nicht vollständig verstanden. Einen möglichen Ansatz liefert die bereits in der Literatur beschriebene Störung der intrazellulären Calcium-Homöostase in DRG-Neuronen durch Platin-haltige Zytostatika.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von Cisplatin auf die verschiedenen Subtypen von spannungsabhängigen Calciumkanälen (VGCC) mit Hilfe von Patch-Clamp Messungen, immunozytochemischen und immunohistochemischen Färbungen, sowie Verhaltenstestungen untersucht werden. Das Ziel dabei war es, erste Untersuchungen der Calcium-basierten neurotoxischen und neuroprotektiven Mechanismen der Cisplatin-induzierten Polyneuropathien durchzuführen.

Durch elektrophysiologische Messungen konnte hierbei gezeigt werden, dass Cisplatin die Subtypen von spannungsabhängigen Calciumkanälen unterschiedlich moduliert. So wurden die Ströme der Calciumkanäle des L-Typs, P-/Q-Typs und T-Typs reduziert, wohingegen eine Proteinkinase C vermittelte Zunahme von N-Typ VGCC beobachtet werden konnte.

Durch die Exposition der kultivierten DRG-Neuronen mit Cisplatin konnte eine CaMK II-assoziierte erhöhte Stromdichte von N-Typ VGCC nachgewiesen werden. Diese Erhöhung konnte mit einem erhöhten Proteinlevel dieser Kanäle in Zusammenhang gebracht werden. Auch nach *in vivo* Cisplatin-Applikation zeigte sich eine signifikante Proteinlevel-Erhöhung der N-Typ VGCC.

In Apoptose-Experimenten zeigte sich, dass die durch Cisplatin erhöhte Apoptoserate durch Blockade der N-Typ VGCC mit 1 μ M ω -Conotoxin gesenkt werden konnte. Dieses spricht somit für eine Calcium-vermittelte Neurotoxizität von Cisplatin.

In Verhaltenstestungen konnte durch die i.v. Gabe von ω -Conotoxin frühe Anzeichen einer Cisplatin-induzierten Polyneuropathie verhindert werden.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte der N-Typ VGCC als wichtiger Faktor für die Genese von schmerzhaften Polyneuropathien nach Cisplatin-Applikationen identifiziert werden. Erstmals konnte der Einfluss von Cisplatin auf die Subtypen von VGCC beschrieben werden. Durch die Blockade der N-Typ VGCC mit ω -Conotoxin konnte die Induktion einer Polyneuropathie durch Cisplatin *in vivo* verhindert werden. Dies könnte bereits in naher Zukunft auch in der Therapie bzw. Prävention von Cisplatin-induzierten Polyneuropathien untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- Adams DJ, Berecki G (2013) Mechanisms of conotoxin inhibition of N-type (Ca_v2.2) calcium channels. *Biochimica et biophysica acta* 1828:1619-1628.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition. Garland Publishing.
- Al-Taweel N, Varghese E, Florea AM, Busselberg D (2014) Cisplatin (CDDP) triggers cell death of MCF-7 cells following disruption of intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) homeostasis. *J Toxicol Sci* 39:765-774.
- Altier C, Zamponi GW (2004) Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends in pharmacological sciences* 25:465-470.
- Amptoulach S, Tsavaris N (2011) Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemother Res Pract* 2011:843019.
- Bakowski D, Parekh AB (2007) Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid. *Curr Biol* 17:1076-1081.
- Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C (2008) Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary and comparative oncology* 6:1-18.
- Baron R, Mahn F (2010) [Types of topical treatment for peripheral neuropathic pain : Mechanism of action and indications]. *Schmerz* 24:317-325.
- Barrett CF, Rittenhouse AR (2000) Modulation of N-type calcium channel activity by G-proteins and protein kinase C. *The Journal of general physiology* 115:277-286.
- Bauer CS, Nieto-Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, Kadurin I, Sri Ranjan Y, Fernandez-Alacid L, Millar NS, Dickenson AH, Lujan R, Dolphin AC (2009) The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:4076-4088.
- Baumgarten LB, Toscas K, Villereal ML (1992) Dihydropyridine-sensitive L-type Ca²⁺ channels in human foreskin fibroblast cells. Characterization of activation with the growth factor Lys-bradykinin. *The Journal of biological chemistry* 267:10524-10530.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso M (2015) *Neuroscience: Exploring the Brain*. 4th Edition. Wolters Kluwer Health.

