

**Molekulare Analyse und pharmakologische
Modulation von Platin-induzierter
Neurotoxizität unter Verwendung
des Modellorganismus
*C. elegans***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Wellenberg
aus Düsseldorf

Düsseldorf, August 2021

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Gerhard Fritz
2. Prof. Dr. Christine Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2021

It always seems impossible until it's done

- *Nelson Mandela*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Einsatz von Platinanaloga in der Krebstherapie.....	1
1.1.1 Wirkmechanismus der Platinderivate.....	2
1.1.2 Nebenwirkungen der platinbasierten Chemotherapie	4
1.1.3 Neuropathie als dosislimitierende Nebenwirkung	5
1.1.4 Molekulare Mechanismen der CIPN	7
1.2 <i>C. elegans</i> als <i>in vivo</i> Modellsystem zur Untersuchung platinierender Chemotherapeutika	8
1.2.1 Der Modellorganismus <i>C. elegans</i>	8
1.2.2 Das Nervensystem von <i>C. elegans</i>	11
1.2.3 Die Funktionsweise des Pharynx.....	13
1.2.4 <i>C. elegans</i> in der Neurotoxikologie	15
1.2.5 Elektrophysiologische Untersuchung der Neurotoxizität	16
1.3 Ziel der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Stämme.....	20
2.1.2 Laborgeräte.....	20
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.4 Kultivierungsmedien	22
2.1.5 Chemikalien	23
2.1.6 Verwendete Software	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Bakterienkultivierung	26
2.2.2 Stammerhaltung und Inkubationen mit Substanzen.....	26
2.2.3 Kryokonservierung	26
2.2.4 Synchronisierung.....	27
2.2.5 Elektrophysiologische Messung des Pharyngealen Pumpens	27

2.2.6	Chemotaxis Assay	28
2.2.7	<i>Food Attraction Assay</i>	29
2.2.8	<i>Mechanosensory Assay</i>	30
2.2.9	<i>Learning Assay</i>	30
2.2.10	mRNA Isolierung	31
2.2.11	cDNA-Synthese.....	31
2.2.12	Real-Time-RT-PCR	31
2.2.13	Bestimmung von Serotonin und Dopamin mittels HPLC-MS/MS	34
2.2.14	Eiablage	34
2.2.15	Apoptose	34
2.2.16	Mikroskopie	35
2.2.17	Färbungen.....	35
2.2.17.1	FITC.....	35
2.2.17.2	DiO.....	36
2.2.18	Analyse der Reporterstämme	36
3.	Ergebnisse.....	37
3.1	Cisplatin reduziert die Pumpfrequenz von <i>C. elegans</i>	37
3.2	Platinderivate verursachen keine Störung der sensorischen Wahrnehmung in <i>C. elegans</i>	39
3.3	Exogenes Serotonin führt zu hyperaktiviertem Pumpverhalten in Platin-behandelten <i>C. elegans</i>	44
3.4	Serotonin mindert die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in <i>C. elegans</i>	49
3.5	Neurprotektive Wirkung des SSNRI Duloxetine® in <i>C. elegans</i>	52
3.6	Serotonerge Mechanismen (SER-7) sind in der Cisplatin-induzierten Schädigung des Pumpverhaltens involviert	54
3.7	Cisplatin führt zu einer erhöhten mRNA Expression von <i>cat-4</i>	59
3.8	Cisplatin hat keine unspezifische Wirkung auf die dopaminerge Neurotransmission	62
3.9	Cisplatin reduziert die Eiablage von <i>C. elegans</i>	64
3.10	Cisplatin führt zu kognitiven Schäden in <i>C. elegans</i>	67
4.	Diskussion	70
4.1	Die Einschränkung des pharyngealen Pumpens durch Cisplatin beruht auf einer neurotoxischen Wirkung	70
4.2	Die Inhibition der serotonergen Neurotransmission ist verantwortlich für die Neurotoxizität von Cisplatin	73
4.3	Einfluss von Cisplatin auf verschiedene Mechanismen der serotonergen Neurotransmission	76
4.4	Der Einfluss von CisPt auf SER-7 Rezeptoren kann ebenfalls ein Auslöser für die Lerndefizite sein	83
4.5	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus für die CIPN.....	86

4.6	Modell für die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in <i>C. elegans</i>	87
5.	Ausblick	89
6.	Literaturverzeichnis	91
7.	Anhang	102
7.1	Zusätzliche Abbildungen	102
7.2	Publikationen.....	118
7.3	Danksagung	119
7.4	Eidesstattliche Erklärung	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformeln der Platinanaloga und Übersicht der durch Cisplatin gebildeten DNA-Addukte.....	2
Abb. 2: Anatomie eines Hermaphroditen mit Querschnittsansicht.	10
Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	11
Abb. 4: Schematische Darstellung des Nervensystems von <i>C. elegans</i>	12
Abb. 5: Schematische Darstellung der Pharynx Anatomie.....	14
Abb. 6: Elektrophysiologische Messung mit dem ScreenChip™ System.	17
Abb. 7: Vorbereitung der Chemotaxis Platten und Berechnung des CI.....	29
Abb. 8: Eine Behandlung mit Cisplatin wirkt hemmend auf die Pumpfrequenz in <i>C. elegans</i>	38
Abb. 9: Morphologische Unauffälligkeit der Amphid- und Phasmidneurone nach 96-stündiger Platinbehandlung.....	40
Abb. 10: Platinierende Agenzien haben keinen Einfluss auf die Sensorik.....	42
Abb. 11: Gesättigtes Pumpverhalten in Gegenwart von 10 mM Serotonin.....	45
Abb. 12: Dosisabhängiger Einfluss von Serotonin auf das Pumpverhalten.....	46
Abb. 13: Hyperaktives Pumpverhalten Platin-behandelter <i>C. elegans</i> bei Stimulation mit 5 mM Serotonin.	47
Abb. 14: Der Cisplatin-induzierten Reduzierung der Pumpfrequenz kann durch 2 mM Serotonin entgegengewirkt werden.	49
Abb. 15: Co-Inkubation mit 0,4 mM Serotonin verhindert die Cisplatin-induzierte Abnahme der Pumpfrequenz.	51
Abb. 16: Co-Inkubation mit Duloxetine® verhindert die Cisplatin-induzierte Abnahme der Pumpfrequenz.	53
Abb. 17: Serotoninsynthese und serotonerge Neurotransmission.	55
Abb. 18: Cisplatin interveniert mit Serotonin-assoziierten Mechanismen der Neurotransmission.	57
Abb. 19: Die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors <i>cat-4</i> ist nach Cisplatin Behandlung erhöht.....	59
Abb. 20: Unveränderte Serotonin und Dopamin Mengen nach Inkubation mit Platinanaloga.	61
Abb. 21: <i>tph-1</i> Expression in NSM und ADF Neuronen.	62
Abb. 22: Dopamin ist nicht am Pumpvorgang beteiligt.....	63
Abb. 23: Duloxetine® hat einen positiven Effekt auf die Eiablage von Cisplatin-behandelten Nematoden.	66
Abb. 24: Behandlung mit Platinderivaten führt zu verminderter Lernleistung.	68
Abb. 25: Möglicher Mechanismus der Cisplatin-ausgelösten Neurotoxizität in <i>C. elegans</i>	88
Abb. 26: Cisplatin Dosisabhängigkeit.	102
Abb. 27: Unveränderte Pharynxmorphologie nach 48 h Inkubation.	103
Abb. 28: Unveränderte Pharynxmorphologie nach 96 h Inkubation.	104

Abb. 29: Morphologische Unauffälligkeit der Amphid- und Phasmidneurone nach 48-stündiger Platinbehandlung.....	106
Abb. 30: Untersuchung des Einflusses von Platinanaloga auf die chemosensorische Wahrnehmung.....	107
Abb. 31: Eine kalorische Restriktion ist nicht ursächlich für das Cisplatin- ausgelöste hyperaktive Pumpverhalten.....	108
Abb. 32: Serotonin hat keinen Einfluss auf die Cisplatin Zytotoxizität.	109
Abb. 33: Futterwahrnehmung der <i>tph-1</i> Mutante.	109
Abb. 34: qPCR Ergebnisse von Acetylcholin, Glutamat und GABA.	112
Abb. 35: <i>tph-1</i> Expression in serotonergen Neuronen.	113
Abb. 36: <i>unc-17</i> Expression in cholinergen Neuronen.	114
Abb. 37: <i>unc-25</i> Expression in GABAergen Neuronen.	115
Abb. 38: Elektrophysiologische Messung mit einer DNA-Reparaturmutante.....	116
Abb. 39: Elektrophysiologische Messung mit Bakterien und Serotonin.....	117
Abb. 40: Lernverhalten nach 48 h Cisplatin Behandlung.	117

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der verwendeten <i>C. elegans</i> Stämme.....	20
Tab. 2: Geräte mit Herstellerangabe.	20
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe.....	21
Tab. 4: Herstellung von NGM-Agar.	22
Tab. 5: Herstellung von Chemotaxis-Agar.....	22
Tab. 6: Herstellung von S-Medium.	23
Tab. 7: Verwendete Chemikalien und Kits mit Herstellerangabe.	23
Tab. 8: Übersicht der verwendeten Software.....	25
Tab. 9: Übersicht der durchgeführten Versuche mit Angabe von Stamm, Inkubationsschemata und eingesetzte Pumpstimuli.....	28
Tab. 10: Primersequenzen.	32
Tab. 11: Verwendetes PCR-Programm.	34
Tab. 12: Übersicht der Amphid- und Phasmidneurone.	105
Tab. 13: Übersicht der Gene für die qPCR.....	110

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar
3R-Prinzip	Vermeiden, Verringern, Verbessern (engl. <i>Replace</i> , „ <i>Reduce</i> , <i>Refine</i>)
5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
A	Adenin
AC	Adenylylcyclase
ace-1/ACE-1	Acetylcholin Esterase 1
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholin Esterase
ADF	Chemosensorische Neurone
AO	Acridine Orange
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ca ²⁺ -Ionen	Calcium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAPS	Calcium-abhängiges Aktivatorprotein für Sekretion
CarboPt	Carboplatin
<i>cat-1</i> /CAT-1	vesikulärer Monoamin-Transporter
<i>cat-2</i> /CAT-2	Tyrosinhydroxylase
<i>cat-4</i> /CAT-4	GTP-Cyclohydrolase 1
<i>cca-1</i> /CCA-1	Homolog von VGCC T-Typ
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
CI	Chemotaxis Index
Cl-Ionen	Chlorid-Ionen
CIPN	Chemotherapie induzierte periphere Neuropathie (engl. <i>chemotherapy-induced peripheral neuropathy</i>)
CisPt	Cisplatin
COMT	Catechol-O-Methyltransferasen
CREB	cAMP-Response-Element-bindendes Protein

<i>crh-1</i> /CRH-1	Homolog von CREB1
CTR1	Kupfer-Transporter
DA	Dopamin
DACH	1,2-diaminocyclohexan
DCV	<i>dense core vesicles</i>
d. h.	Das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DiO	3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanin Perchlorat
DRG	Spinalganglien (engl. <i>dorsal root ganglion</i>)
Dulox	Duloxetin®
E	Kontraktionsphase (engl. <i>excitation phase</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eat-2</i> /EAT-2	nikotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Untereinheit
<i>eat-4</i> /EAT-4	Vesikulärer Glutamat Transporter
EPG	Elektropharyngeogramme
ERK	Extrazelluläre signalbezogene Kinase
FITC	Fluorescein5(6)isothiocyanat
G	Guanin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutamat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HDAC6	Histondeacetylase 6
HPLC-MS/MS	Flüssigchromatographie- Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (engl. <i>High Performance Liquid Chromatographie-mass sepctrometry/mass spectrometry</i>)
HSN	Hermaphrodit spezifische Neuronen
Hz	Hertz
IENF	Intraepidermale Nervenfasern
IP	Isthmus Peristaltik

IPI	Interpump Intervall
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
Kond.	Konditioniert
L	Liter
M3	Glutamaterge Motorneurone
M4	Cholinerge Motorneurone
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MC	Cholinerge Motorneurone
mind.	Mindestens
mM	Millimolar
<i>mod-5</i> /MOD-5	Serotonin Wiederaufnahmetransporter
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
mtDNA	Mitochondriale DNA
N2	<i>C. elegans</i> Wildtyp
Na ⁺ -Ionen	Natrium-Ionen
nDNA	Nukleäre DNA
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur (engl. <i>nucleotide excision repair</i>)
NGM	Nematoden Wachstumsmedium (engl. <i>Nematodes Growth Medium</i>)
NSM	Neurosekretorische Motorneurone
OCT1/OCT2	Organischer Kationentransporter 1/2
OD	Optische Dichte
<i>odr-1</i> /ODR-1	Guanylylcyclase
<i>odr-7</i> /ODR-7	olfaktorischer Rezeptor
OxaliPt	Oxaliplatin
P	Plateauphase/Pumpdauer
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pm	Pharyngeale Muskeln
PNS	Peripheres Nervensystem
PP	Pharyngeales Pumpen
R	Relaxationsphase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

SCV	<i>small clear vesicles</i>
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i>)
<i>ser-1/SER-1</i>	Serotonin-Rezeptor (5-HT _{2B/C})
<i>ser-4/SER-4</i>	Serotonin-Rezeptor (5-HT _{1A})
<i>ser-7/SER-7</i>	Serotonin-Rezeptor (5-HT ₇)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNRI	selektiver Noradrenalin- Wiederaufnahmememmer (engl. <i>selective noradrenaline reuptake inhibitor</i>)
<i>snt-1/SNT-1</i>	Synaptotagmin
SSNRI	Selektiver Serotonin-Noradrenalin- Wiederaufnahmememmer (engl. <i>selective serotonin noradrenaline reuptake inhibitor</i>)
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmememmer (engl. <i>selective serotonin reuptake inhibitor</i>)
<i>tax-4/TAX-4</i>	zyklischer Nukleotid-gesteuerter Kanal
<i>tph-1/TPH-1</i>	Tryptophanhydroxylase
TRP-Kanal	<i>Transient Receptor Potential Channel</i>
u. a.	Unter anderem
<i>unc-2/UNC-2</i>	Homolog von VGCC N-Typ
<i>unc-31/UNC-31</i>	Homolog von CAPS
ÜNK	Übernachtkultur
VGCC	Spannungsgesteuerter Calcium Kanal (engl. <i>Voltage-gated calcium channel</i>)
<i>xpc/XPC</i>	Xeroderma Pigmentosum- Komplementationsgruppe C
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathie (CIPN) ist eine der häufigsten dosislimitierenden Nebenwirkung der Cisplatin (CisPt)-basierten Krebstherapie. Der Mechanismus, welcher der CIPN zugrunde liegt, ist bisher nicht vollständig verstanden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Modellorganismus *C. elegans* als 3R-konformes *in vivo* Modell eingesetzt, um die molekularen Mechanismen aufzuklären, die zur CisPt-induzierten Neurotoxizität führen. Die Auswirkungen von CisPt wurden dabei auf die Sensorik durch die Nutzung verschiedener Assays, wie Chemotaxis, Futterwahrnehmung und Mechanosensorik überprüft. Mit dem *Learning Assay* wurden die Effekte von CisPt auf das assoziative Lernen von *C. elegans* beurteilt. Besonderes Augenmerk lag auf der pharyngealen Neurotransmission von *C. elegans*, welche mittels elektrophysiologischer Methodik untersucht wurde. Für die Beurteilung der Pharynxaktivität wurden mit dem ScreenChip™ System von Nemamatrix (InVivo Biosystems) unter Verwendung unterschiedlicher Pumpstimuli (*E. coli* und Serotonin (5-HT)) Elektropharyngeogramme (EPGs) gemessen und mittels der Nemamatrix Software verschiedene pharyngeale Parameter bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass CisPt weder morphologische oder funktionelle Schäden in chemosensorischen Neuronen verursacht, noch die Nahrungs- und Geruchswahrnehmung oder die Mechanosensorik von *C. elegans* beeinflusst. Ein vermindertes Lernverhalten von CisPt-behandelten *C. elegans* konnte nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eine CisPt-vermittelte Hemmung der 5-HT-regulierten pharyngealen Pumpaktivität unabhängig von morphologischen Veränderungen des Pharynx beobachtet werden. Die Messungen in Gegenwart von 2 mM 5-HT und eine Co-Inkubation mit 0,4 mM 5-HT konnten die CisPt-induzierte Reduzierung der Pumpaktivität aufheben ohne die zytotoxischen Effekte von CisPt zu beeinträchtigen. Darüber hinaus führten Messungen in Gegenwart von 5 mM 5-HT zu einem hyperaktiven Pumpverhalten der CisPt-behandelten Nematoden, was einen Einfluss von CisPt auf den 5-HT Wiederaufnahmetransporter vermuten lässt. Durch Co-Inkubation mit dem klinisch zugelassenen Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) Duloxetine® konnte der CisPt-ausgelösten Verminderung der Pumpaktivität und der Eiablageaktivität, einem weiteren 5-HT-regulierten Prozess, vorgebeugt werden. Durch den Einsatz verschiedener serotonerger *C. elegans*-Mutanten konnte zudem nachgewiesen werden, dass die CisPt-induzierte Neurotoxizität unabhängig von der 5-HT-Biosynthese ist und wahrscheinlich auf einer Beeinträchtigung des 5-HT Rezeptors SER-7 (5-HT₇-Rezeptor) beruht. Die elektrophysiologischen Messungen nach CisPt-Inkubation lassen somit die These zu, dass die durch CisPt ausgelöste

Neurotoxizität auf eine Störung der serotonergen Neurotransmission zurückzuführen ist. Die mittels des *Learning Assays* nachgewiesenen Lerndefizite der CisPt-behandelten Nematoden könnten ebenfalls auf Defekte in SER-7-regulierten Mechanismen zurückzuführen sein.