-
- Belardetti F, Zamponi GW (2008) Linking calcium-channel isoforms to potential therapies. *Curr Opin Investig Drugs* 9:707-715.
- Benhar M, Engelberg D, Levitzki A (2002) Cisplatin-induced activation of the EGF receptor. *Oncogene* 21:8723-8731.
- Bertolesi GE, Shi C, Elbaum L, Jollimore C, Rozenberg G, Barnes S, Kelly ME (2002) The Ca(2+) channel antagonists mibefradil and pimozide inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Molecular pharmacology* 62:210-219.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-9.
- Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH (2003) Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5:1051-1061.
- Boehmerle W, Huehnchen P, Endres M (2015) Chemotherapie-induzierte Neuropathien. *Nervenarzt* 2015. 86:156-160.
- Boland LM, Dingledine R (1990) Expression of sensory neuron antigens by a dorsal root ganglion cell line, F-11. *Brain Res Dev Brain Res* 51:259-266.
- Boland LM, Allen AC, Dingledine R (1991) Inhibition by bradykinin of voltage-activated barium current in a rat dorsal root ganglion cell line: role of protein kinase C. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:1140-1149.
- Bouhassira D (2008) [Definition and classification of neuropathic pain]. *Presse Med* 37:311-314.
- Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J (2005) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *The EMBO journal* 24:315-324.
- Bowersox SS, Luther R (1998) Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 36:1651-1658.
- Busselberg D (1995) Calcium channels as target sites of heavy metals. *Toxicology letters* 82-83:255-261.
- Busselberg D, Platt B, Michael D, Carpenter DO, Haas HL (1994) Mammalian voltage-activated calcium channel currents are blocked by Pb²⁺, Zn²⁺, and Al³⁺. *Journal of neurophysiology* 71:1491-1497.

-
- Cain SM, Snutch TP (2010) Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. *Channels* 4:475-482.
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3:a003947.
- Catterall WA, Scheuer T, Thomsen W, Rossie S (1991) Structure and modulation of voltage-gated ion channels. *Ann N Y Acad Sci* 625:174-180.
- Cavaletti G (2008) Peripheral neurotoxicity of platinum-based chemotherapy. *Nature reviews Cancer* 8:1p following 71; author reply 71p following 71.
- Cavaletti G, Marmiroli P (2010) Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. *Nat Rev Neurol* 6:657-666.
- Cersosimo RJ (1989) Cisplatin neurotoxicity. *Cancer Treat Rev* 16:195-211.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994 Jul;53(1):55-63.
- Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* 302:1416-1418.
- Cho YW, Han SH, Min BI, Rhee JS, Akaike N (2001) Antagonizing effect of protein kinase C activation on the mu-opioid agonist-induced inhibition of high voltage-activated calcium current in rat periaqueductal gray neuron. *Brain research* 916:61-69.
- Choi S, Na HS, Kim J, Lee J, Lee S, Kim D, Park J, Chen CC, Campbell KP, Shin HS (2007) Attenuated pain responses in mice lacking Ca_v3.2 T-type channels. *Genes Brain Behav* 6:425-431.
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047-1058.
- Cribbs L (2010) T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. *Channels* 4:447-452.
- Curtis BM, Catterall WA (1984) Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23:2113-2118.
- Dehne N, Lautermann J, Petrat F, Rauen U, de Groot H (2001) Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 174:27-34.

-
- Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG (2010) Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci* 33:325-347.
- Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1980;20:441-62.
- Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ (1995) Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18:89-98.
- Dzagnidze A, Katsarava Z, Makhlova J, Liedert B, Yoon MS, Kaube H, Limmroth V, Thomale J (2007) Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:9451-9457.
- Eastman A, Barry MA (1987) Interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry* 26:3303-3307.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Fernyhough P, Calcutt NA (2010) Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell calcium* 47:130-139.
- Fischer SJ, McDonald ES, Gross L, Windebank AJ (2001) Alterations in cell cycle regulation underlie cisplatin induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons *in vivo*. *Neurobiol Dis* 8:1027-1035.
- Florea AM, Busselberg D (2006) Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 19:419-427.
- Freyhagen R, Baron R (2006) Kompendium Neuropathischer Schmerz – Ein praxisorientierter Leitfaden. 2. Auflage. Aesopus.
- Fuchs A, Rigaud M, Hogan QH (2007) Painful nerve injury shortens the intracellular Ca²⁺ signal in axotomized sensory neurons of rats. *Anesthesiology* 107:106-116.
- Gelmers HJ (1985) Calcium-channel blockers in the treatment of migraine. *Am J Cardiol* 55:139B-143B.
- Gill JS, Windebank AJ (1998) Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest* 101:2842-2850.

-
- Gohil K, Bell JR, Ramachandran J, Miljanich GP (1994) Neuroanatomical distribution of receptors for a novel voltage-sensitive calcium-channel antagonist, SNX-230 (omega-conopeptide MVIC). *Brain research* 653:258-266.
- Gregg RW, Molepo JM, Monpetit VJ, Mikael NZ, Redmond D, Gadia M, Stewart DJ (1992) Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *J Clin Oncol* 10:795-803.
- Grunberg SM, Sonka S, Stevenson LL, Muggia FM (1989) Progressive paresthesias after cessation of therapy with very high-dose cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 25:62-64.
- Hagenston AM, Simonetti M (2014) Neuronal calcium signaling in chronic pain. *Cell and tissue research* 357:407-426.
- Hall KE, Sima AA, Wiley JW (1995) Voltage-dependent calcium currents are enhanced in dorsal root ganglion neurones from the Bio Bred/Worcester diabetic rat. *J Physiol* 486 (Pt 2):313-322.
- Hamid J, Nelson D, Spaetgens R, Dubel SJ, Snutch TP, Zamponi GW (1999) Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 274:6195-6202.
- Hansson P, Backonja M, Bouhassira D (2007) Usefulness and limitations of quantitative sensory testing: clinical and research application in neuropathic pain states. *Pain* 129:256-259.
- Harder HC, Rosenberg B (1970) Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro. *Int J Cancer* 6:207-216.
- Harder HC, Smith RG, Leroy AF (1976) Template primer inactivation by cis- and trans-dichlorodiammine platinum for human DNA polymerase alpha, beta, and Rauscher murine leukemia virus reverse transcriptase, as a mechanism of cytotoxicity. *Cancer Res* 36:3821-3829.
- Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto N, Takahashi E, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T, Shoji S (2001) Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. *Neuroreport* 12:2423-2427.
- Hell JW, Yokoyama CT, Wong ST, Warner C, Snutch TP, Catterall WA (1993a) Differential phosphorylation of two size forms of the neuronal class C L-type calcium channel alpha 1 subunit. *The Journal of biological chemistry* 268:19451-19457.

-
- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA (1993b) Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *The Journal of cell biology* 123:949-962.
- Helton TD, Xu W, Lipscombe D (2005) Neuronal L-type calcium channels open quickly and are inhibited slowly. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:10247-10251.
- Hermey G, Mahlke C, Schwanke M, Sommer T (2010) *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Heron SE, Khosravani H, Varela D, Bladen C, Williams TC, Newman MR, Scheffer IE, Berkovic SF, Mulley JC, Zamponi GW (2007) Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants. *Ann Neurol* 62:560-568.
- Hogan QH (2007) Role of decreased sensory neuron membrane calcium currents in the genesis of neuropathic pain. *Croat Med J* 48:9-21.
- Hovaguimian A, Gibbons CH (2011) Diagnosis and treatment of pain in small-fiber neuropathy. *Curr Pain Headache Rep* 15:193-200.
- Howle JA, Gale GR (1970) Cis-dichlorodiammineplatinum (II). Persistent and selective inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 19:2757-2762.
- Huang Q, Dunn RT, 2nd, Jayadev S, DiSorbo O, Pack FD, Farr SB, Stoll RE, Blanchard KT (2001) Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci* 63:196-207.
- Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2003) Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* 299:1237-1240.
- Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jager T, Sandkuhler J (2006) Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science* 312:1659-1662.
- Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16:973-982.