Die in dieser Arbeit generierten Daten belegen, dass CisPt die neuromuskuläre Pharynxaktivität von *C. elegans* durch Hemmung serotonerger, vermutlich SER-7-Rezeptor-abhängiger, Neurotransmission beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung ist unabhängig von morphologischen Schäden des Pharynx sowie funktionaler Beeinträchtigungen der betrachteten sensorischen Neurone. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde belegen zudem die Eignung von *C. elegans* als 3R-konformes *in vivo* Modell für die Untersuchung von Pathomechanismen der Chemotherapie-induzierten Neurotoxizität. Darüber hinaus verdeutlicht die Beobachtung einer Duloxetine®-vermittelten Neuroprotektion der CisPt-induzierten Neurotoxizität, dass *C. elegans* einen vielversprechenden Modellorganismus für die zukünftige präklinische Identifizierung von neuen potentiell neuroprotektiven Wirkstoffen darstellt.

Summary

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is one of the most common dose-limiting side effects of cisplatin (CisPt)-based cancer therapy. The mechanism underlying CIPN is not fully understood to date. Therefore, in the present work, the model organism *C. elegans* was used as a 3R-compliant *in vivo* model to elucidate the molecular mechanisms leading to CisPt-induced neurotoxicity. The effects of CisPt on the sensory system were tested by using different assays, such as chemotaxis, food attraction, and mechanosensation. The learning assay was used to assess the effects of CisPt on associative learning in *C. elegans*. Special attention was paid to *C. elegans* pharyngeal neurotransmission, which was assessed using electrophysiological methodology. For the assessment of pharyngeal activity, using different pump stimuli (*E. coli* and serotonin (5-HT)), the ScreenChip™ system from Nemamatrix (now InVivo Biosystems) and associated software were used to generate electropharyngeograms (EPGs) and determine various pharyngeal parameters.

CisPt was shown not to cause morphological or functional damage to chemosensory neurons, nor to impair food attraction and odor perception or mechanosensation in *C. elegans*. Decreased learning behavior was demonstrated in CisPt-treated *C. elegans*. In addition, CisPt-mediated inhibition of 5-HT-regulated pharyngeal pump activity was observed independently of morphological changes in the pharynx. Measurements in the presence of 2 mM 5-HT concentrations and co-incubation with 0.4 mM 5-HT were able to abolish the CisPt-induced reduction in pump activity without affecting the cytotoxic effects of CisPt. Moreover, measurements in the presence of 5 mM 5-HT resulted in hyperactive pumping behavior of CisPt-treated nematodes, suggesting an effect of CisPt on the 5-HT reuptake transporter. Co-incubation with the clinically approved serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor (SSNRI) Duloxetine® prevented the CisPt-induced reduction in pump activity and egg-laying activity, another 5-HT-regulated process. The use of different serotonergic *C. elegans* mutants also showed that CisPt-induced neurotoxicity is independent of 5-HT biosynthesis and is likely due to impairment of the 5-HT receptor SER-7 (5-HT₇ receptor). Thus, the electrophysiological measurements after CisPt incubation suggest that the neurotoxicity induced by CisPt is based on an impairment of serotonergic neurotransmission. The cognitive impairments of CisPt-treated nematodes revealed by the learning assay may also be due to defects in SER-7-regulated mechanisms.

The data generated in this doctoral thesis demonstrate that CisPt impairs *C. elegans* neuromuscular pharyngeal activity by inhibiting serotonergic, presumably SER-7 receptor-dependent, neurotransmission. This impairment is independent of

morphological damage to the pharynx as well as functional impairment of the sensory neurons considered. The findings collected in the present work support the suitability of *C. elegans* as a 3R-compliant *in vivo* model for the study of pathomechanisms of chemotherapy-induced neurotoxicity. Furthermore, the observation of neuroprotection from CisPt-induced neurotoxicity achieved by Duloxetine® indicates that *C. elegans* represents a promising model organism for future preclinical identification of novel potentially neuroprotective agents.

1. Einleitung

1.1 Einsatz von Platinanaloga in der Krebstherapie

Krebs ist nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit [1]. Im Jahr 2018 wurden weltweit insgesamt 18,1 Millionen Krebskranke und 9,6 Millionen Krebstote verzeichnet [2]. Es wird angenommen, dass die Zahl der Neuerkrankungen bis 2040 weiter drastisch ansteigen wird (29,4 Millionen) [2]. In Deutschland erkranken jedes Jahr bis zu eine halbe Millionen Menschen an Krebs. Allein in Deutschland kann bis 2030 mit einem Anstieg der neuen Krebsfälle um 23 % gerechnet werden [3]. Zytostatika werden seit mehr als 70 Jahren in der antineoplastischen Chemotherapie eingesetzt [4], um schnellwachsende Tumorzellen an der Proliferation zu hindern und abzutöten. Chemotherapeutika entfalten ihre zytotoxische Wirkung nicht nur in Tumor-, sondern auch Normalgewebszellen, wodurch es während der Chemotherapie zu starken Nebenwirkungen kommen kann [5]. Neben der Krebsprävention und der Entwicklung von neuen Krebsmedikamenten ist daher auch die Minimierung von Nebenwirkungen oder Langzeitschäden etablierter Krebstherapien von großer Bedeutung.

Klinisch werden verschiedene Gruppen von konventionellen Zytostatika für die Krebstherapie eingesetzt, zu denen u. a. Taxane, Alkylantien, Anthrazykline und platinierende Agenzien gehören [5]. Vor mehr als 40 Jahren wurde das platinierende Chemotherapeutikum Cisplatin (*cis*-Diammindichloridoplatin(II), CisPt) (Abb. 1a) durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen [6] und stellt seitdem eines der effektivsten Zytostatika zur Bekämpfung einer Reihe von Karzinomen dar. Aufgrund seines breiten Wirkspektrums wird CisPt seitdem bei der Behandlung von Hoden-, Eierstock-, Blasen-, Lungenkrebs, Sarkomen, soliden Tumoren des Kopfes sowie des Halses eingesetzt [7]. CisPt wird als das „Gerüst der Chemotherapie“ bezeichnet, da es die Basis vieler Kombinationstherapien bildet [8], so wird es z.B. bei Brust- und Eierstockkrebs oft mit Taxanen kombiniert [9]. Die Anwendung von CisPt ist mit der Entwicklung von Resistenzen und dosislimitierenden Nebenwirkungen (Emesis, Nephro-, Oto- und Neurotoxizität) behaftet, welche dessen Einsatz einschränken [10]. In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl neuer platin-basierter Chemotherapeutika synthetisiert, um die Nebenwirkungen von CisPt zu reduzieren [7]. Die neueren Platinderivate wurden in verschiedene Generationen unterteilt, zu denen u. a. die zweite Generation Carboplatin (Diamminplatin(II)-cyclobutan-1,1-dicarboxylat, CarboPt) und die dritte Generation Oxaliplatin (Oxalato[(1R,2R)-cyclohexandiamin]platin(II), OxaliPt) gehört (Abb. 1a) [11]. CarboPt besitzt, im Vergleich zu CisPt, eine geringere Effektivität

gegenüber einigen Tumorarten (u. a. Blasen- sowie Hals- und Nackenkarzinome) [12], wird jedoch aufgrund der vergleichbaren Antitumoreffektivität und der verminderten Ausbildung von Nebenwirkungen in Kombinationstherapien gegen Eierstock-, Lungen- und Brustkrebs eingesetzt [7, 12]. Anders als Cis- und CarboPt kann OxaliPt für die Therapie von kolorektalen Karzinomen eingesetzt werden und wird bevorzugt in Kombination mit dem Zytostatikum 5-Fluoruracil und Folinsäure verabreicht [13].

1.1.1 Wirkmechanismus der Platinderivate

Platin-induzierte zytotoxische Schäden beruhen auf der Bildung von DNA-Addukten und der ausgelösten Apoptose der Zellen [10]. Bei CisPt handelt es sich um einen neutralen, planaren Komplex an dessen zentralem Platin-Atom zwei cis-ständige Chlorid-Ionen (Cl-Ionen) und zwei Aminogruppen gebunden sind (Abb. 1a).

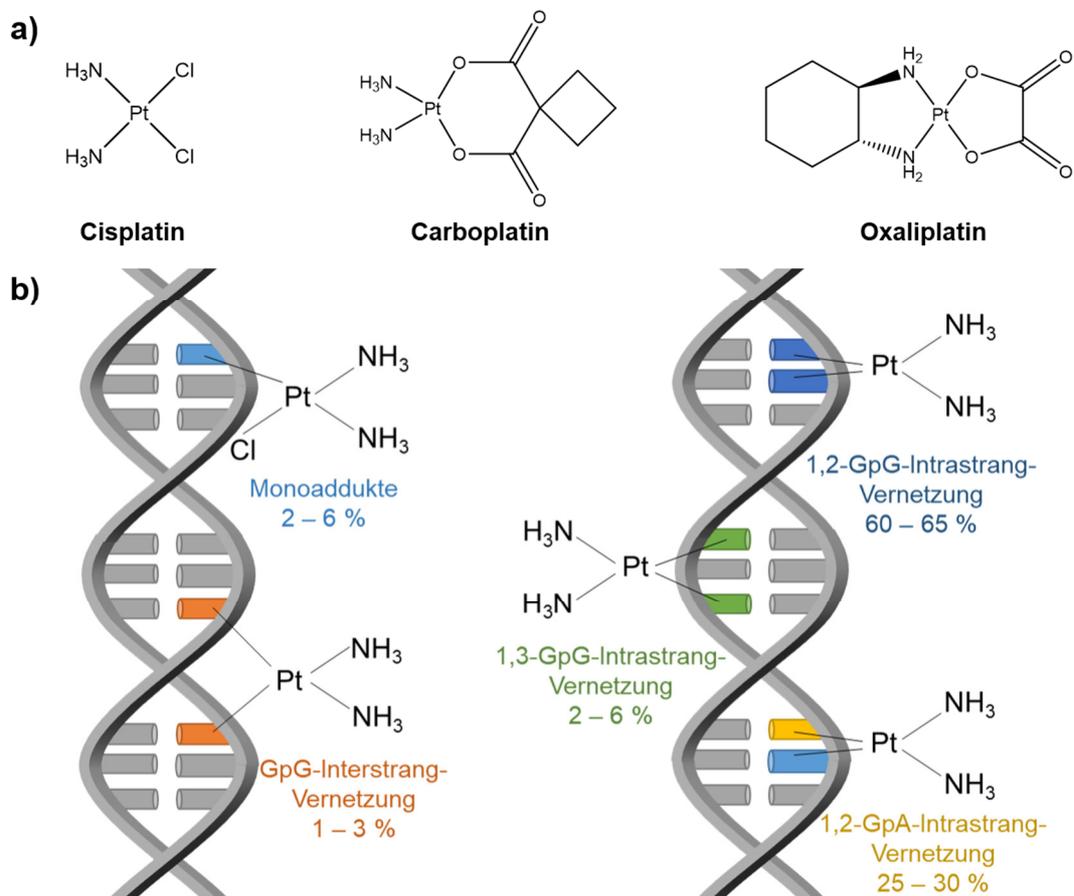


Abb. 1: Strukturformeln der Platinanaloga und Übersicht der durch Cisplatin gebildeten DNA-Addukte.

a) Strukturformeln der eingesetzten Platinderivate Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin. b) Cisplatin wird nach Zelleintritt hydrolysiert und ist so in der Lage u. a. mit der DNA zu interagieren. Infolgedessen werden DNA-Addukte ausgebildet, die in unterschiedlicher Häufigkeit auftreten. Monoaddukte (2-6 %) werden meist zu Beginn ausgebildet und reagieren weiter zu Intra- und Interstrang Quervernetzungen. Die höchste Affinität besitzt Cisplatin zu Adenin (A) und Guanin (G). Präferentiell werden 1,2-GpG-Intrastrang Quervernetzungen (60-65 %) ausgebildet. (Eigene Darstellung angelehnt an [14]).

Die Cl-Ionen wurden bei CarboPt durch die Cyclobutan-1,1-dicarboxylat Abgangsgruppen ersetzt. OxaliPt besteht aus einem 1,2-Diaminocyclohexan Gerüst

mit Oxalatligenanden (Abb. 1a) [15]. Die Verabreichung von Cis-, Oxali- und CarboPt geschieht intravenös [10]. Im Blutplasma ist die Cl-Ionen Konzentration mit ca. 100 mM so hoch, dass der CisPt Komplex in seiner neutralen dichloro-Form bestehen bleibt [16]. Der Transport in die Zelle geschieht sowohl durch passive als auch durch aktive Mechanismen [10], wobei der aktive Transport vornehmlich über organische Kationen- (OCT1, OCT2) und Kupfer-Transporter (CTR1) vollzogen wird [17]. Innerhalb der Zelle ist die Cl-Ionen Konzentration mit 4 mM vergleichsweise gering [16]. Dieser Konzentrationsunterschied führt dazu, dass die Cl-Ionen des CisPt hydrolysiert werden [16]. Die Hydrolyse von CisPt erfolgt schneller als die von OxaliPt [18]. CarboPt wird langsamer hydrolysiert als Cis- und OxaliPt [11, 18], da CarboPt generell stabiler und weniger reaktiv ist [12]. CarboPt besitzt nicht die gleiche Potenz wie CisPt, deshalb muss es während der Behandlung in höheren Dosen eingesetzt werden [19]. Der gebildete Aqua-CisPt-Komplex ist aufgrund seiner Elektrophilie in der Lage Bindungen mit anderen intrazellulären Molekülen wie DNA, RNA und Proteinen, einzugehen. CisPt bildet sowohl mit nukleärer als auch mitochondrialer DNA (nDNA und mtDNA) Addukte aus. Die höchste Affinität besitzt CisPt zum N7-Atom des Imidazolrings der Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) [10], wobei eine Präferenz gegenüber G besteht [20]. Die Bindung mit den Purinbasen hat die Ausbildung von DNA-Addukten zur Folge, welche hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus gebildet werden [7]. Zu Beginn kommt es größtenteils zur Ausbildung von DNA-Monoaddukten, die zu Interstrang- oder Intrastrang-Quervernetzungen weiterreagieren [10]. Die GG- und GA-Intrastrang-Quervernetzungen (Abb. 1b) stellen mit insgesamt 80 – 90 % die am häufigsten gebildeten DNA-Addukte von CisPt dar [7]. Die Zytotoxizität von CisPt beruht vor allem auf der Bildung von 1,2-GpG-Intrastrang-Quervernetzungen [16], die mit 60 – 65 % die Mehrheit der DNA-Addukte ausmachen [21] und zu einer Verformung der DNA-Doppelhelix [22] führen. Infolgedessen kommt es zur Störung der DNA Replikation sowie der Transkription des DNA-Strangs [23] und letztendlich zur Aktivierung apoptotischer Mechanismen [24]. Cis- und CarboPt bilden die gleichen Vernetzungen mit der DNA (Cis-Diamin Pt Addukte) aus, wohingegen OxaliPt andere, sperrigere Addukte (1,2-diamino-cyclohexan(DACH)-Pt-Addukte) ausbildet [21]. Diese DACH-Pt-Addukte sind resistenter gegenüber der DNA-Reparatur und können dadurch die DNA-Replikation der Tumorzellen effektiver verhindern [25]. In äquimolaren Dosen bildet OxaliPt weniger DNA Addukte aus als CisPt [25]. Kreuzresistenzen treten zwischen Cis- und CarboPt auf, jedoch nicht mit OxaliPt [18]. Der apoptotische Zelltod (extrinsisch oder intrinsisch) wird eingeleitet, wenn die DNA-Schäden nicht mehr durch zelleigene Reparaturmechanismen ausgebessert werden können. Der extrinsische Weg ist abhängig von der Ligandenbindung an die

Todesrezeptoren und der Aktivierung von intrazellulären Proteasen, den Caspasen, was zur Proteininaktivierung führt [24]. Der intrinsische Weg wird über die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom-c und der Rekrutierung apoptotischer Proteine reguliert [24]. Bei der CisPt-induzierten Initiation der Apoptose sind ebenfalls mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), extrazelluläre signalbezogene Kinasen (ERKs) und c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs) beteiligt [26].

Generell können DNA-Schäden spontan im Laufe der Replikation auftreten oder durch endogene/exogene Einflüsse induziert werden. Die Zelle verfügt über spezifische Reparaturmechanismen, um die aufgetretenen Schäden zu erkennen und zu beseitigen. Die Schäden, die durch platinierende Substanzen an der DNA entstehen, werden überwiegend von der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) wahrgenommen und repariert [8]. Die Xeroderma Pigmentosum (XP)-Komplementationsgruppen sind an den Reparaturprozessen der NER beteiligt, wie der Schadenserkennung, dem Entwinden, der Exzision und dem Basenaustausch der DNA [27]. Bei der NER gibt es zwei verschiedene Reparaturwege, die globale Genom-NER (GG-NER), bei der die Schäden im gesamten Genom erkannt und entfernt werden und die transkriptionsgekoppelte NER (TC-NER), welche DNA-Läsionen an einem aktiv transkribierten Gen adressiert [28]. Die 1,2-GpG-Intrastrang-Quervernetzungen werden weniger gut repariert, was dafür spricht, dass diese die Hauptursache für die Zytotoxizität darstellen [10].