- Indriati DW, Kamasawa N, Matsui K, Meredith AL, Watanabe M, Shigemoto R (2013) Quantitative localization of Cav2.1 (P/Q-type) voltage-dependent calcium channels in Purkinje cells: somatodendritic gradient and distinct somatic coclustering with calcium-activated potassium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:3668-3678.
- Jagodic MM, Pathirathna S, Nelson MT, Mancuso S, Joksovic PM, Rosenberg ER, Bayliss DA, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2007) Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:3305-3316.
- Jagodic MM, Pathirathna S, Joksovic PM, Lee W, Nelson MT, Naik AK, Su P, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2008) Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *Journal of neurophysiology* 99:3151-3156.
- Kanaide H (2007) [Regulation of the vascular smooth muscle tone--the Ca²⁺ signaling and the Ca²⁺ sensitivity of the contractile apparatus]. *Fukuoka Igaku Zasshi* 98:1-10.
- Kandel E, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth (2012) *Principles of Neural Science*. 5th Edition. McGraw-Hill Education Ltd.
- Kawashiri T, Egashira N, Kurobe K, Tsutsumi K, Yamashita Y, Ushio S, Yano T, Oishi R (2012) L type Ca(2)+ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol Pain* 8:7.
- Kerr LM, Filloux F, Olivera BM, Jackson H, Wamsley JK (1988) Autoradiographic localization of calcium channels with [¹²⁵I]omega-conotoxin in rat brain. *Eur J Pharmacol* 146:181-183.
- Khasabova IA, Khasabov S, Paz J, Harding-Rose C, Simone DA, Seybold VS (2012) Cannabinoid type-1 receptor reduces pain and neurotoxicity produced by chemotherapy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:7091-7101.
- Kostyuk PG, Shuba Ya M, Savchenko AN (1988) Three types of calcium channels in the membrane of mouse sensory neurons. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 411:661-669.
- Lacinova L (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1:1-78.

-
- Latham JR, Pathirathna S, Jagodic MM, Choe WJ, Levin ME, Nelson MT, Lee WY, Krishnan K, Covey DF, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2009) Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 58:2656-2665.
- Lei S, Pelkey KA, Topolnik L, Congar P, Lacaille JC, McBain CJ (2003) Depolarization-induced long-term depression at hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal neuron synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:9786-9795.
- Leung AT, Imagawa T, Campbell KP (1987) Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca²⁺ channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *The Journal of biological chemistry* 262:7943-7946.
- Liang X, Huang Y (2000) Intracellular free calcium concentration and cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biosci Rep* 20:129-138.
- Lippert B, Beck W (1983) Platin-Komplexe in der Krebstherapie. *Chemie in unserer Zeit*. 17 Jahrg. Nr. 6
- Lipscombe D, Helton TD, Xu W (2004) L-type calcium channels: the low down. *Journal of neurophysiology* 92:2633-2641.
- Litterst CL (1984) Cisplatin: a review, with special reference to cellular and molecular interactions. *Agents Actions* 15:520-524.
- Litterst CL, Gram TE, Dedrick RL, Leroy AF, Guarino AM (1976) Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum(II) (NSC 119875) to dogs. *Cancer Res* 36:2340-2344.
- Luebke JI, Dunlap K (1994) Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 428:499-507.
- Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, Yaksh TL (2001) Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:1868-1875.
- Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209-213.
- Malmberg AB, Yaksh TL (1995) Effect of continuous intrathecal infusion of omega-conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. *Pain* 60:83-90.

-
- Manfredi M, Bini G, Cruccu G, Accornero N, Berardelli A, Medolago L (1981) Congenital absence of pain. *Arch Neurol* 38:507-511.
- Matthews EA, Dickenson AH (2001) Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. *Pain* 92:235-246.
- Mattson MP, Chan SL (2003) Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 5:1041-1043.
- McCallum JB, Kwok WM, Mynlieff M, Bosnjak ZJ, Hogan QH (2003) Loss of T-type calcium current in sensory neurons of rats with neuropathic pain. *Anesthesiology* 98:209-216.
- McCallum JB, Wu HE, Tang Q, Kwok WM, Hogan QH (2011) Subtype-specific reduction of voltage-gated calcium current in medium-sized dorsal root ganglion neurons after painful peripheral nerve injury. *Neuroscience* 179:244-255.
- McDonald ES, Windebank AJ (2002) Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling. *Neurobiol Dis* 9:220-233.
- McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL (2009) Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther* 8:10-16.
- Mendus D (2010) Cisplatin-induced DNA damage in normal and malignant cells: Mechanisms of drug resistance and side effects and strategies for their prevention. Promotionsarbeit
- Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (2000) Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:266-273.
- Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, Nelson MT, Lee WY, Choe WJ, Orestes P, Latham JR, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2009) *In vivo* silencing of the Ca(V)3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain* 145:184-195.
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME (1992) P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* 355:827-829.
- Munchausen LL, Rahn RO (1975) Biologic and chemical effects of cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875) on DNA. *Cancer Chemother Rep* 59:643-646.