1.1.2 Nebenwirkungen der platinbasierten Chemotherapie

Eine der wesentlichen und dosislimitierenden Nebenwirkungen von CisPt ist die Nephrotoxizität [29], welche inzwischen durch Hyperhydrierung mit Salzlösung vor und nach der Chemotherapie [10] und durch Diuretika, z.B. mit Mannitol, reduziert werden kann [30]. Störungen des Gastrointestinaltraktes, wie Nausea, Emesis [31] und Diarrhö [29, 32], gehören mit zu den unangenehmsten Nebenwirkungen von CisPt, da sie den Alltag der Patienten sehr stark einschränken und in gravierenden Fällen zu Dehydrierung, Malnutrition und zu Gewichtsverlust führen können, was in einem vorzeitigen Abbruch der Therapie resultieren kann [33]. Die gastrointestinale Toxizität ist jedoch gut behandelbar, indem u. a. 5-HT₃ (Serotonin)-Rezeptorblocker verabreicht werden [34]. Für den Erfolg müssen die Medikamente frühzeitig eingenommen werden, da Nausea und Emesis oft zeitversetzt auftreten [35]. Eine weitere spezifische Nebenwirkung von CisPt ist die Ototoxizität. Das Auftreten dieser schwankt zwischen 4 und 90 %, da es sehr stark von der kumulativen Dosis und dem Alter der Patienten abhängt [36]. Bei Kindern ist die Ototoxizität viel häufiger vertreten als bei Erwachsenen [10, 37]. Bei erwachsenen Patienten, die mit CisPt behandelt werden, ist die Chemotherapie-induzierte Neuropathie (CIPN) die am häufigsten

auftretende Nebenwirkung [10]. Durch die gute Behandelbarkeit der zuvor genannten Nephrotoxizität und gastrointestinalen Toxizität stellt die CIPN, mit einer Häufigkeit von durchschnittlich 62 % [10], heutzutage den hauptsächlichsten dosislimitierenden Faktor während einer CisPt Krebstherapie dar [38].

Neben CisPt weisen auch die neueren platinbasierten Zytostatika-Generationen Nebenwirkungen auf, wobei die Inzidenz von gastrointestinaler Toxizität, Nephro- und Neurotoxizität bei einer Therapie mit CarboPt wesentlich geringer ausfällt [29]. Die Ausbildung einer CIPN bei CarboPt Behandlung liegt bei ca. 6 % [10]. Das Auftreten von Myelosuppression, vornehmlich Thrombozytopenie, ist hingegen charakteristisch für die CarboPt-basierte Chemotherapie [12]. OxaliPt weist andere Nebenwirkungen auf als Cis- und CarboPt. Von den zuvor genannten adversen Effekten zeigen sich nach einer Behandlung mit OxaliPt eine geringere Nephrotoxizität und gastrointestinale Toxizität als bei CisPt [39]. Hervorzuheben ist bei der Verwendung von OxaliPt jedoch die akute und chronische Neurotoxizität. Bei 95 % der Patienten kommt es zu einer akuten und bei 30-50% zu einer chronischen CIPN [10, 40].

1.1.3 Neuropathie als dosislimitierende Nebenwirkung

Bei 30 – 40 % der Patienten, welche eine Chemotherapie erhalten, entwickelt sich eine CIPN [41]. Neben der Dosislimitierung hat die CIPN einen beträchtlichen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten [42]. Bei 20 % der Erkrankten kommt es infolgedessen zu einer Unterbrechung der Therapie [43]. Diese Maßnahme kann die Antitumoreffektivität der eingesetzten Zytostatika und somit den Therapieerfolg negativ beeinflussen [42]. Viele Faktoren, wie Patientenalter, Dosis, Therapiedauer, Kombinationstherapien sowie Vorerkrankungen können das Auftreten einer CIPN begünstigen [44]. Patienten, die vor Therapiebeginn an Diabetes mellitus leiden, sind besonders gefährdet [38]. Bei der sich manifestierenden Neurotoxizität ist primär das periphere Nervensystem (PNS) von der CIPN betroffen und dies äußert sich in erster Linie in den proximalen und distalen Extremitäten [45]. Oftmals treten bei kumulativen Dosen von 300 mg/m² CisPt und 600 mg/m² CarboPt erste Symptome auf [46]. Ein frühes Anzeichen der CIPN sind dabei Parästhesien in Händen oder Füßen [47], die üblicherweise als „*glove and stocking distribution*“, deutsch: Handschuh- und Strumpf-Verteilung, bezeichnet werden [42]. Weitere typische Symptome stellen Dysästhesie, sensorische Ataxie [46], Taubheitsgefühl, Kribbeln und brennende Schmerzen dar [48]. Weiterhin kommt es zur verringerten Sinneswahrnehmung bei Berührungen, Nadelstichen und Vibrationen [46]. Bei der Therapie mit OxaliPt führen kumulative Dosen (800 mg/m²) zu kälte-induzierter Parästhesie und Dysästhesie, die nicht nur in den proximalen und distalen Extremitäten, sondern auch in Rachen, Mund und Gesicht auftreten [46]. Die OxaliPt ausgelöste Neuropathie kann sowohl

reversibel [49] als auch langanhaltend sein [50, 51], wobei die akute Form schneller reversibel ist als die chronische [52].

Die Nebenwirkungen der platin-basierten Krebstherapie können sich bereits während oder kurz nach der Verabreichung ausbilden [53]. Außerdem ist das sogenannte *Coasting*-Phänomen bekannt, welches bei Verabreichung von Cis- und OxaliPt auftritt [46] und sich auf eine Verschlimmerung der Symptome Wochen oder gar Monate nach Beendigung der Therapie bezieht [43]. Ein erstes Auftreten neuropathischer Symptome ist in dieser Zeit ebenfalls möglich [54]. Abhängig von der kumulativen Dosis kann die CIPN nach Abschluss der Behandlung vollständig reversibel sein, dies lässt sich wohl mit der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des PNS vereinbaren [53]. Jedoch zeigt sich oftmals nur eine partielle Remission, vermehrt sind die Symptome sogar persistent [53].

Die CIPN stellt durch den nicht vollständig geklärten Pathomechanismus und das Fehlen von effektiven Behandlungsmöglichkeiten ein großes Problem in der Platin-basierten Krebstherapie dar [46]. Oft wird lediglich auf eine symptomatische Therapie zurückgegriffen [55]. In diesem Zusammenhang wurden bereits eine Reihe von potentiellen neuroprotektiven Substanzen in klinischen Untersuchungen evaluiert, zu denen N-Acetylcystein (NAC), Amifostin, Calcium- und Magnesium Infusionen, Glutathion, Antidepressiva und viele weitere gehören. Diese Substanzen zeigten jedoch nicht den gewünschten neuroprotektiven/therapeutischen Effekt, da die Ausbildung der CIPN nicht unterbunden oder eine manifestierte CIPN nicht erfolgreich behandelt werden konnte [56].

Die Symptome, welche sich bei einer diabetischen peripheren Neuropathie zeigen, wie Taubheitsgefühle und Kälte-Sensibilität, sind der Chemotherapie-induzierten sehr ähnlich [44]. Der selektive Serotonin und Noradrenalin Wiederaufnahme Inhibitor (SSNRI) Duloxetin® (Dulox) wurde ursprünglich u. a. zur Therapie von Depressionen eingesetzt [57] und findet bereits seit 2004 effektive Verwendung gegen die diabetische Neuropathie [58]. Bei 41 % der Patienten, die Dulox zur Behandlung von CIPN erhalten, ist es jedoch wirkungslos [59]. Obwohl nur ein Empfehlungsgrad B besteht [60], ist Dulox bisher das einzige Medikament, welches von der ASCO zur Therapie von CIPN empfohlen wurde [54, 61]. Durch die Verabreichung von Dulox empfanden die CIPN Patienten signifikant weniger Schmerzen, das Taubheitsgefühl sowie das Kribbeln in den Extremitäten nahmen ab [61], wodurch die Lebensqualität der Patienten verbessert werden konnte [59]. Wichtig zu erwähnen ist zudem, dass Dulox in *in vivo* Versuchen mit Ratten keinen Einfluss auf die Antitumoreffizienz hatte [62] und somit die wünschenswerten Kriterien, d. h. die effektive Wirkung gegen

CIPN, ohne die Antitumoraktivität des Chemotherapeutikums zu verringern, eines neuroprotektiven Medikaments gegen CIPN erfüllt.

1.1.4 Molekulare Mechanismen der CIPN

Die CIPN ist eine ernstzunehmende Nebenwirkung, die durch eine Reihe von Chemotherapeutika, wie platinierende Substanzen (Cis, Carbo- und OxaliPt), Taxane (Paclitaxel), Vinka Alkaloide (Vincristin), Proteasom Inhibitoren (Bortezomib) und weitere ausgelöst werden kann [9]. Die Symptomatik der CIPN ist hinreichend bekannt, jedoch ist der pathologische Mechanismus, der zur CIPN führt, noch weitestgehend unbekannt. Daher ist es von außerordentlicher Wichtigkeit die genauen molekularen Mechanismen, welche die Entstehung der CIPN begünstigen, zu untersuchen, um sowohl effektive Therapien als auch prophylaktische Maßnahmen zu entwickeln [63]. Das PNS ist häufiger von toxischen Schäden betroffen als das zentrale Nervensystem (ZNS), da das ZNS durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) geschützt ist [45]. In Autopsien von Patienten konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Akkumulation der Platin-DNA-Addukte in verschiedenen Geweben, einschließlich der peripheren Nerven, kommt [64]. Eine Akkumulation von CisPt findet hauptsächlich in den Spinalganglien (DRG) statt [65] und die DNA dieser Zellen wird vermehrt geschädigt [66]. Die kumulative Dosis korreliert mit der Platin Konzentration in den DRG [65] und die Ausbildung von Platin-Addukten wird mit der Neurotoxizität assoziiert [67]. Cis- und OxaliPt werden schneller hydrolysiert als CarboPt [11], was ein Grund für die geringere Neurotoxizität von CarboPt sein kann. Außerdem bildete CisPt in *in vivo* und *in vitro* Studien signifikant mehr DNA-Addukte aus als OxaliPt, die dann zur Apoptose in den DRG führten [68]. In Nervenbiopsien konnten Veränderungen an Axon und Myelinscheiden bis zum Verlust von myelinisierten Fasern beobachtet werden [47, 69]. Über eine Veränderung der peripheren Vaskularisation wurde nach Behandlung mit CisPt berichtet, was eine verminderte Blutversorgung der Nerven zur Folge hat [70].

Die unzureichend funktionale NER in neuronalen Zellen [71] ist ein weiterer möglicher Grund für die Empfindlichkeit von Neuronen gegenüber platinierenden Substanzen. Dies wird vor allem bei der Betrachtung des Einflusses auf die Mitochondrien deutlich, da neben der nDNA auch die mtDNA von der Adduktbildung durch CisPt betroffen ist [43]. Die dadurch resultierende Blockade der Replikation und Transkription der mtDNA ist gravierender als die der nDNA, da die Mitochondrien keine NER besitzen [43]. Es kommt zur Funktionsstörung der Mitochondrien, welche in einem Energiedefizit resultieren kann [72]. Die daraus hervorgehende energetische Imbalance ist der Grund für spontane Nervenimpulse, die zu einer neuronalen Degeneration der intraepidermalen Nervenfasern (IENF) führen kann [73]. Durch die

gestörte Funktion der Mitochondrien kommt es vermehrt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die in oxidativen Stress mündet [72], welcher eine weitere Ursache für die Schädigung peripherer Neurone darstellt und vermutlich für Schäden an Myelinscheiden, mitochondrialen Proteinen und antioxidativen Enzymen verantwortlich ist [74]. Zudem wird das bereits zuvor erwähnte *Coasting*-Phänomen mit einer mitochondrialen Dysfunktion in Verbindung gebracht [72].

Es ist bekannt, dass Cis- und OxaliPt zu Expressionsänderungen in „*Transient Receptor Potential*“-Kanälen (TRPV und TRPA) führen, denen eine wichtige Rolle bei der Schmerzwahrnehmung zukommen [75]. Eine erhöhte mRNA Expression dieser Kanäle resultiert in einer Hypersensitivität der Nozizeptoren und dies äußert sich als schmerzhafte CIPN [75]. Bei der durch OxaliPt ausgelösten akuten Neuropathie wird vermutet, dass die Abgangsgruppe, das entstehende Oxalat, der Auslöser ist [37]. Für die Weiterleitung eines Aktionspotentials spielen u. a. Ionenkanäle und Calcium (Ca^{2+})-Ionen eine wichtige Rolle. So wurde bereits berichtet, dass das Oxalat spannungsgesteuerte Natrium (Na^+)-Kanäle bindet und freie Ca^{2+} -Ionen chelatiert [76]. Die Reaktivität gegenüber den Kanälen kann in einer Übererregbarkeit resultieren [77]. Auch bei CisPt wird vermutet, dass es die Ca^{2+} -Homöostase stört, indem es Calciumkanäle blockiert und zur Apoptose in den Neuronen führt [52].

1.2 C. elegans als in vivo Modellsystem zur Untersuchung platinierender Chemotherapeutika

1.2.1 Der Modellorganismus *C. elegans*

Caenorhabditis elegans ist ein freilebender Fadenwurm (Nematode), welcher in der Natur in Acker- und Gartenböden sowie Komposthaufen angesiedelt ist [78] und sich von den darin enthaltenden Mikroorganismen ernährt [79]. Unter Laborbedingungen kann *C. elegans* sowohl auf Fest- als auch in Flüssigmedium kultiviert [80] und *Escherichia coli* OP50 (*E. coli*) als Nahrungsquelle eingesetzt werden. Der Modellorganismus *C. elegans* wird in vielen Forschungsbereichen, wie der Alterns- und Krankheits- sowie der genetischen Forschung verwendet [81-84]. Der Molekularbiologe und spätere Nobelpreisträger Sydney Brenner erkannte schon 1974 das Potential von *C. elegans* als Modellorganismus für die Neurobiologie [85]. Insbesondere in der Alzheimer [86] und Parkinson [87] Forschung ist *C. elegans* gut etabliert. Dies verdankt der Nematode der Vielzahl humaner Gen-Homologe (bis zu 80 %) [88], welche die Untersuchungen von Mechanismen erlauben [89]. Ein grundlegender Vorteil des Nervensystems des Nematoden ist, dass das gesamte Konnektom, d. h. die Gesamtheit aller Verbindungen im Nervensystem, bekannt ist [90-92]. *C. elegans* stellt ein einfaches, wie auch vielfältiges Forschungsmodell dar,

da er differenzierte Zelltypen und Organe sowie Lernfähigkeit und Erinnerungsvermögen besitzt [93].

Eine Reihe von positiven Eigenschaften machen *C. elegans* zu einem der am häufigsten eingesetzten Modellorganismen. Dazu gehören u. a. seine geringe Körpergröße von 1 mm, leichte und kostengünstige Kultivierbarkeit, gute Langzeitlagerung durch Einfrieren [85], vollständige Charakterisierung des Genoms [94] sowie eine hohe Anzahl an Nachkommen [95]. Ein weiterer Vorteil ist seine Transparenz, die es erlaubt durch den Einsatz transgener grün fluoreszierender Protein (GFP)-Stämme [96], oder Färbungen [97], die Anatomie zu visualisieren. Außerdem ist *C. elegans* leicht manipulierbar, d. h. durch mutagene Substanzen können verschiedenste Mutationsstämme generiert werden [98]. Mit der CRISPR/Cas Methode besteht zusätzlich die Möglichkeit der gezielten Genmanipulation [99] und ausgewählte Gene lassen sich mit der RNA-Interferenz (RNAi) ausschalten [100, 101].

Die Fortpflanzung geschieht vorwiegend durch Selbstbefruchtung der Hermaphroditen [102]. Die Spermien werden im vierten Larvenstadium in der Gonade produziert und anschließend in der Spermatheka gespeichert. Erst im adulten Stadium kommt es zur Produktion der Oozyten und zur Befruchtung [102]. Die Anzahl der Nachkommen ist aufgrund der begrenzten Spermienanzahl auf ca. 300 limitiert [102]. Männchen kommen zu einer geringeren Prozentzahl (<0,2 %) vor [102] und entstehen durch Fehlsegregation des X-Chromosoms [103]. In der Forschung werden Männchen vorrangig bei Kreuzungsversuchen zur Befruchtung der Hermaphroditen eingesetzt, wodurch sich die Anzahl der Nachkommen auf bis zu 1000 erhöhen kann [102]. Für die generelle Forschung werden jedoch meist Hermaphroditen herangezogen.

Ein adulter Hermaphrodit (Abb. 2a) besitzt immer 959 somatische Zellen aus denen verschiedene Organe und Gewebe (Muskeln, Hypodermis, Darm, Reproduktionssystem, Drüsen und Nervensystem) gebildet wurden [88]. Er besteht aus einem anterior (Pharynxbereich) und posterior (Schwanzbereich) Teil. Anterior befindet sich der Pharynx, eine neuromuskulären Pumpe, welche zur Nahrungsaufnahme eingesetzt wird. An den Pharynx schließt sich der Darm an, der durch den gesamten Nematoden reicht und mit dem Anus endet. Außerdem besitzt ein adulter Hermaphrodit 2 U-förmige Gonaden, die in proximale und distale Gonade unterschieden werden. Jede Gonade enthält ein Ovar und eine Spermatheka, letztere grenzen an den Uterus an. Über die Vulva werden die befruchteten Oozyten abgelegt [95]. Umgeben ist *C. elegans* von einer äußeren Haut, der Kutikula, der Hypodermis und Körpermuskulatur (Abb. 2b). Diese sind durch das Pseudocoelom, welches *C. elegans* in Form hält [104], von Pharynx, Darm und Gonaden

getrennt [105]. *C. elegans* besitzt sowohl gestreifte als auch nicht-gestreifte Muskulatur. Zu der gestreiften gehören 95 Körpermuskelzellen [106] und zur nicht quergestreiften Muskulatur gehören die Muskeln des Pharynx (20), stomatointestinale Muskeln (2), Anus (2) sowie Vulva (8) und Uterus (8) [107].

Ein weiterer Vorteil von *C. elegans* als Modellorganismus ist sein kurzer reproduktiver Lebenszyklus. Bei einer Kultivierung von 20 °C auf *E. coli* dauert die Entwicklung von *C. elegans* bis zum fertilen adulten Hermaphroditen 3,5 Tage [85].

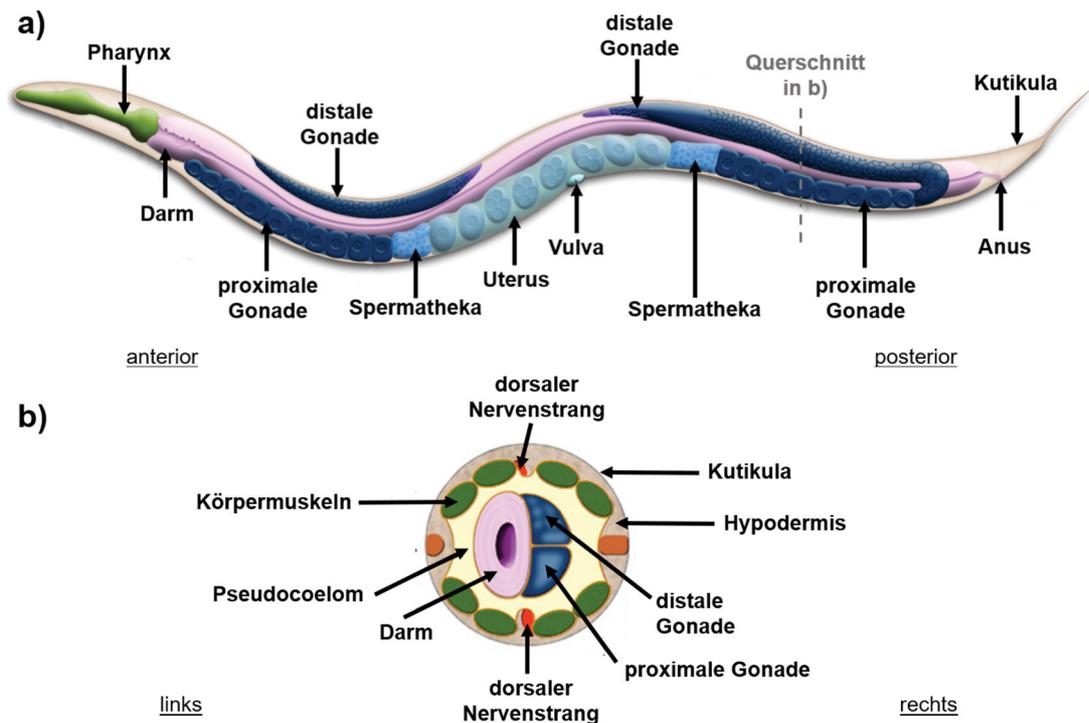


Abb. 2: Anatomie eines Hermaphroditen mit Querschnittsansicht.

a) Der Hermaphrodit besteht aus einem anterior und posterior Bereich. Anterior befindet sich der Pharynx, an den der Darm anschließt, welcher sich bis in den posterior Bereich zieht und dort im Anus mündet. Des Weiteren sind zwei Gonaden (distal und proximal), zwei Spermatheka und ein Uterus vorhanden. Umgeben ist der Hermaphrodit von einer äußeren Haut, der Kutikula. (Abbildung modifiziert nach [108]). b) Posterior Querschnitt zwischen Spermatheka und proximaler Gonade. Umgeben ist *C. elegans* von der Kutikula, der Hypodermis und Körpermuskulatur. Diese sind durch das Pseudocoelom von Pharynx, Darm und Gonaden getrennt. (Abbildung modifiziert nach [108]).

Dieser Lebenszyklus umfasst mehrere Stadien (Abb. 3), zu dem das embryonale Stadium, vier Larvenstadien (L1 - L4), auch juvenile Stadien genannt, und das fertile adulte Stadium gehören. Die Larvenstadien sind durch Häutungen voneinander getrennt, bei denen die alte abgestreift und eine neue Kutikula synthetisiert wird [108]. Unter guten Wachstumsbedingungen entwickelt sich *C. elegans* über das Embryonalstadium über die L1- zur L2-Larve weiter. Die Entwicklung der Embryonen erfolgt nach Ablage der befruchteten Oozyten im Gastrula-Stadium *ex utero* [108].

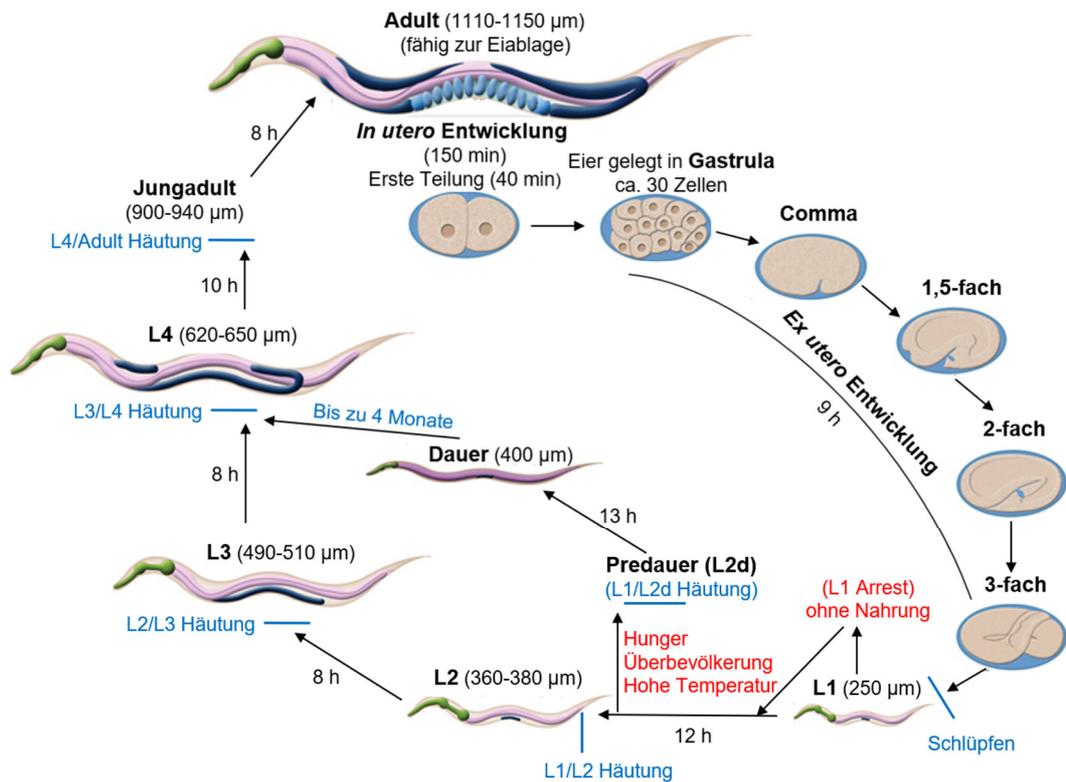


Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *C. elegans*.

Darstellung der Entwicklung eines adulten Hermaphroditen bei 22 °C. Die Entwicklung erfolgt über insgesamt vier Larvenstadien, welche durch Stadien-spezifische Häutungen voneinander getrennt sind. Knapp 2,5 h dauert die Entwicklung der befruchteten Oozyte innerhalb des Muttertieres. Die *ex utero* Entwicklung beträgt insgesamt 9 h und endet im ersten Larvenstadium, der L1 Larve. Die Entwicklung der L1 Larve über das L2-, L3- und L4-Stadium zum adulten Hermaphroditen dauert unter günstigen Umgebungsbedingungen ca. 46 h. Treten während der Entwicklung Hunger, Überbevölkerung oder zu hohe Temperaturen auf, entwickelt sich die L1- zur Dauerlarve. Die Dauerlarve ist gegenüber den suboptimalen Bedingungen resistenter und kann mehrere Monate überleben. Bei Besserung der Umgebungsbedingungen kann sich die Dauer- über die L4-Larve zum Adulten weiterentwickeln. (Abbildung modifiziert nach [108]).

Erfährt die L1-Larve Nahrungsmangel kann es zu einem L1-Arrest (L1-Arrestlarve) kommen. Hunger sowie Überbevölkerung oder hohe Temperaturen führen zur Entwicklung der Dauerlarve [108]. Dauerlarven sind gegenüber den zuvor genannten Stressbedingungen robuster, da sie eine unempfindlichere [95] und dickere [109] Kutikula sowie einen reduzierten Stoffwechsel aufweisen [95, 110], weil die Aktivität des Pharynx unterdrückt ist und eine reduzierte Nahrungsaufnahme stattfindet [109]. In diesem Stadium kann die Dauerlarve mehrere Monate ohne Nahrung auskommen [111] und sich bei verbesserten Wachstumsbedingungen über die L4-Larve weiter bis zum Adulten entwickeln [95]. Bei normaler Entwicklung liegt die Lebensdauer von *C. elegans* zwischen zwei und drei Wochen [94].

1.2.2 Das Nervensystem von *C. elegans*

Das Nervensystem ist das komplexeste Organ in *C. elegans* und besitzt insgesamt 302 Nervenzellen [104] und 56 Gliazellen [112]. *C. elegans* verfügt über einige

human-relevante Neurotransmitter, zu denen Dopamin (DA), Serotonin (5-HT), Glutamat (Glu), Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Acetylcholin (ACh) gehören [89, 113]. Aufgrund der Unterschiede in Morphologie, Konnektivität und verwendeter Neurotransmitter wurden die Neurone in insgesamt 118 Klassen unterteilt [104],[114]. Klassifiziert werden diese u. a. in sensorische, motorische (M) und Interneurone (I) [112]. Sensorische Neurone nehmen Umweltreize wahr und leiten das entstandene Signal z. B. an Motoneuronen weiter, die dieses wiederum an Muskelzellen übermitteln [89]. Interneurone sind zwischen Neuronen positioniert, können die Signale mehrerer Neurone aufnehmen und weiterleiten [89]. Der Nematode verfügt über zwei unabhängige Nervensysteme, die in ein somatisches Nervensystem mit 282 und ein pharyngeales Nervensystem mit 20 Nervenzellen unterteilt werden [115]. Eine Kommunikation beider Nervensysteme ist über Interneurone (RIP) möglich [104]. Bei der Kommunikation sind ~6400 chemische sowie 1500 neuromuskuläre Synapsen und 900 *gap junctions* involviert [115]. Die größte Anzahl der Zellkörper befindet sich als „Kopfganglien“ im anterioren Bereich (Amphidneurone) und die zweitgrößte Anzahl ist in den Schwanzganglien, im posterior Bereich (Phasmidneurone) (Abb. 4) ansässig [115].

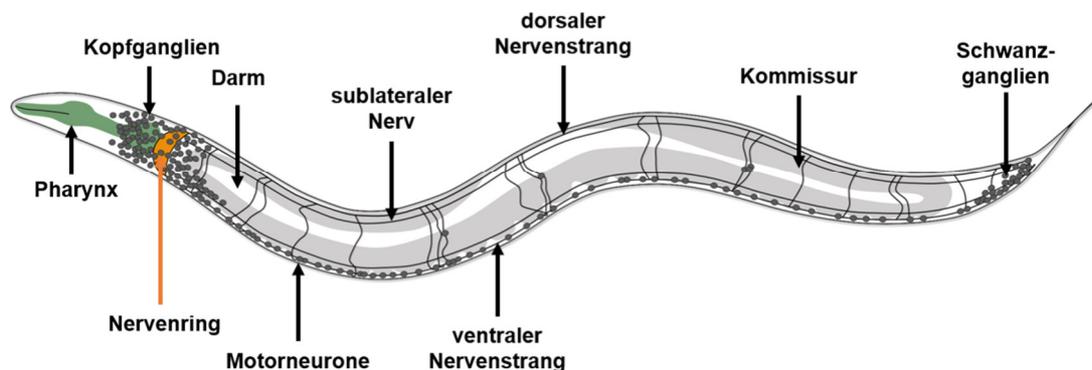


Abb. 4: Schematische Darstellung des Nervensystems von *C. elegans*.

C. elegans besitzt zwei unabhängige Nervensysteme, ein pharyngeales, welches im Pharynx angesiedelt ist, und ein somatisches. Im Pharynx befinden sich die „Kopfganglien“, die für die Wahrnehmung zuständig sind und die Signale an den Nervenring weiterleiten. Weiterhin besitzt der Nematode Schwanzganglien, einen dorsalen und ventralen Nervenstrang sowie Kommissuren, die beide Nervenstränge durch Motoneurone miteinander verbinden. (Eigene Darstellung angelehnt an [116]).

Diese Neurone besitzen freie Enden, die der Umwelt ausgesetzt sind [117], wodurch Berührungen, Temperaturschwankungen, Gerüche und Geschmäcker wahrgenommen werden können [94]. Der Nervenring ist zwischen den Pharynxganglien positioniert [115] und erhält sensorische Signale der Amphidneurone [118]. Der Nematode besitzt einen ventralen Nervenstrang, der von Pharynx- bis Schwanzbereich verläuft, und einen kleineren dorsalen Nervenstrang [94]. Die Nervenstränge sind durch Kommissuren der Motoneurone

miteinander verbunden [119]. Motorneurone unterstützen die Muskulatur bei einer Reihe von Verhaltensweisen des Nematoden, z.B. der Nahrungsaufnahme, Eiablage oder Darmentleerung [105]. Während das somatische Nervensystem u. a. die Fortbewegung steuert [105], ist das pharyngeale Nervensystem in die Nahrungsaufnahme und die Regulierung der Pharynxaktivität und der pharyngealen Muskeln involviert [120].

1.2.3 Die Funktionsweise des Pharynx

Dem Pharynx wird eine elementare Rolle bei der Nahrungsaufnahme von *C. elegans* zugeschrieben. Diese neuromuskuläre Pumpe ist durch eine Basalmembran in sich abgeschlossen und besitzt, neben des zuvor erwähnten pharyngealen Nervensystems, eigene pharyngeale Muskeln (pm) [121]. Im Pharynx befinden sich neun Epithel-, 20 Muskel-, neun marginal und vier Gland Zellen sowie 20 Neuronen [122]. Der Pharynx besteht aus drei verschiedenen Bereichen, dem *Corpus*, welcher *Pro-* und *Metacarpus* umfasst [119, 121], dem *Isthmus* und dem *terminalen Bulbus* [123] (Abb. 5a). Der Pharynx ist insgesamt 100 µm lang und besitzt am breitesten Teil, dem *terminalen Bulbus*, einen Durchmesser von 20 µm [122].

Die Nahrungsaufnahme findet in einer Art Filtersystem statt [124] und resultiert aus zwei verschiedenen Bewegungen, dem pharyngealen Pumpen (PP) und der Isthmus Peristaltik (IP) [120, 124]. Beim PP kommt es zu einer Muskelkontraktion und der darauffolgenden Relaxation des *Corpus*, *anterior Isthmus* und dem *terminalen Bulbus* [125]. Bei der IP handelt es sich um eine peristaltische Bewegung im *posterior Isthmus* [126]. Die Hauptaufgabe des PP ist die Nahrung aufzunehmen und diese im *anterior Isthmus* zu befördern und aufkonzentrieren. Hier verbleiben die Bakterien im Pharynx und die Flüssigkeit wird durch *Corpus* und *anterior Isthmus* wieder ausgeschieden [121]. Die IP transportiert die Bakterien daraufhin in wellenförmigen Kontraktionen vom *anterior Isthmus* zum *terminalen Bulbus* [126], in dem der Grinder (Zermahler) lokalisiert ist [121, 126]. Dieser bricht die Bakterien auf, wodurch diese daraufhin über die Darmklappe in den Darm weitertransportiert werden können [119, 127]. Bei den der Nahrungsaufnahme dienlichen Bewegungen spielen neben dem pharyngealen Nervensystem die pharyngealen Muskeln eine entscheidende Rolle [121]. Die 20 Muskelzellen teilen sich auf acht pharyngeale Muskelkompartimente (pm1 – pm8) innerhalb des Pharynx auf [107]. Pm1 – pm3 befinden sich im *Pro-*, pm4 im *Metacarpus*, pm5 im *Isthmus*, pm6, pm7 sowie pm8 im *terminalen Bulbus* (Abb. 5b) [127]. Die Funktion der pm1 – pm4 Muskeln liegt darin die Flüssigkeit mit den darin befindlichen Bakterien aufzunehmen und zu sammeln [122]. Die Weitergabe der Nahrung an den *Corpus* und zum *terminalen Bulbus* geschieht durch pm5 und die Steuerung des Zermahlers geht auf die pm6 –

pm8 zurück [122]. Dabei spielt pm7 eine besondere Rolle, da durch die Kontraktion des Muskels der Zermahler betätigt wird [122]. Ein Pumpvorgang ist ein Ergebnis einer fast simultanen Kontraktion des *Corpus* und *terminalen Bulbus* [125] der beteiligten pharyngealen Muskeln (pm3, pm4, anterior pm5, pm6 und pm7) [127].