- Murakami M, Suzuki T, Nakagawasai O, Murakami H, Murakami S, Esashi A, Taniguchi R, Yanagisawa T, Tan-No K, Miyoshi I, Sasano H, Tadano T (2001) Distribution of various calcium channel alpha(1) subunits in murine DRG neurons and antinociceptive effect of omega-conotoxin SVIB in mice. *Brain research* 903:231-236.
- Murali SS, Napier IA, Mohammadi SA, Alewood PF, Lewis RJ, Christie MJ (2015) High-voltage-activated calcium current subtypes in mouse DRG neurons adapt in a subpopulation-specific manner after nerve injury. *Journal of neurophysiology* 113:1511-1519.
- Murphy TH, Worley PF, Baraban JM (1991) L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7:625-635.
- Narita M, Nakajima M, Miyoshi K, Narita M, Nagumo Y, Miyatake M, Yajima Y, Yanagida K, Yamazaki M, Suzuki T (2007) Role of spinal voltage-dependent calcium channel alpha 2 delta-1 subunit in the expression of a neuropathic pain-like state in mice. *Life Sci* 80:2015-2024.
- Naveh-Many T, Nechama M (2007) Regulation of parathyroid hormone mRNA stability by calcium, phosphate and uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16:305-310.
- Nelson MT, Todorovic SM, Perez-Reyes E (2006) The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Curr Pharm Des* 12:2189-2197.
- Neundörfer B, Heuß D (2009) *Polyneuropathien (Reihe, Neurologie REF.-R.)*. Thieme Verlag.
- Newton AC (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *The Journal of biological chemistry* 270:28495-28498.
- Newton AC (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9:161-167.
- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, Lawson SN (2001) Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 95:1-8.
- Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-8.
- Nickel FT, DeCol R, Jud S, Fasching PA, Seifert F, Maihofner C (2011) Inhibition of hyperalgesia by conditioning electrical stimulation in a human pain model. *Pain* 152:1298-1303.

-
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:552-565.
- Page R, Matus RE, Leifer CE, Loar A (1985) Cisplatin, a new antineoplastic drug in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc* 186:288-290.
- Park J, Luo ZD (2010) Calcium channel functions in pain processing. *Channels* 4:510-517.
- Pexton T, Moeller-Bertram T, Schilling JM, Wallace MS (2011) Targeting voltage-gated calcium channels for the treatment of neuropathic pain: a review of drug development. *Expert Opin Investig Drugs* 20:1277-1284.
- Plooy AC, van Dijk M, Lohman PH (1984) Induction and repair of DNA cross-links in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity. *Cancer Res* 44:2043-2051.
- Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ (2011) Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis* 41:661-668.
- Prommer E (2006) Ziconotide: a new option for refractory pain. *Drugs Today (Barc)* 42:369-378.
- Quasthoff S, Hartung HP (2002) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol* 249:9-17.
- Rane SG, Walsh MP, McDonald JR, Dunlap K (1989) Specific inhibitors of protein kinase C block transmitter-induced modulation of sensory neuron calcium current. *Neuron* 3:239-245.
- Rangel A, Sanchez-Armass S, Meza U (2010) Protein kinase C-mediated inhibition of recombinant T-type Cav3.2 channels by neurokinin 1 receptors. *Molecular pharmacology* 77:202-210.
- Reed E (2006) Cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. In: *Cancer Chemotherapie and Biotherapy Principles and Practice, 4th edn.*, BA Chabner, and DL Longo, eds. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2006:332-343.
- Regan LJ (1991) Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:2259-2269.