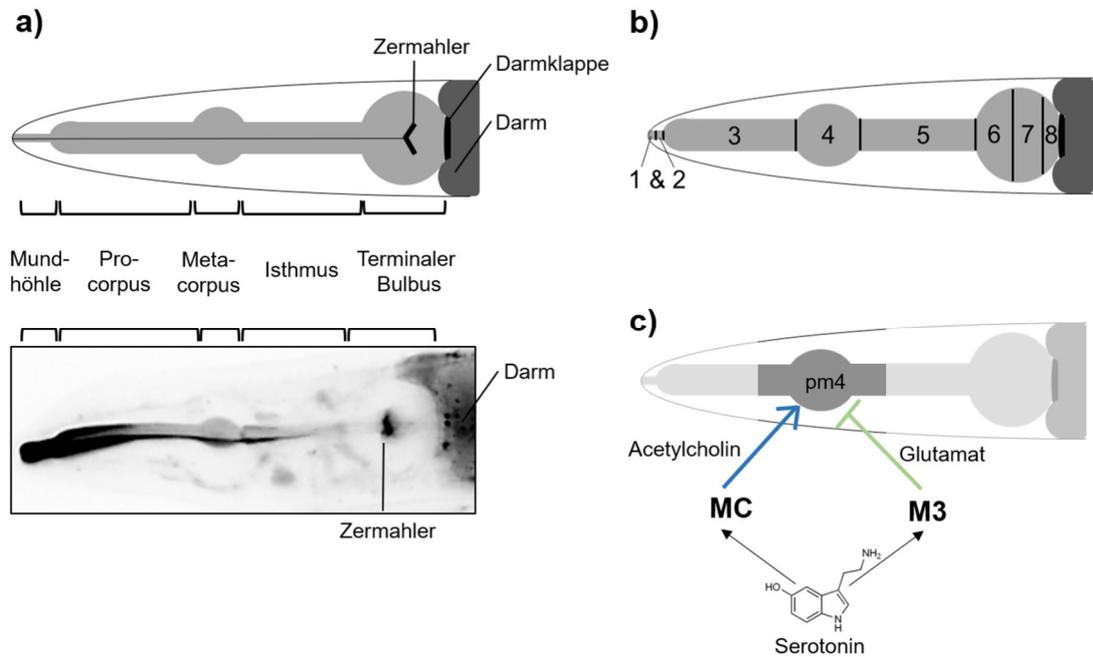


Abb. 5: Schematische Darstellung der Pharynx Anatomie.

a) Zeigt die schematische (oben) und mikroskopische (unten, aufgenommen nach FITC Färbung) Darstellung des Pharynx. Der Pharynx wird in *Corpus* (*Pro-* und *Meta-corpus*), *Isthmus* und *terminaler Bulbus* unterteilt. Die Nahrung wird über einen Kontraktions- und Relaxationszyklus der beteiligten pharyngealen Muskeln zum Zermahler transportiert, dort aufgebrochen und über die Darmklappe in den Darm weitergeleitet. (Eigene Darstellung). b) Die am Pumpmechanismus beteiligten Muskeln teilen sich in acht Kompartimente (pm1 – pm8) auf. (Eigene Darstellung angelehnt an [122]). c) An dem Kontraktions- und Relaxationszyklus sind die Motorneurone MC und M3 beteiligt, welche durch die Freisetzung von 5-HT aktiviert werden. Die Kontraktion (blau) wird durch MC Neurone und die Relaxation (grün) durch M3 Motorneurone kontrolliert. (Eigene Darstellung angelehnt an [128]).

Das PP wird durch das pharyngeale Nervensystem gesteuert. Maßgeblich am Kontraktions- und Relaxationszyklus sind die Motorneurone MC, M3 und M4 beteiligt [129]. Bei den MC Neuronen (besitzen freie Enden zwischen *Pro-* und *Meta-corpus*, zwischen pm3 und pm4) handelt es sich um exzitatorische cholinerge Neurone, welche die Erregung und damit die Kontraktion des pharyngealen Muskels kontrollieren [129]. Die glutamatergen M3 Motorneurone sind inhibitorische Neurone und besitzen freie Enden im *Meta-corpus* [130]. Sie sind für die anschließende Relaxation des pharyngealen Muskels verantwortlich und steuern so das Ende eines Pumpvorgangs [131]. Die IP wird durch die cholinergen M4 Motorneurone gesteuert [123], die essentiell an der Weitergabe der Bakterien zum Zermahler beteiligt sind [132]. Die Initiierung des PP startet bei den sensorischen Amphidneuronen AWA und AWC, welche u. a. die Anwesenheit von Futter

wahrnehmen und über den Glutamat-Rezeptor GLR-7 die serotonergen neurosekretorischen Motorneurone (NSM) aktivieren [133]. Die NSM Neurone sind ebenfalls im Pharynx von *C. elegans* angesiedelt [134] und besitzen Zellkörper im *Metacorpus*, die in Kontakt mit pm5 stehen [135]. Durch die Aktivierung der NSM Neurone wird 5-HT freigesetzt, das infolgedessen an die Rezeptoren der Motorneurone M3 und MC bindet und somit den Kontraktions- und Relaxationszyklus initiiert (Abb. 5c) [136]. Neben den AWA und AWC Neuronen können die serotonergen chemosensorischen Neurone (ADF) ebenfalls Bakterien wahrnehmen und 5-HT daraufhin freisetzen [137]. Den MC Neuronen wird eine gewisse sensorische Funktion zugesprochen, da durch ihre freien Enden im *Corpus* angenommen wird, dass sie Bakterien wahrnehmen können [122]. Auch M3 Motorneurone sollen sensorische Fähigkeiten besitzen und so die Kontraktion der pharyngealen Muskeln wahrnehmen und daraufhin die Relaxation induzieren [126]. Bei den im Pumpverhalten involvierten 5-HT-Rezeptoren handelt es sich um die SER-1 (5-HT₂), SER-4 (5-HT₁) und SER-7 (5-HT₇)-G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) [138, 139]. Die Neurotransmission geschieht durch die Aktivierung der GPCRs, dabei bindet ein Ligand, in diesem Fall 5-HT, an den Rezeptor, wodurch es zu einer Konformationsänderung und dem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) mit Guanosindiphosphat (GTP) kommt [140]. Der Rezeptor SER-1 wird im Nervenring sowie in pm1, pm2, pm3, pm5 und pm7 exprimiert, SER-4 kann nur einem nicht identifiziertem pharyngealen Neuron [135] und SER-7 u. a. den MC, M3 und M4 Neuronen zugeordnet werden [135, 141]. Die Bindung des 5-HT an die Rezeptoren bewirkt die Ausschüttung von ACh aus den MC Motorneuronen [129] und führt zu einer Kontraktion des pm4 Muskels (Abb. 5c) [122]. Die Relaxation wird durch die Ausschüttung von Glu aus den M3 Motorneuronen induziert (Abb. 5c) [130]. In Gegenwart von Futter pumpt ein adulter *C. elegans* zwischen 200 und 300 Mal pro Minute [123]. Die pharyngeale Pumprate kann sich altersbedingt bis auf unter 50 Pumpvorgänge pro Minute reduzieren [142].

1.2.4 *C. elegans* in der Neurotoxikologie

Die Untersuchung von neurotoxischen Substanzen erfordert geeignete experimentelle Modellsysteme. Zu diesem Zweck werden üblicherweise Tierversuche mit Säugetieren durchgeführt, bei denen oftmals nur geringe Tierzahlen für die Beurteilung der Toxizität von Substanzen eingesetzt werden können [143]. In den letzten Jahren ging der Trend vermehrt in die Richtung alternativer Modelle im Rahmen des 3R-Prinzips: „*Replace*“ (Vermeiden), „*Reduce*“ (Verringern) und „*Refine*“ (Verbessern). Das 3R-Prinzip strebt die Reduzierung der genutzten Versuchstiere (*Reduce*), die Anpassung der Versuchsbedingungen, um Schmerzen

der Versuchstiere zu verringern (*Refine*) und das Ersetzen durch tierfreie Versuche (*Replace*) an [144]. Untersuchungen mit wirbellosen Tieren, wie *Drosophila* und *C. elegans* sind von Vorteil, da sie günstige Modellorganismen sind, eine kurze Lebensspanne besitzen, die Möglichkeit zur Testung im kleinen Maßstab besteht und Tierschutzaspekte beachtet werden [143]. *C. elegans* wurde bereits erfolgreich als alternatives 3R-konformes Modell für die Testung neurotoxischer Substanzen etabliert [145-147] und eignet sich für das Highthroughput Screening [113, 148]. Weiterhin wurden eine Reihe von Methoden in der toxikologischen Forschung mit *C. elegans* etabliert, zu denen Lokomotion, Chemotaxis und die Nahrungsaufnahme gehören [145, 148]. Bei Lokomotion und pharyngealem Pumpen handelt es sich um sehr sensitive Endpunkte zur Untersuchung der neuromuskulären Toxizität von Substanzen [149]. Daher wurden diese Endpunkte bereits in verschiedenen Studien zur Untersuchung der Effekte von Metallen [113, 143, 149] sowie Pestiziden herangezogen [146, 150]. Da die Nahrungsaufnahme von *C. elegans* durch das Nervensystem kontrolliert wird [127, 151], eignet sich die Analyse des Pumpverhaltens als neurologischer Endpunkt. Zudem ist das Nervensystem zwischen *C. elegans* und Säugetieren hochkonserviert, da fast alle Signal- und Neurotransmittersysteme identisch sind [143].

1.2.5 Elektrophysiologische Untersuchung der Neurotoxizität

Dadurch, dass die Funktionsweise des Pharynx vollständig aufgeklärt ist, ist die Untersuchung des pharyngealen Pumpverhaltens ein geeigneter Endpunkt für molekulare Studien [126]. Anhand der Bewegungen des Pharynx kann die Neurotransmission auf die entsprechenden Muskeln beobachtet werden. Dem in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Kontraktions- und Relaxationszyklus liegt jeweils ein Muskelaktionspotential zugrunde [123]. Die Vorgänge an Neuronen, Muskeln und Synapsen wurden früher standardmäßig mit der Patchclamp Methode untersucht [152, 153], diese ist jedoch aufwändiger und erfordert einige Vorbereitungsschritte. Raizen & Avery haben eine vereinfachte elektrophysiologische Methode entwickelt, die es ebenfalls erlaubt die pharyngealen Vorgänge genau zu beobachten [126]. Eine weiterentwickelte Form dessen ist das ScreenChip System™ von Nemamatrix (InVivo Biosystems). Dieses System besteht aus einem Chip, in dem die Tiere zwischen zwei Elektroden (Abb. 6a) positioniert werden. Dieser Chip wird über einen Verstärker mit dem Computer verbunden und für die Messung des Pumpverhaltens und die nachfolgende Auswertung wird jeweils eine spezielle Software eingesetzt.

a)



b)

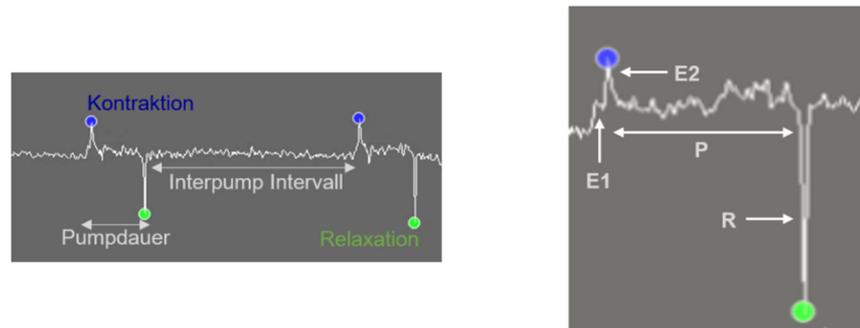


Abb. 6: Elektrophysiologische Messung mit dem ScreenChip™ System.

a) Schritte der Messung im ScreenChip™ System von Nematatrix (InVivo Biosystems). Zu Beginn werden die gewaschenen Nematoden mit dem jeweiligen Pumpstimulus in den SC40 Chip geladen und in die Messposition gebracht. Die Aufnahme des Pumpverhaltens wird mit der NemAcquire und die Analyse der Messungen und Erstellung der EPGs mit der NemAnalysis Software von Nematatrix durchgeführt. (Eigene Darstellung). b) Beschreibung der erhaltenen EPGs. Anhand der EPGs können verschiedene Parameter abgelesen werden. Neben der Pumpfrequenz kann auch die Pumpdauer und das Interpump Intervall angegeben werden. Ein Aktionspotential entspricht einem Spike (rechts), welcher einen positiven (Kontraktion, E) und einen negativen (Relaxation, R) Peak besitzt. Die P-Phase gibt die Pumpdauer an. (Eigene Darstellung angelehnt an [153, 154]).

Die während des pharyngealen Pumpens aufgenommenen elektrischen Signale werden als Elektropharyngeogramme (EPG) bezeichnet (Abb. 6b) [126] und sind mit Elektrokardiogrammen (EKG) vergleichbar [153], mit denen sich die Funktion des Herzens überprüfen lässt. Die EPGs verbildlichen die synaptische Transmission zwischen pharyngealen Neuronen und Muskelzellen [126]. Ein EPG wird in drei- bzw. vier Phasen unterschieden, welche in Abb. 6 b dargestellt sind. Die Kontraktionsphase (E, engl. *excitation phase*) stellt die Depolarisation dar, während der Plateauphase (P) bleibt die Depolarisation und die Kontraktion bestehen und bei der Relaxationsphase (R, Muskelrelaxation) wird die Repolarisation initiiert [153, 154]. Die 4. Phase, das Interpump Intervall (IPI), stellt die Zeit zwischen Ende des einen Pumps (R) und Beginn des neuen Pumps (E) dar [153, 154]. Das Vorhandensein von mehreren *Peaks*, z.B. E1 und E2 (Abb. 6b), lässt sich dadurch erklären, dass es sich beim beobachteten Kontraktions- und Relaxationsvorgang des *Corpus* (E1) und *terminalen Bulbus* (E2) nur um einen fast synchronen Prozess handelt [155]. Die P-Phase ist nur sichtbar, wenn *Corpus* und *terminaler Bulbus* kontrahiert sind und dies ist nur der Fall, wenn die M3-Neuronen funktionsfähig sind [126]. Die elektrophysiologische Untersuchung ermöglicht es mehrere Parameter, die aus

einem EPG abgeleitet werden können, miteinander zu vergleichen. Zu diesen Parametern gehört die Pumpfrequenz, die Pumpdauer, welche im EPG als P-Phase bezeichnet wurde und im Wildtyp bei ungefähr 150 ms liegt [123], und das zuvor erwähnte IPI. Das Verhältnis zwischen R- und E-Phase lässt sich ebenfalls bestimmen, wodurch Rückschlüsse auf die Kontraktion und Relaxation möglich sind [156]. Zudem gibt es mit der Amplitude noch einen weiteren Parameter, welcher jedoch bereits innerhalb einer wildtypischen Gruppe variieren kann. Die Varianz der Amplitude lässt sich auf die Position der Tiere im Chip zurückführen, d. h. die Position des zu messenden Nematoden zwischen den Elektroden, was die korrekte Interpretation des Parameters erschwert [135]. Die Stimulation des Pumpverhaltens in mikrofluidischen Geräten erfordert einen Pumpstimulus, da die Tiere ohne einen solchen Stimulus nicht mit dem Pumpen beginnen [157]. Als solche Stimuli kommen zum einen die Bakterien *E. coli* OP50 und zum anderen 5-HT in Frage [157], welches die Anwesenheit von Futter nachahmt [136, 158]. Bereits Avery *et al.* empfahlen für elektrophysiologische Messungen die Nutzung von 5-HT (10 mM), da es das Pumpen induziert [153], indem es zur erhöhten MC und M3 Aktivität und damit zu einer reduzierten Pumpdauer führt und den Kontraktions- und Relaxationszyklus schneller ablaufen lässt [128]. MC ist für schnelles Pumpen zuständig und fungiert als sogenannter *Pacemaker* [129]. Die Motorneurone MC und M3 können jedoch nur durch exogenes 5-HT aktiviert werden, wenn sie funktional sind [128]. Somit können bereits durch die Anwendung verschiedener Pumpstimuli Unterschiede im Pumpverhalten und der Einfluss dieser Stimuli auf die beteiligten Motorneurone entschlüsselt werden. Die Möglichkeit der einfachen Verfolgbarkeit der Neurotransmission während des pharyngealen Pumpens mittels elektrophysiologischer Messungen macht die Überprüfung des Pumpverhaltens zu einem geeigneten Endpunkt für die neurotoxikologische Forschung [159].

1.3 Ziel der Arbeit

Die Inzidenz von Krebserkrankungen nimmt immer weiter zu, welches der Industrialisierung und der erhöhten Lebenserwartung geschuldet ist. Risikofaktoren für die maligne Entartung der Zellen sind u. a. Übergewicht, Umweltfaktoren, Ernährung und Tabakkonsum. Seit mehr als 40 Jahren wird CisPt als Therapeutikum gegen eine Reihe von Tumorarten eingesetzt. Die Therapie ist jedoch oftmals von einer Vielzahl von Nebenwirkungen begleitet. Insbesondere die CIPN ist hier hervorzuheben, welche zu den dosislimitierenden Begleiterscheinungen gehört und zu einem Abbruch der Therapie führen kann. Der molekulare Mechanismus, der der CIPN zugrunde liegt, ist nicht vollständig geklärt und effektive Therapiemöglichkeiten sind nicht verfügbar. Erst wenn der Mechanismus der CIPN verstanden wurde, können effektiv neuroprotektive Substanzen entwickelt und eingesetzt werden. Diese Substanzen sollen der Prävention dienen oder eine bereits ausgebildete CIPN soweit symptomatisch behandeln, dass kein Abbruch der Tumorthherapie erfolgen muss.

In dieser Arbeit soll mit Hilfe des 3R-konformen Modellorganismus *C. elegans* der molekulare Mechanismus der Platin-induzierten CIPN näher untersucht werden, um so möglicherweise Rückschlüsse auf die humane CIPN schließen zu können. Die zahlreichen Vorteile von *C. elegans* und die bereits in der neurotoxikologischen Forschung etablierten Endpunkte wie pharyngeales Pumpen und Chemotaxis machen *C. elegans* zu einem geeigneten Modellorganismus für die Untersuchung dieser Fragestellung, da das Nervensystem und die involvierten Neurotransmitter auch im Menschen vorkommen.