-
- Reid CA, Bekkers JM, Clements JD (2003) Presynaptic Ca²⁺ channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci* 26:683-687.
- Rigo FK, Dalmolin GD, Trevisan G, Tonello R, Silva MA, Rossato MF, Klafke JZ, Cordeiro Mdo N, Castro Junior CJ, Montijo D, Gomez MV, Ferreira J (2013) Effect of omega-conotoxin MVIIA and Phalpa1beta on paclitaxel-induced acute and chronic pain. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 114-115:16-22.
- Roelofs RI, Hrushesky W, Rogin J, Rosenberg L (1984) Peripheral sensory neuropathy and cisplatin chemotherapy. *Neurology* 34:934-938.
- Rosenberg B (1979) Anticancer activity of cis-dichlorodiammineplatinum(II) and some relevant chemistry. *Cancer treatment reports* 63:1433-1438.
- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T (1965) Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205:698-699.
- Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245:1115-1118.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *The EMBO journal* 20:2349-2356.
- Schlegel U (2005) Chemotherapie-induzierte Neurotoxizität. *Im Focus Onkologie* 6 2015.
- Schmidtko A, Lotsch J, Freynhagen R, Geisslinger G (2010) Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet* 375:1569-1577.
- Schwartzkroin PA, Wester K (1975) Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the *in vitro* hippocampal slice. *Brain Research* 16;89(1):107-19
- Sheng ZH, Rettig J, Takahashi M, Catterall WA (1994) Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron* 13:1303-1313.
- Sieber FE, Traystman RJ, Brown PR, Martin LJ (1998) Protein kinase C expression and activity after global incomplete cerebral ischemia in dogs. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 29:1445-1452; discussion 1452-1443.
- Simon M, Perrier JF, Hounsgaard J (2003) Subcellular distribution of L-type Ca²⁺ channels responsible for plateau potentials in motoneurons from the lumbar spinal cord of the turtle. *The European journal of neuroscience* 18:258-266.

-
- Smaili SS, Pereira GJ, Costa MM, Rocha KK, Rodrigues L, do Carmo LG, Hirata H, Hsu YT (2013) The role of calcium stores in apoptosis and autophagy. *Current molecular medicine* 13:252-265.
- Snutch TP (2005) Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2:662-670.
- Splettstoesser F, Büsselberg D (2005) Calcium modulation in HeLa-S3 and U-2OS cells by the anticancer agent cisplatin. *Pflügers Arch.* 2005;449:13-8.
- Staats PS, Yearwood T, Charapata SG, Presley RW, Wallace MS, Byas-Smith M, Fisher R, Bryce DA, Mangieri EA, Luther RR, Mayo M, McGuire D, Ellis D (2004) Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *Jama* 291:63-70.
- Stengel R, Binder A, Maag R, Baron R (2007) Neuropathischer Schmerz. In: Baron, R., Strumpf, M. (Hrsg.): *Praktische Schmerztherapie*. S.279-294. Heidelberg: Springer Medizin Verlage.
- Stevens FC (1983) Calmodulin: an introduction. *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire* 61:906-910.
- Stojilkovic SS, Zemkova H, Van Goor F (2005) Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca²⁺ signaling-secretion coupling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16:152-159.
- Strumberg D, Brugge S, Korn MW, Koeppen S, Ranft J, Scheiber G, Reiners C, Mockel C, Seeber S, Scheulen ME (2002) Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 13:229-236.
- Su SC, Seo J, Pan JQ, Samuels BA, Rudenko A, Ericsson M, Neve RL, Yue DT, Tsai LH (2012) Regulation of N-type voltage-gated calcium channels and presynaptic function by cyclin-dependent kinase 5. *Neuron* 75:675-687.
- Taillade L, Soria JC, Andre F, Grunenwald D, Dunant A, Pignon JP, Le Chevalier T (2004) [Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer]. *Bulletin du cancer* 91:63-67.
- Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:5478-5482.

-
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:1895-1911.
- Tank DW, Sugimori M, Connor JA, Llinas RR (1988) Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice. *Science* 242:773-777.
- Tavee J, Zhou L (2009) Small fiber neuropathy: A burning problem. *Cleveland Clinic journal of medicine* 76:297-305.
- Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M, Hilgers RD, Standefer JC (1984) Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer* 54:1269-1275.
- Tomaszewski A, Busselberg D (2007) Cisplatin modulates voltage gated channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. *Neurotoxicology* 28:49-58.
- van der Hoop RG, Vecht CJ, van der Burg ME, Elderson A, Boogerd W, Heimans JJ, Vries EP, van Houwelingen JC, Jennekens FG, Gispen WH, et al. (1990) Prevention of cisplatin neurotoxicity with an ACTH(4-9) analogue in patients with ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 322:89-94.
- Vanegas H, Schaible H (2000) Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain* 85:9-18.
- Vassort G, Talavera K, Alvarez JL (2006) Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell calcium* 40:205-220.
- Vink S, Alewood PF (2012) Targeting voltage-gated calcium channels: developments in peptide and small-molecule inhibitors for the treatment of neuropathic pain. *British journal of pharmacology* 167:970-989.
- Wagener C, Müller O (2009) *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3. Auflage. Thieme Verlag.
- Wallace MS (2006) Ziconotide: a new nonopioid intrathecal analgesic for the treatment of chronic pain. *Expert review of neurotherapeutics* 6:1423-1428.
- Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA (1998) Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:6319-6330.

-
- Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9:1099-1115.
- Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA (1995) Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:6403-6418.
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264:107-111.
- Wheeler DG, Barrett CF, Groth RD, Safa P, Tsien RW (2008) CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling. *The Journal of cell biology* 183:849-863.
- Wheeler DG, Groth RD, Ma H, Barrett CF, Owen SF, Safa P, Tsien RW (2012) Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell* 149:1112-1124.
- Windebank AJ, McDonald E (2002) Cell death in the peripheral nervous system: potential rescue strategies. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 8:62-72.
- Windebank AJ, Grisold W (2008) Chemotherapy-induced neuropathy. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 13:27-46.
- Wojnarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P (1998) Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Molecular pharmacology* 54:770-777.
- Xing C, Chen J, Xu H (1999) [Changes in [Ca²⁺]_i and IP₃ levels in the process of cisplatin-induced apoptosis of gastric carcinoma]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* 21:256-258.
- Yang L, Doshi D, Morrow J, Katchman A, Chen X, Marx SO (2009) Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate Ca(v)1.2 alpha(1c). *Biochemistry* 48:6674-6683.
- Yang SN, Berggren PO (2006) The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocrine reviews* 27:621-676.
- Yoon MS, Katsarava Z, Obermann M, Schafers M, Liedert B, Dzagnidze A, Kribben A, Egensperger R, Limmroth V, Diener HC, Thomale J (2009) Erythropoietin overrides the triggering effect of DNA platination products in a mouse model of cisplatin-induced neuropathy. *BMC neuroscience* 10:77.

Yue J, Liu L, Liu Z, Shu B, Zhang Y (2013) Upregulation of T-type Ca²⁺ channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury. *Spine* 38:463-470.

Zamponi GW, Lewis RJ, Todorovic SM, Arneric SP, Snutch TP (2009) Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. *Brain research reviews* 60:84-89.

Zedan AH, Hansen TF, Fex Svenningsen A, Vilholm OJ (2014) Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer: many questions with few answers. *Clinical colorectal cancer* 13:73-80.

7. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Tim Hagenacker dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab in seinem Labor diese Promotionsarbeit anzufertigen. Ich bedanke mich für die zahlreichen Unterstützungen und konstruktiven Diskussionen, sowie dafür, dass er mir während dieser Zeit meinen „wissenschaftlichen Freiraum“ gelassen hat.

Bei Herrn PD. Dr. Jürgen Thomale bedanke ich mich für Übernahme des Zweitgutachtens, sowie für jegliche Unterstützung die er mir während dieser Zeit hat zukommen lassen.

Für die Übernahme des Drittgutachtens gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot.

Ganz besonders möchte ich mich bei Linda-Isabell Schmitt bedanken, die im Rahmen ihres Praktikums und ihrer Stelle als studentische Hilfskraft, neben ihrem Studium, ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat. Insbesondere möchte ich mich für die Unterstützung an den Wochenenden und Feiertagen bedanken. Sowie für die unzähligen Diskussionen zum Thema. Vielen lieben Dank.

Bei Martin Erkel, Magarita Melnikova und Maria Eynck bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung der Kryostatschnitte, sowie für die vielen äußerst lustigen Stunden am Mikroskop.

Des Weiteren danke ich allen, die mich während dieser Zeit in jeglicher Art und Weise unterstützt haben. Vielen lieben Dank.

8. Publikationen, Poster und Vorträge

Publikationen:

M. Leo, LI. Schmitt, M. Erkel, M. Melnikova, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). *Cisplatin-induced neuropathic pain is mediated by N-type voltage-gated calcium channels*. Submitted.

Abstracts:

M. Leo, T. Hagenacker (2014). Cisplatin reduces voltage-gated calcium channel currents in small dorsal root ganglion neurons. *Acta Physiologica*. March 2014.