Der Einfluss der platinierenden Substanzen auf das Nervensystem soll in erster Linie durch Nutzung des Surrogatmarkers pharyngeales Pumpen unter Zuhilfenahme des ScreenChip™ Systems von Nemamatrix (InVivo Biosystems) untersucht werden. Dieser Endpunkt eignet sich besonders, da das Pumpverhalten durch das pharyngeale Nervensystem gesteuert wird und hierbei verschiedene Neurotransmitter bedeutsam sind. Die Arbeitshypothese richtet sich danach, ob CisPt über einen Einfluss auf die Neurotransmitter die Neurotransmission in *C. elegans* beeinträchtigt. Ziel der Arbeit ist es, die Auswirkung einer chronischen CisPt Behandlung auf die Neurotransmission u. a. durch elektrophysiologische Messungen der Pharynxaktivität, den Einsatz von Mutanten und Genexpressionsanalysen zu untersuchen. Der Einfluss von Platinderivaten auf die Sensorik soll ebenfalls in *C. elegans* analysiert werden, da Störungen der Sensorik zu dem klinischen Bild der CisPt-behandelten Patienten gehören.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stämme

Tab. 1: Übersicht der verwendeten *C. elegans* Stämme.

Stamm	Quelle
N2 bristol	CGC (Minneapolis, USA)
CX4 <i>odr-7(ky4)</i>	CGC (Minneapolis, USA)
CX2065 <i>odr-1(n1936)</i>	CGC (Minneapolis, USA)
MT6308 <i>eat-4(ky5)</i>	CGC (Minneapolis, USA)
PR802 <i>osm-3(p802)</i> IV.	AG Ventura (Düsseldorf, Deutschland)
MT15620 <i>cat-2(n4547)</i> II.	CGC (Minneapolis, USA)
MT15434 <i>tph-1(mg280)</i>	CGC (Minneapolis, USA)
DA1814 <i>ser-1 (ok345)</i> X.	AG Nollen (Groningen, Niederlande)
Q866 <i>ser-4 (ok512)</i> III	AG Nollen (Groningen, Niederlande)
DA2100 <i>ser-7(tm1325)</i>	CGC (Minneapolis, USA)
MT9772 <i>mod-5 (n3314)</i> I.	AG Nollen (Groningen, Niederlande)
NBRP <i>xpc-1 (tm3886)</i> IV	AG Schumacher (Köln, Deutschland)
LX929 <i>vsIs48 [unc-17::GFP]</i>	CGC (Minneapolis, USA)
GR1366 <i>mgIs42 [tph-1::GFP + rol-6(su1006)]</i>	GCG (Minneapolis, USA)
CZ1632 <i>juls76 [unc-25p::GFP + lin-15(+)]</i> II	CGC (Minneapolis, USA)

2.1.2 Laborgeräte

Tab. 2: Geräte mit Herstellerangabe.

Gerät	Hersteller
Autoklav VX-95	Systec, Linden, Deutschland
Binokular Stemi 2000	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BFX 43	Olympus, Tokio, Japan
Fluoreszenzmikroskop Kamera XM 10	Olympus, Tokio, Japan
Heizblock PeqLab91-D110	VWR Peqlab, Radnor, USA
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer	Sunlab-Instruments, Mannheim, Deutschland
Mikrowelle	Commercial Microwave oven
Nanodrop	NanoVue plus, GE Healthcare
Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland

Material und Methoden

Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
qPCR	Bio-Rad, Hercules, USA
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Screenchip™ System	NemaMetrix (InVivo Biosystems), Eugene, USA
Stepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler, PCR (TP Thermocycler)	Biometra, Göttingen Deutschland
Thermocycler, RT-PCR (C1000/CFX96)	Bio-Rad, Hercules, USA
Tissue Lyser	Qiagen, Hilden, Deutschland
UV/Vis Spektrometer Lambda 12	Perkin Elmer, Wattham, USA
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage 1219MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 320	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Microfuge 20	Beckman Coulter, Brea, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe.

Material	Hersteller
Abdeckfolie AbsorbMax Film	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deckgläser (21 x 26 mm)	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
DNA-Präparationskit (DNeasy® Blood & Tissue Kit (250))	Qiagen, Hilden, Deutschland
Einmalspritzen (1, 5 und 10 mL)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalpipetten (10 und 25 ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorfgefäße (0,5, 1,5 und 2 mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcons (15 und 50 mL)	Greiner Bio-One, Krebsmünster, Österreich
Filterpapier	Schleicher & Schüll Bioscience, Dassel, Deutschland
Glaspasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Kimtech-Science Tücher	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Kryoröhrchen (2 mL)	Greiner Bio-One, Krebsmünster, Österreich
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatten (6er, 12er, 96er)	Greiner Bio-One, Krebsmünster, Österreich
Mikrozentrifugenröhrchen	VWR, Radnor, USA
Objektträger (76 x 26 mm)	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland

Parafilm M	Parafilm® M
PCR-Röhrchen	VWR, Radnor, USA
Petrischalen (60x15 mm, 94 x 16 mm und 100 x 15 mm)	Greiner Bio-One, Krebsmünster, Österreich
Pipettenspitzen TipOne	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
RNeasy und Schredder Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
ScreenChip Cartridge SC40	NemaMetrix (InVivo Biosystems), Eugene, USA

2.1.4 Kultivierungsmedien

Tab. 4: Herstellung von NGM-Agar.

Lösung	Substanz	Menge
NGM-Agar	BD Bacto Agar	20 g
	NaCl	3 g
	Sojapepton	2,5 g
	mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen und nach Autoklavieren Lösungen D-A zugeben	
Lösung D	KH ₂ PO ₄ (0,8 M)	108,3 g
	K ₂ HPO ₄ (0,16 M)	36 g
Lösung C	MgSO ₄ • 7 H ₂ O (1M)	246,5 g
Lösung B	CaCl ₂ (1 M)	110,8 g
Lösung A	Cholesterol; gelöst in Ethanol (5 mg/mL)	5 g

Tab. 5: Herstellung von Chemotaxis-Agar.

Lösung	Substanz	Menge
NGM-Agar	Bacto Agar	20 g
	mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen und nach Autoklavieren Lösungen D-B zugeben	
Lösung D	KH ₂ PO ₄ (0,8 M)	108,3 g
	K ₂ HPO ₄ (0,16 M)	36 g
Lösung C	MgSO ₄ • 7 H ₂ O (1M)	246,5 g
Lösung B	CaCl ₂ (1 M)	110,8 g

Tab. 6: Herstellung von S-Medium.

Lösung	Substanz	Menge
S-Medium	Kaliumcitrat (1M)	10 mL
	Spurenelemente	10 mL
	CaCl ₂ (1M)	3 mL
	MgSO ₄ (1M)	3 mL
	mit S-Basal auf 1 L auffüllen	
Kaliumcitrat (1M)	Zitronensäure monohydrat	20 g
	tri-Kaliumcitrat monohydrat	293,5 g
	mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen und autoklavieren	
Spurenelemente	Dinatrium EDTA	1,86 g
	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	0,69 g
	MnCl ₂ • 4 H ₂ O	0,2 g
	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0,29 g
	CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0,025 g
	mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen	
CaCl₂ (1M)	CaCl ₂ in 1 L dH ₂ O und autoklavieren	55,5 g
S-Basal	NaCl	5,85 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	KH ₂ PO ₄	6 g
	Cholesterol	1 mL
	mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen und autoklavieren	

2.1.5 Chemikalien

Tab. 7: Verwendete Chemikalien und Kits mit Herstellerangabe.

Chemikalie	Hersteller
Acridine orange	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2,3-Butandion (Diacetyl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bacto Agar	BD, Heidelberg, Deutschland
Benzaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Carboplatin (10 mg/mL)	Accord Healthcare, München, Deutschland
Cholesterol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cisplatin (1 mg/mL)	Accord Healthcare, München, Deutschland

Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatrium EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin Perchlorat (DiO)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Duloxetine®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisensulfat Heptahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	VWR, Radnor, USA
Fluorescein5(6)isothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	BD, Heidelberg, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Levamisol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mangan(II)chlorid Tetrahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhypochlorid	VWR, Radnor, USA
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oxaliplatin (5 mg/mL)	Accord Healthcare, München, Deutschland
Primer (Array)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase freies Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Serotonin Hydrochlorid	NemaMetrix (InVivo Biosystems), Eugene, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sojapepton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SensiMix Sybr Hi Rox	Bioline, London, England
tri-Kaliumcitrat monohydrate	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypton	BD, Heidelberg, Deutschland
Zinksulfat Heptahydrat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure monohydrate	Applichem, Darmstadt, Deutschland

80% Glycerin

80 ml 100% Glycerin
20 ml dH₂O

Einfrierlösung

5,85 g NaCl
 6,8 g KH₂PO₄,
 300 g Glycerol,
 5,6 ml 1 M NaOH,
 mit dH₂O auf 1 L auffüllen und autoklavieren. Danach 3 mL 0,1 M MgSO₄ hinzugeben

LB-Medium

10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 mit dH₂O auf 1 L auffüllen und autoklavieren

M9-Puffer

3 g KH₂PO₄
 6 g Na₂HPO₄
 5 g NaCl
 1 mL MgSO₄
 mit dH₂O auf 1 L auffüllen und autoklavieren

Synchronisationslösung

300 µL NaOCl (13 %)
 200 µL NaOH (4 M)
 für einen Ansatz

10 % BSA (Rinderserumalbumin)/Streptomycin

100 mg Streptomycin gelöst in 10 % BSA in S-Medium

2.1.6 Verwendete Software

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Software.

Software	Einsatz	Hersteller
Bio-Rad CFX Manager	Auswertung PCR Ergebnisse	Bio Rad, Hercules, USA
cellSens Dimension	Aufnahme mikroskopischer Bilder	Olympus, Tokio, Japan
GraphPad Prism 6	Graphen Erstellung und Statistik	GraphPad Software, San Diego, USA
Image J 1.52	Bildbearbeitung	National Institute of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office 2016/2019	Dokumenterstellung Ergebnisauswertung Erstellung von Abbildungen	Microsoft, Redmond, USA
NemAcquire	Aufnahme der EPGs	NemaMetrix, Eugene, USA
NemAnalysis	Analyse der EPGs	NemaMetrix, Eugene, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkultivierung

Als Nahrungsquelle wurden *E. coli* OP50⁻¹ Bakterien eingesetzt, die eine Resistenz gegenüber Streptomycin besitzen. Für die Zucht wurde eine Übernachtskultur (ÜNK) mit 200 mL LB-Medium und 1:2000 Streptomycin in einem Erlenmeyerkolben angesetzt. Mit einer Pipettenspitze wurde eine *E. coli* OP50⁻¹ Kolonie von einer bewachsenen NGM-Platte entnommen und in den Kolben gegeben. Die ÜNK wurde für 18 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Daraufhin wurde die ÜNK für 10 Minuten bei 5000 rpm bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in S-Basal mit 1:2000 Streptomycin gelöst und in Eppendorf Gefäße aufgeteilt. Die Einstellung der Bakterien erfolgte auf eine optische Dichte (OD) von 2,5. Für die Flüssigkultur wurden hitzeinaktivierte Bakterien eingesetzt, um die bakterielle Metabolisierung der verwendeten Substanzen zu verhindern [160]. Dazu wurden die zu inaktivierenden Gefäße in einen auf 65 °C vorgeheizten Heizblock gegeben und dreimal alle 5 Minuten gemischt und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Stammerhaltung und Inkubationen mit Substanzen

Die Kultivierung von *C. elegans* erfolgte bei 20 °C auf NGM-Platten [85]. Der verflüssigte NGM-Agar (Zusammensetzung in Tab. 4) wurde in 100 x 15 mm Petrischalen gegossen und anschließend, nach dem Abkühlen, mit 50 µL *E. coli* OP50⁻¹ Bakterien bestrichen und 24 h bei 37 °C anwachsen lassen. Das Überwachsen der Bakterien auf der Platte wird durch die Nutzung des Uracil auxotrophen *E. coli* OP50 Stamms verhindert und die Kultivierung von *C. elegans* vereinfacht [80, 160]. Für die Stammerhaltung wurden alle drei bis fünf Tage 10 Larven der jeweiligen Stämme auf frische NGM-Platten mit Bakterienrasen überführt.

Die Inkubationen mit Substanzen fanden in Flüssigmedium bei 20 °C statt. Dazu wurde S-Medium (Zusammensetzung Tab. 6) verwendet. Das S-Medium wurde komplettiert, indem am Versuchstag 5 mg/mL Cholesterol, 1 % BSA/Streptomycin und hitzeinaktivierte *E. coli* OP50⁻¹ (OD 2,5) hinzugegeben wurden.

2.2.3 Kryokonservierung

Zur Langzeitstammerhaltung können *C. elegans* Stämme eingefroren werden [85]. Benötigt wird eine NGM-Platte mit L1 Larven, welche mit 2,5 mL M9-Puffer abgespült werden. In Kryoröhrchen wurden 300 µL der Einfrierlösung (Zusammensetzung Kapitel 2.1.5) vorgelegt und 300 µL der in M9-Puffer befindlichen Tiere hinzugegeben.

Die beiden Phasen wurden vorsichtig gemischt und die Gefäße anschließend bei -80 °C gelagert.

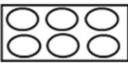
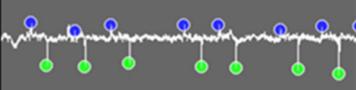
2.2.4 Synchronisierung

Für die jeweiligen Versuche ist eine große Anzahl an Tieren im gleichen Larvenstadium (L4/Jungadulte) erforderlich. Dafür werden gut bewachsene Platten mit adulten, graviden Tieren benötigt. Die Platte wurde mit ca. 2500 µL M9-Puffer abgespült und in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt. Dem folgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 5000 rpm bei RT. Anschließend wurden 80 % des Überstandes verworfen und 500 µL einer frisch angesetzten Synchronisationslösung (Zusammensetzung Kapitel 2.1.5) auf das Pellet gegeben und mit M9-Puffer auf 1500 µL aufgefüllt. Unter gelegentlichem Mischen der Gefäße wurde für zwei Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde für zwei Minuten bei 5000 rpm und RT zentrifugiert und 80 % des Überstandes verworfen. Dem folgten zwei Waschschrte mit jeweils 1 mL M9-Puffer. Zum Schluss wurde das Pellet in 1 mL M9-Puffer gelöst und 50 µL auf eine NGM-Platte gegeben, um die Anzahl der Embryonen zu ermitteln. Die gewünschte Anzahl an Embryonen wurde anschließend entsprechend eingestellt.

2.2.5 Elektrophysiologische Messung des Pharyngealen Pumpens

Das Pumpverhalten von *C. elegans* wurde als neurologischer Endpunkt eingesetzt [147]. Generell wurden L4/Jungadulte Tiere 48 h, 96 h oder 168 h mit Kontrollmedium, 100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt oder 1 mM CarboPt inkubiert. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten mit dem ScreenChip™ System von Nemamatrix (InVivo Biosystems) unter Verwendung eines SC40 Chips. Die Messungen wurden entweder in Gegenwart von LabTie Bakterien (0,038 g in 25 mL S-Basal), OP50⁻¹ Bakterien (OD₆₀₀=0,9 mit M9-Puffer) oder verschiedenen Konzentrationen von 5-HT durchgeführt. In Vorbereitung für die Messungen mit Bakterien wurden die Tiere mind. fünfmal mit S-Basal gewaschen und anschließend für 2 h in S-Basal/M9-Puffer einem Nahrungsentzug unterzogen. Dem folgte eine Fütterungszeit von 10 Minuten mit den angesetzten Bakterien. Bei der Vorbereitung für die Messungen mit 5-HT wurden die Tiere ebenfalls vorher fünfmal mit S-Basal gewaschen und anschließend für 20 Minuten in der jeweiligen 5-HT Konzentration inkubiert. Die 5-HT Verdünnungen wurden mit M9-Puffer angesetzt. Eine genaue Übersicht der jeweiligen Versuche mit Angabe der eingesetzten Stämme, Inkubationsschemata und für die Messungen im Chip genutzten Stimuli ist in Tab. 9 zusammengestellt. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit NemAcquire und die Analyse mit der NemAnalysis Software.

Tab. 9: Übersicht der durchgeführten Versuche mit Angabe von Stamm, Inkubationsschemata und eingesetzte Pumpstimuli.