M. Leo, L.-I. Schmitt, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). Subtype-dependent modulation of voltage-gated calcium channels in small dorsal root ganglion neurons by cisplatin. *Acta Physiologica*. March 2015. Volume 213. Supplement 699.

Poster:

M. Leo, P. Wittig, J. Thomale, T. Hagenacker (2013). *Neuroprotektive Mechanismen bei Platin-induzierter Chemotherapie*. Forschungstag des Universitätsklinikums Essen.

M. Leo, T. Hagenacker (2014). Cisplatin reduces voltage-gated calcium channel currents in small dorsal root ganglion neurons. 93. annual meeting of the German Physiological Society.

M. Leo, J. Thomale, T. Hagenacker (2014). *Mechanismen und Präventionsstrategien platin-induzierter Neuropathien*. 87. Kongress der deutschen Gesellschaft für Neurologie.

M. Leo, S. Argalski, P. Vandenabeele, M. Schäfers, T. Hagenacker (2015). *Modulation of voltage-activated sodium channels by activation of tumor-necrosis factor receptor 1 and 2*. 94. annual meeting of the german physiological society.

L.-I. Schmitt, **M. Leo**, J. Thomale, T. Hagenacker (2015): *Oxaliplatin modulates voltage-gated calcium channel currents in small DRG neurons*. 94. annual meeting of the german physiological society.

M. Leo, L.-I. Schmitt, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). *Subtype-dependent modulation of voltage-gated calcium channels in small dorsal root ganglion neurons by cisplatin*. 94. annual meeting of the german physiological society.

M. Leo, L.-I. Schmitt, M. Erkel, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). *Neurotoxic and neuroprotective mechanisms of cisplatin-induced polyneuropathy*. Neurovisionen 11.

M. Leo, L.-I. Schmitt, M. Erkel, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). *Neurotoxic and neuroprotective mechanisms of cisplatin-induced polyneuropathy*. Forschungstag des Universitätsklinikums Essen. **Posterpreis-Gewinner**

L.-I. Schmitt, **M. Leo**, J. Thomale, T. Hagenacker (2015): *Oxaliplatin modulates subtypes of voltage-gated calcium channel currents in nociceptive neurons*. Neurovisionen 11.

L.-I. Schmitt, **M. Leo**, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). *Oxaliplatin modulates subtypes of voltage-gated calcium channel currents in nociceptive neurons*. Forschungstag des Universitätsklinikum Essen.

E. Mombeck, **M. Leo**, L.-I. Schmitt, T. Hagenacker (2015). *TRPA1-agonist cinnamaldehyde reduces voltage-gated calcium channel currents in dorsal root ganglion neurons of rats*. Neurovisionen 11.

E. Mombeck, **M. Leo**, L-I. Schmitt, T. Hagenacker (2015). *TRPA1-agonist cinnamaldehyde reduces voltage-gated calcium channel currents in dorsal root ganglion neurons of rats*. Forschungstag des Universitätsklinikums Essen

Vorträge

M. Leo, L-I-Schmitt, J. Thomale, T. Hagenacker (2014). *Neurotoxische und neuroprotektive Mechanismen bei Platin-induzierter Polyneuropathie*. Haussymposium der Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Essen.

M. Leo, L-I-Schmitt, M. Erkel, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). *Einfluss von Cisplatin auf spannungsabhängige Calciumkanäle in Spinalganglionneuronen - Neurotoxische und neuroprotektive Mechanismen bei Platin-induzierten Polyneuropathien*. Seminar des Medizinischen Forschungszentrum (MFZ), Universitätsklinikum Essen.

M. Leo, L-I. Schmitt, M. Erkel, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). *Neuroprotektion bei Cisplatin-induzierten PNP – Die Rolle von spannungsabhängigen Calciumkanälen*. Haussymposium der Klinik für Neurologie. Universitätsklinikum Essen.

M. Leo, L-I. Schmitt, M. Erkel, J. Thomale, T. Hagenacker (2015). *Neurotoxic and neuroprotective mechanisms of cisplatin-induced polyneuropathy*. Neurovisionen 11.

9. Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

10. Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Neurotoxische und neuroprotektive Mechanismen Cisplatin-induzierter Polyneuropathien“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Markus Leo befürworte.

Essen, den _____

Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen	Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/ Mitglieds der Universität Duisburg-Essen
--	---

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in