Versuch	Stamm	Zeit	Inkubation  in	Messung im Nemamatrix 
Pumpverhalten	N2	48 h 96 h 168 h	Kontrolle 100 µM CisPt 300 µM OxaliPt 1 mM CarboPt	LabTie Bakterien 2 mM 5-HT 5 mM 5-HT 10 mM 5-HT
Konzentrationsreihe 5-HT	N2	96 h	Kontrolle	0, 2, 5, 10 und 20 mM 5-HT
Mutanten	N2 <i>tph-1</i> <i>ser-1</i> <i>ser-4</i> <i>ser-7</i> <i>mod-5</i> <i>cat-2</i>	48 h	Kontrolle 100 µM CisPt	OP50-1 5 mM 5-HT
Nahrungsentzug	N2	48 h	Kontrolle 100 µM CisPt 24 h Kontrolle, 24 h ohne OP50-1	OP50-1 5 mM 5-HT
Co-Inkubation mit 5-HT	N2	48 h	Kontrolle 100 µM CisPt + 0,4 mM 5-HT	OP50-1 5 mM 5-HT
Co-Inkubation mit Duloxetine	N2	48 h	Kontrolle 100 µM CisPt + 1, 10 und 100 µM Dulox	OP50-1 5 mM 5-HT
Co-Messung	N2	48 h	Kontrolle 100 µM CisPt	OP50-1 + steigende 5-HT Konz. (0, 0,4, 2 und 5 mM)
Dosisabhängigkeit	N2	48 h	Kontrolle CisPt (25, 50, 100, 150 und 300 µM)	OP50-1
Reparaturmutante	N2 <i>xpc-1</i>	48 h	Kontrolle 25 µM CisPt 50 mJ/m ² UV-C	OP50-1

2.2.6 Chemotaxis Assay

Für den Chemotaxis Assay wurden >100 N2 L4/Jungadulte N2 Tiere für 96 h oder 168 h mit Kontrollmedium, 100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt und 1 mM CarboPt inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Mutanten *odr-1*, *eat-4* und *odr-7* in Kontrollmedium inkubiert. Danach wurde jede Gruppe in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt und insgesamt fünfmal mit S-Basal und einmal mit ddH₂O gewaschen. Während des Waschvorgangs wurden die Chemotaxis Platten vorbereitet. Dazu wurde die Platte mit einem Stift in

vier gleichgroße Quadranten unterteilt. Die gegenüberliegenden Punkte wurden mit A und B sowie C und D markiert (Abb. 7). In der Mitte wurde ein Kreis mit 1 cm Durchmesser eingezeichnet, Tiere in diesem wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt. Auf die Punkte A und B wurde 1 µL der Substanz gegeben (1 % Benzaldehyd, 0,1 % Diacetyl oder 10 %/100 % 2-Nonanon). Auf die Punkte C und D wurde 1 µL des Verdünnungsmediums des Attraktants pipettiert. Bei Benzaldehyd und Diacetyl ist dies 100 %iger Ethanol, bei 2-Nonanon ddH₂O. Kurz vor jedem Punkt wurden jeweils 1 µL 1 M NaN₃ gegeben, um die Tiere zu paralisieren und die spätere Auszählung zu erleichtern. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Nematoden mit einer Glaspasteurpipette in die Mitte der Platte gegeben und die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt. Nach 2 h wurde die Anzahl der Tiere in jedem Quadranten gezählt und mittels der Formel (Abb. 7) der Chemotaxis Index (CI) berechnet. Dabei bedeutet ein CI von 1 oder -1 maximale Attraktion/Repulsion und einer von 0 keine Anziehung.

Für die Untersuchung des möglichen repulsiven Potentials der Platinanaloga wurden >100 N2 L4/Jungadulte N2 Tiere für 96 h in Kontrollmedium kultiviert. Der Chemotaxis Assay wurde anschließend, wie oben beschrieben, durchgeführt. Auf die Punkte A/B kamen 1 µL des jeweiligen Chemotherapeutikums (100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt oder 1 mM CarboPt) und auf C/D 1 µL ddH₂O.

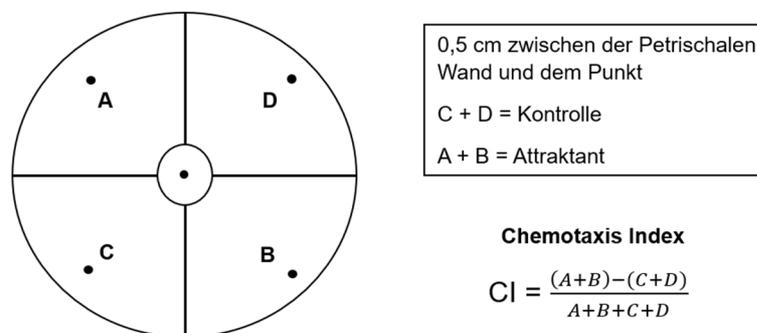


Abb. 7: Vorbereitung der Chemotaxis Platten und Berechnung des CI.

2.2.7 Food Attraction Assay

Die Wahrnehmung von Futter (*E. coli* OP50⁻¹) wurde mit dem *Food Attraction Assay* überprüft. Dazu wurden >100 L4/Jungadulte N2 Tiere für 96 h mit Kontrollmedium, 100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt und 1 mM CarboPt inkubiert. Einen Tag vor dem Versuch wurden die Chemotaxis Platten (Zusammensetzung Tab. 5) vorbereitet. Die Platten wurden mit einem Punkt und in 4,5 cm Entfernung gegenüber mit einem weiteren Punkt versehen. Auf den einen Punkt wurden 100 µL einer *E. coli* OP50⁻¹ Bakteriensuspension (OD₆₀₀=0,1 oder 0,9; eingestellt mit LB-Medium (Kapitel 2.1.5))

gegeben und diese über Nacht bei RT getrocknet. Nach der Inkubationszeit wurde jede Versuchsgruppe in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt und insgesamt fünfmal mit S-Basal und einmal mit ddH₂O gewaschen. Während der Waschschriffe wurden die Platten weiter vorbereitet, indem jeweils 2 µL 1 M NaN₃ auf den Bakterienrasen gegeben wurden. Nach dem letzten Waschschriff und dem Trocknen des NaN₃ wurden die Tiere mit einer Glaspasteurpipette auf den gegenüberliegenden Punkt des Bakterienrasens gegeben und die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier aufgesogen. Nach 2 h wurde die Anzahl der Tiere, die sich innerhalb und außerhalb des Bakterienrasens befand, gezählt und die Ergebnisse prozentual dargestellt. Als Positivkontrolle wurde die *cat-2* Mutante eingesetzt.

2.2.8 *Mechanosensory Assay*

Die Inkubation erfolgte mit mind. 50 L4/Jungadulte N2 Tieren, welche 96 h in Kontrollmedium, 100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt und 1 mM CarboPt inkubiert wurden. Die Durchführung des *Mechanosensory Assays* wurde nach [161] geplant. Nach der Inkubationszeit wurden die Tiere auf mittlere NGM Platten mit *E. coli* OP50⁻¹ Bakterienrasen überführt. Nach einer Akklimatisierungsphase von mind. 30 Minuten wurden 30 Nematoden pro Gruppe gezählt. Jedes Tier wurde insgesamt zehnmal mit einer menschlichen Wimper, die an einer Pasteurpipette befestigt wurde, abwechselnd fünfmal anterior (hinter Pharynx) und fünfmal posterior (vor Anus) angetippt. Beim Antippen anterior reagieren die Tiere durch Zurückweichen und bei posterior durch eine Vorwärtsbewegung. Nur entsprechende Antworten des Tieres wurden bewertet und prozentual ausgewertet. Als Positivkontrolle wurde die *cat-2* Mutante eingesetzt.

2.2.9 *Learning Assay*

Für die Überprüfung des Lernverhaltens wurden >100 L4/Jungadulte N2 Tiere 96 h mit Kontrollmedium, 100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt und 1 mM CarboPt inkubiert. Zur Kontrolle wurde die *cat-2* Mutante in Kontrollmedium kultiviert. Danach wurde jede Gruppe in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt und insgesamt fünfmal mit S-Basal und einmal mit ddH₂O gewaschen. Bei dem Versuch gibt es drei verschiedene Testgruppen:

- 1) naiv: Tiere auf Chemotaxis Platten, ohne Futter und ohne Odorant.
- 2) konditioniert: Tiere auf Chemotaxis Platten, ohne Futter und mit Odorant.
- 3) konditioniert Futter: Tiere auf NGM-Kultivierungsplatten mit *E. coli* OP50⁻¹ Bakterienrasen mit Odorant.

Der Versuch wurde wie bereits beschrieben durchgeführt [162]. In die Deckel der Gruppen mit Odorant wird innen Parafilm platziert auf welches 2 µL 100 %iges

Benzaldehyd gegeben wurde. Die Platte wurde mit dem Deckel verschlossen, mit Parafilm versiegelt und für 1 h invertiert stehen gelassen. Nach der Inkubationszeit wurden die Tiere mit S-Basal abgespült und in 1,5 mL Eppendorf Gefäße gegeben und mit ddH₂O gewaschen. Danach wurden die Tiere auf eine mit 1 % Benzaldehyd vorbereitete Chemotaxis Platte gegeben und der Chemotaxis Assay, wie unter 2.2.6 beschrieben, für 1 h durchgeführt und der CI berechnet (Abb. 7). Als Positivkontrolle wurde die *cat-2* Mutante eingesetzt.

Bei der Co-Inkubation wurden >100 L4/Jungadulte N2 Tiere für 48 h und 96 h mit Kontrollmedium oder 100 µM CisPt mit 5-HT (0,4 mM) oder Dulox (1 µM oder 100 µM) co-inkubiert. Anschließend wurde der *Learning Assay*, wie zuvor beschrieben, durchgeführt und das Verhalten der naiven und konditionierten Tiere bewertet.

2.2.10 mRNA Isolierung

In Vorbereitung für die Real-Time-RT-PCR wurden mind. 2000 N2 L4/Jungadulte Tiere für 48 h in Kontrollmedium oder 100 µM CisPt inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Nematoden in 1,5 mL Eppendorf Gefäße überführt und mind. achtmal mit M9-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand entfernt und mit 600 µL RLT-Puffer aufgefüllt. Dem RLT-Puffer wurden 10 µL/mL Dithiothreitol hinzugefügt, um die RNA zu stabilisieren. Diesem Schritt folgte eine Lyse der Tiere mit dem Tissue Lyser bei 30 Hz für zwei Minuten. Das erhaltene Lysat wurde auf Shredder Säulen gegeben und bei 15000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Die abschließende RNA-Isolation wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits und dem dazugehörigen Herstellerprotokoll mit DNA-Verdau durchgeführt. Mit dem Kit wird die zu untersuchende mRNA von den restlichen Zellbestandteilen getrennt und der zusätzliche DNA-Verdau stellt sicher, dass keine DNA in der Probe enthalten ist. Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte mit dem Nanodrop.

2.2.11 cDNA-Synthese

Die zuvor gewonnene mRNA muss in einem nächsten Schritt in DNA umgeschrieben werden, da die Real-Time-RT-PCR nur mit DNA durchgeführt werden kann. Die Synthese von 500 – 2000 ng cDNA erfolgte unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits und des beigefügten Herstellerprotokolls.

2.2.12 Real-Time-RT-PCR

Für die Real-Time-RT-PCR wurde SYBR Green (SensiMix Sybr Hi Rox) verwendet, welches in die DNA interkaliert. Die Durchführung erfolgte in einer 96er-Mikrotiterplatte, wobei jede Vertiefung ein definiertes Reaktionsvolumen (50 % SensiMix Sybr Hi Rox, 20 ng cDNA und 250 nm Primer) von insgesamt 20 µL enthält.

Die verwendeten Primer wurden über Sigma-Aldrich (KiCqStart® SYBR® Green Primers) bestellt und durch Sigma-Aldrich in PCR-Arrays zusammengestellt. Als Referenzgene dienten *ama-1* und *cyb-1*. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind mit *forward* und *reverse* Sequenz in Tab. 10 eingetragen.

Tab. 10: Primersequenzen.

Gen	Sequenz	
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
<i>ace-1</i>	TTTTACACACAGAGCTTCTC	CAACTCTCGTTCTTCATCAG
<i>ace-2</i>	GTTGGGTTACGAGAATATC	ATTATTGAGCCACTCTTTGC
<i>ace-3</i>	GCGGATGCTTACAATCTTAC	CAAATGGTCCAACCTCGATAG
<i>ama-1</i>	GGCTATGGAAAGTGAATGG	GTGAGGTCCATTCTGAAATC
<i>avr-14</i>	ACAGTGCTCAATTCACATTC	CGTGCTTCCTTTTCATTTTG
<i>avr-15</i>	GGATGCTAGACCAAATCAG	GAGCTGATAATCTGGCAATC
<i>bas-1</i>	TTCGAATGAGGAACTCAAG	GCACGGTCTTCTTTAATAGC
<i>cat-1</i>	CCTCTTTCATTGGTCTTGTC	CGCATCAATCATACCGATAG
<i>cat-2</i>	CAAGTTTGGTGACGAGATAG	GTCAAACCTTCTCCTCTTG
<i>cat-4</i>	TGAAATGTTCTCCCTTTGTG	GTAAGACGTTCTTGGACTTG
<i>cha-1</i>	GGTATGATGCGACTATTCAG	GTCGTTCCAAACCATCTTG
<i>cho-1</i>	TGCAATTTCCCTTGTTATGG	GCCATATTTGTGCTGAAAAG
<i>cyb-1</i>	AAAAGGATAGCCTCCAGATG	TGATTCTCTGTGACTTTTGC
<i>dat-1</i>	TCAGGGTTTGTGATTTTCTC	CCTCCGAATGAAGAATCAAG
<i>dop-1</i>	AGAAAGCACGTCTTACATTG	CCAGGTTACTGCCATAATTG
<i>dop-2</i>	ACGAGTATCAATGCCAATTC	AAGTAGTTCTGCGCTATTTG
<i>dop-3</i>	ATCAGTTTTTCAGACGTCATC	TTGAACGAGTTGATCATTGG
<i>dop-4</i>	TGAAGATCAGTCACAATGTC	CCATATGCGAAGAGAATGAG
<i>eat-18</i>	GACCCGTATAGAACTTTTGG	CAAAGTGTTGATCGCATTTC
<i>eat-2</i>	TATTCAACAGTGCGAATGAG	GGAGCCGAACTTCAAATAG
<i>eat-4</i>	TCCACCAAACAACTATTTCG	CCACAAGGTAGTCACTTTTC
<i>exp-1</i>	TGGCATTACACGAAAGTTAC	ACAATGTCAAGTCCATTGTG
<i>gar-1</i>	TTAATGCTCCAGTCAAAGC	TTTCGTTGCTTTCTCTTCTC
<i>gar-2</i>	CAACAGTAGCTCAGATTCAC	CGTCTGTACAGTTGTAGTTG
<i>gar-3</i>	TGCCGACTAATTTTGAAGAC	GGTTCACAGCTACTTAATCG
<i>glc-1</i>	ACAAGCTAGAACGAAATCAC	GTGAATCGGGGATGTTAATC
<i>glc-2</i>	TCTCATGGGTTTCATTTTGG	GATTGCAGATTGCATTGTAG
<i>glc-3</i>	TTGGATAGTTGGAGGAAATTG	ACGTACTCTCCAGTCATATC
<i>glc-4</i>	GCATGTTCAATGCATCTTTC	AGCTGTTGTGTAAGCATAAG
<i>glr-1</i>	ATATTGGGGTGTGAGTAGTC	TCGTTGGAAATAGTGAATCC
<i>glr-2</i>	TTTGGGAGAGATTTCAATGG	CGATGGCAAATTCCTTTTC

<i>glr-3</i>	CAGCGATTGTTTCAGAGTATC	TCGAACACAACACTACAACATC
<i>glr-4</i>	AGTTGTTGACTTCACACTTC	ACCATTCATACGGTGAAAAC
<i>glr-5</i>	GACGGCTTGATGATATTGG	GCATCACATATGGTCTTTCC
<i>glr-6</i>	GATCAAAGTGGAGGGAAAAG	TCACTTGACTGACATTCTTG
<i>glr-7</i>	CTGGAACAACCAATCAGTTC	AGCCATTCTTCTGAAATACG
<i>glr-8</i>	TAGAGGGGAAGTAGATTTGC	CATGAGAAAGGCTCAGTAAC
<i>mod-1</i>	GAGGATCACTTCATCGAAAC	GATCGCATCTCTTCAATCAG
<i>mod-5</i>	TAGTTCGTTCAAGCCAATTC	CTGAGCAGGTAGATTATTGC
<i>nmr-1</i>	TGGTCCAAATTGTGTAGTTG	TTTTGGAAATACCGGGTAAC
<i>nmr-2</i>	ACGATCTGCGAATTTAAGAC	CAAAGATTGGTTTTCGACTTG
<i>ser-1</i>	ATGCTCATTGAACTCTTCTC	CCGTTGAAATGGTAGATTCC
<i>ser-4</i>	CATTGGTTCAGACCGTAATC	CTATCATTCCGACCAACAAG
<i>ser-5</i>	CGATATCTCGCAGTTACAAG	CCAACAAAACACAAGGAATC
<i>ser-7</i>	TGCAAAAGGACCATTGATTC	TGCCGAAAGACTTGAATATG
<i>snf-11</i>	TTTTCAAAGGCGTTGGTATC	GTTCTTCCAAGGAACATCAG
<i>snf-6</i>	TTCCGTTGTTTAAGGGAATC	ACAATTTGACCATGGAATCG
<i>tph-1</i>	TGATCATCCTGGTTTCAAAG	TCACCGTGTGTTGAATTGAG
<i>unc-17</i>	GATGGCTCTTCGCTTCAA	CGGAATCTCGTATCCAACCTC
<i>unc-25</i>	TCGAATTGTTTCAGGTTCTTC	TCTTCACAAGCTTCAACAAG
<i>unc-30</i>	GAGTGAGAGTTTGGTTCAAG	GGAAACGTGTTCTGAAGTG
<i>unc-46</i>	AAAATTCGCTGGTAGTTCTG	ATCTCTGGAGAGAACATCAC
<i>unc-47</i>	GTTGTTTTCCAAGTGTGAC	CGAATGACAGACAGTAAAGG
<i>unc-49</i>	AGGATGAGGACTCACATATC	CTGGGCCGTAATCTTTTATC

Der CFX96 RT-PCR-Thermocycler und das folgende Protokoll (Tab. 11) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Auswertung wurde mit Hilfe des Bio-Rad CFX Managers durchgeführt. Zur Auswertung diente der Schwellenwert-Zyklus Wert ΔCT (engl: *Cycle Threshold*). Mit diesem wird anhand der SYBR Green Fluoreszenzintensität die Zyklenzahl angegeben, welche den Schwellenwert übersteigt. Die $\Delta\Delta CT$ -Werte wurden durch die Normalisierung mit den Referenzgenen erhalten und auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle relativiert. Für die Auswertung wurden nur PCR-Produkte mit spezifischer Schmelzkurve und einem ΔCT von ≤ 35 eingesetzt.

Tab. 11: Verwendetes PCR-Programm.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Aktivierung	95 °C	10 Minuten
2. Denaturierung	95 °C	15 Sekunden
3. Annealing der Primer	55 °C	15 Sekunden
4. Elongation	72 °C	17 Sekunden
5. Finale Denaturierung	95 °C	1 Minute
6. Abschluss	55 °C	1 Minute
7. Schmelzkurvenbestimmung	65-95 °C	1 °C/5 Sekunden
44-malige Wiederholung der Schritte 1 - 4.		

2.2.13 Bestimmung von Serotonin und Dopamin mittels HPLC-MS/MS

Die Inkubation von 3000 bis 6000 L4/Jungadulten N2 Tieren fand für 48 h in Kontrollmedium, 100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt und 1 mM CarboPt statt. Nach der Inkubationszeit folgten mind. acht Waschschrte mit M9-Puffer, um die Larven von den adulten Tieren zu trennen. Die Adulten wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und der Überstand bis auf 50 µL entfernt. Die Pellets wurden daraufhin bei -80°C eingefroren. Die Bestimmung von 5-HT und DA wurde in Potsdam mittels Flüssigchromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie (HPLC-MS/MS) durch Prof. Dr. Julia Bornhorst nach bereits publiziertem Protokoll durchgeführt [163].

2.2.14 Eiablage

Der Versuch wurde mit L4/Jungadulten N2, *tph-1* und *ser-7* Tieren durchgeführt und eine Inkubationszeit von 48 h in Kontrollmedium oder 100 µM CisPt ausgewählt. Die Durchführung des Versuchs wurde in Anlehnung an [164] und [141] geplant. Nach der Inkubationszeit wurden die Tiere mit M9-Puffer fünfmal gewaschen und jeweils ein Tier in eine Vertiefung einer vorbereiteten 96er-Mikrotiterplatte überführt. Eine Platte pro Gruppe wurde dabei eingesetzt. In dieser waren jeweils 16 Vertiefungen mit M9-Puffer + OP50⁻¹ Bakterien (OD₆₀₀=0,9), 2 mM 5-HT, 5 mM 5-HT, 2 mM 5-HT + OP50⁻¹ Bakterien (OD₆₀₀=0,9) sowie 5 mM 5-HT + OP50⁻¹ Bakterien (OD₆₀₀=0,9) belegt. Nach 2 h wurden die gelegten Eier pro Vertiefung gezählt.

Bei der Co-Inkubation wurden L4/Jungadulte N2 Tiere für 48 h und 96 h mit Kontrollmedium oder 100 µM CisPt mit 5-HT (0,4 mM) oder Dulox (1 µM oder 100 µM) co-inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der gelegten Eier jeweils in M9-Puffer + OP50⁻¹ Bakterien (OD₆₀₀=0,9) oder 5 mM 5-HT, wie zuvor beschrieben, bestimmt.

2.2.15 Apoptose

Bei der Analyse der Apoptose wurde nach Gartner *et al.* vorgegangen [165]. Apoptose kann in *C. elegans* in der Keimbahn durch das Anfärben sogenannter Apoptose Körper mit Acridine Orange (AO) visualisiert werden. Dazu wurde eine 10 mg/mL

Stammlösung von AO in M9-Puffer angesetzt. Am Messtag wurde die Stammlösung 1:200 mit M9-Puffer verdünnt. Die L4/Jungadulten N2 Tiere wurden zuvor 48 h in Kontrollmedium oder 100 μ M CisPt mit 5-HT (0, 0,4 oder 2 mM) co-inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Tiere fünfmal gewaschen und anschließend auf mittlere NGM-Platten gesetzt, welche mit einem *E. coli* OP50⁻¹ Bakterienrasen versehen waren. Auf jede Platte wurden anschließend 500 μ L der verdünnten AO-Lösung gegeben und geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Daraufhin folgte eine einstündige Inkubationszeit im Dunkeln bei RT. Die Tiere wurden anschließend mit M9-Puffer von den Platten gespült und dreimal gewaschen. Danach wurden die Nematoden für 1 h auf neue mittlere NGM-Platten mit Bakterienrasen gegeben, damit die überschüssige Farbe aus dem Darm entleert werden kann. Anschließend wurde mikroskopiert (s. Kapitel 2.2.16).

2.2.16 Mikroskopie

Für die mikroskopische Betrachtung der behandelten Nematoden wurden Agarose-Pads (3 %) angefertigt, mit 9 μ L Levamisol (12,5 mM) zur Betäubung der Tiere versehen und die in die Lösung überführten Individuen mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Nematoden wurden mit 10- oder 20-facher Vergrößerung mittels FITC-Filter betrachtet.

2.2.17 Färbungen

Die in dieser Arbeit genutzten Färbemethoden dienten dem Anfärben verschiedener sensorischer Neurone.

2.2.17.1 FITC

Für die Fluorescein5(6)isothiocyanat (FITC) Färbung wurde nach [97] vorgegangen. Zu Beginn wurde eine 20 mg/mL Stammlösung mit FITC und Dimethylformamid angesetzt, welche bei -20 °C gelagert wurde. Von dieser wurden 50 μ L mit 200 μ L M9-Puffer gemischt. Die Verdünnung wurde dann auf eine 10 mL NGM-Agar Platte gegeben, welche einen OP50⁻¹ Bakterienrasen enthielt, und geschwenkt. Anschließend wurde die Platte bei RT im Dunkeln für 2 h stehen lassen, damit die Färbung in den Agar diffundieren kann. Anschließend wurden die 48 h und 96 h in 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt inkubierten und gewaschenen Nematoden auf die vorbereiteten FITC Platten gegeben und für 2 h ruhen gelassen. Daraufhin wurden die Tiere mit M9-Puffer von der Platte gespült und in einem Eppendorf Gefäß zwei- bis dreimal gewaschen, bis die Lösung klar war. Die Nematoden wurden dann auf eine frische 10 mL NGM-Agar Platte mit *E. coli* OP50⁻¹

Bakterienrasen gegeben. Auf dieser konnten die Tiere für 1 h den Darm von überschüssiger Farbe entleeren. Daraufhin wurde mikroskopiert (s. Kapitel 2.2.16).

2.2.17.2 DiO

Die Versuchsdurchführung der 3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanin Perchlorate (DiO)-Färbung erfolgte nach Protokoll 5 unter Fluoreszenzmikroskopie [166]. Zu Beginn wurde eine 2 mg/mL Stammlösung mit DiO und Dimethylformamid angesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Für den Versuch wurde die Stammlösung 1:200 mit M9-Puffer verdünnt. Die zuvor für 48 h und 96 h in 100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt und 1 mM CarboPt inkubierten sowie die *osm-3* Tiere, welche als Negativkontrolle fungierten, wurden fünfmal in einem 1,5 mL Eppendorf-Gefäß gewaschen. Anschließend wurden zu den Nematoden jeweils 150 µL der verdünnten DiO-Lösung gegeben und 2 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und einmal mit M9-Puffer gewaschen, bevor die Tiere auf 10 mL NGM-Agar Platten mit *E. coli* OP50⁻¹ Bakterienrasen gegeben wurden. Auf der die Nematoden für 1 h den Darm von überschüssiger Farbe entleeren konnten. Anschließend wurde mikroskopiert (s. Kapitel 2.2.16).

2.2.18 Analyse der Reporterstämme

Für die Untersuchung der serotonergen, cholinergen und GABAergen Neurone wurden Reporterstämme eingesetzt. Die Betrachtung des serotonergen (GR1366 *mgIs42* [*tph-1::GFP* + *rol-6(su1006)*]) Reportstammes erfolgte nach 48 h und 96 h Inkubation mit Kontrollmedium oder 100 µM CisPt. Die Untersuchungen der cholinergen (LX929 *vsIs48* [*unc-17::GFP*]) und GABAergen (CZ1632 *juIs76* [*unc-25p::GFP* + *lin-15(+)*] II) Reporterstämme erfolgte nach einer Inkubationszeit von 96 h in Kontrollmedium oder 100 µM CisPt. Nach der Inkubationszeit wurden die Tiere auf 10 mL NGM-Agar Platten gegeben, welche einen OP50⁻¹ Bakterienrasen besitzen und von diesen auf Objektträger überführt und mikroskopiert (s. Kapitel 2.2.16).

3. Ergebnisse

3.1 Cisplatin reduziert die Pumpfrequenz von *C. elegans*

Das pharyngeale Pumpen wurde als neurologischer Endpunkt genutzt, da es durch das pharyngeale Nervensystem kontrolliert wird [120] und bereits in früheren Studien für die Untersuchung neurotoxischer Schäden eingesetzt wurde [145, 147]. Für die Messung der Pumpaktivität wurde das ScreenChip™ System von Nemametrix (InVivo Biosystems) verwendet. Durch die automatisierte Messung der Pumprate kann diese exakter als durch manuelles Zählen bestimmt werden, wodurch letztendlich auch eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse erzielt wird. Zusätzlich können weitere Parameter (wie z.B. Frequenz, Pumpdauer, IPI und R/E Ratio) ausgewertet werden, welche eine differenziertere und umfangreichere Analyse des pharyngealen Pumpens ermöglichen (vgl. Abb. 6). Während der Messungen mit dem ScreenChip™ System wird das pharyngeale Pumpen der Nematoden entweder mit Hilfe von Bakterien oder 5-HT stimuliert, weil die Nematoden ohne Stimulation nicht mit dem Pumpen starten [157]. Für die nachfolgenden Versuche mit dem ScreenChip™ System wurden Bakterien als Pumpstimulus verwendet. Vor der Messung wurden die Tiere für 2 h gehungert, damit anschließend in Gegenwart der lebenden Bakterien die maximale Pumprate der Individuen gemessen werden kann [157, 167]. Nach dieser Hungerperiode wurden die Nematoden für 10 Minuten mit lebenden Bakterien gefüttert und das Pumpverhalten in Gegenwart des Stimulus gemessen. Für die Aufklärung des molekularen Mechanismus der CIPN in *C. elegans* wurden die Platinderivate CisPt (100 µM), OxaliPt (300 µM) und CarboPt (1 mM) eingesetzt. Für die angegebenen Dosierungen konnten für diese Platinanaloga in vorherigen Untersuchungen bereits äquitoxische Effekte gezeigt werden [147].

Über den Zeitraum von 168 h ist bei den Kontrolltieren eine generelle Reduktion der Pumpfrequenz zu beobachten (Abb. 8a), die auf einer altersbedingten Abnahme beruht [154]. Dagegen führt die Behandlung mit CisPt bereits nach 48 h zu einer altersunabhängigen Reduktion der Pumprate im Vergleich zur Kontrolle. Auch im weiteren Verlauf des Messzeitraums nimmt die Pumpfrequenz der CisPt-behandelten Tiere stetig ab und liegt an jedem Messzeitpunkt deutlich unter der Pumpfrequenz der unbehandelten Kontrollpopulation (Abb. 8a). Generell kann eine dosisabhängige Reduktion der Pharynxaktivität und bei hohen CisPt-Dosen (300 µM) ein Sättigungsniveau von 50 % der maximalen neuronalen Aktivität beobachtet werden (Anhang Abb. 26). Die Oxali- und CarboPt-behandelten Nematoden zeigen, im Vergleich zu den CisPt-behandelten Tieren, keine Veränderung der Frequenz auf (Abb. 8a). Die Pumpdauer liegt basal beim frühen Messzeitpunkt (48 h) bei ca.

150 ms und nimmt über den Verlauf von 168 h altersbedingt tendenziell bis auf ca. 200 ms zu (Abb. 8b).

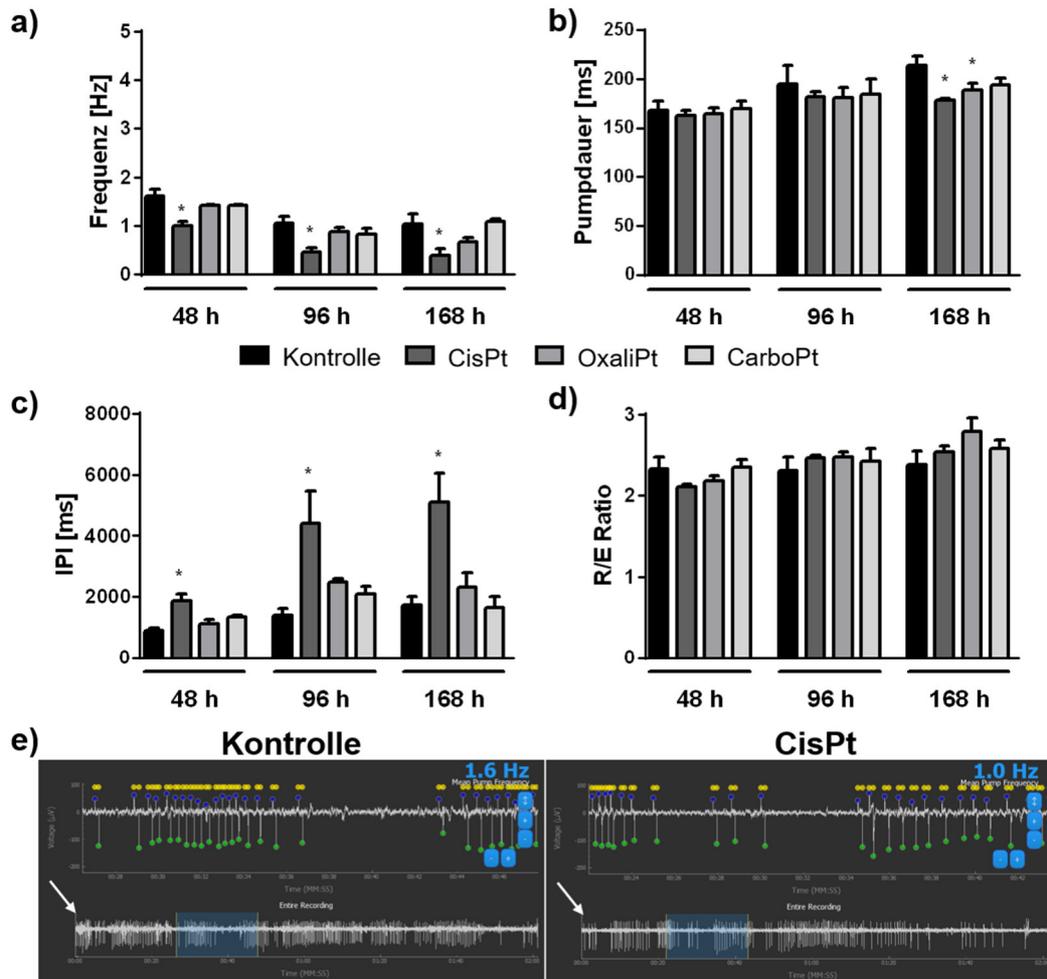


Abb. 8: Eine Behandlung mit Cisplatin wirkt hemmend auf die Pumpfrequenz in *C. elegans*.

Elektrophysiologische Messung mit dem ScreenChip™ System von Nemamatrix (InVivo Biosystems) mit dem Pumpstimulus *E. coli*. Das Pumpverhalten von N2 Nematoden wurde nach 48 h, 96 h und 168 h Inkubation mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt gemessen. In der Abbildung sind die verschiedenen Parameter aufgeführt, die mit der Software NemAnalysis ausgewertet wurden. a) Pumpfrequenz, b) Pumpdauer, c) IPI und d) R/E Ratio. Dargestellt sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 28$ /Gruppe; * $p < 0,05$ (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). e) Repräsentative original EPGs der Kontroll- und CisPt-Gruppe nach 48 h. Die gesamte Aufnahme ist unter *Entire Recording* (weißer Pfeil) zu sehen.

Bei den behandelten Tieren ist keine Veränderung der Pumpdauer zu sehen (Abb. 8b). Mit dem Parameter IPI kann festgestellt werden, wie lange es dauert, bis der untersuchte Nematode mit dem nächsten Kontraktions- und Relaxationszyklus beginnt. Das IPI der CisPt-behandelten Tiere ist bereits nach 48 h verlängert und nimmt im Verlauf der Inkubationszeit weiter zu (Abb. 8c). Dies lässt vermuten, dass die behandelten Tiere deutlich länger brauchen, um mit dem nächsten Pumpvorgang zu starten. Das Verhältnis zwischen Relaxation und Kontraktion (R/E Ratio) ist in allen

Gruppen und über den betrachteten Zeitraum unverändert (Abb. 8d). In Abb. 8e sind repräsentative Bilder der EPGs der Kontrolle und CisPt-behandelten Tiere nach 48 h zu sehen. Mit Hilfe der EPGs, die mit der Analyse Software von Nematrix erstellt wurden, wurden die in Abb. 8a-d gezeigten Parameter bestimmt. In dem dargestellten Ausschnitt der EPGs ist die Pumpfrequenz abgebildet, welche im rechten oberen Teil des Bildes in Hertz (Hz) angegeben ist. Die EPGs verbildlichen repräsentativ den Unterschied in der Pumpfrequenz zwischen der Kontrolle und den CisPt-behandelten Tieren. Dieser Unterschied wird besonders deutlich, wenn die gesamte Messung unter „Entire Recording“ (weißer Pfeil) betrachtet wird. Die Kontrolltiere weisen deutlich mehr Pumpvorgänge pro Zeiteinheit auf als die CisPt-behandelten Tiere.

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Behandlung mit CisPt bereits nach einer 48-stündigen Inkubation zu einer Verringerung der Pumpfrequenz mit einhergehender Erhöhung des IPI führt. Eine Beeinträchtigung des Pharynx könnte eine mögliche Ursache für die veränderte Pumpaktivität nach CisPt Exposition sein. Die Kompartimente des Pharynx sowie der Zermahler (vgl. Abb. 5) sind nach 48- und 96-stündiger Behandlung mit Cis-, Oxali- und CarboPt unauffällig (Anhang Abb. 27 und Abb. 28). Auch die Inkubation mit den etablierten neurotoxischen Positivkontrollen Paraquat und Acrylamid [147] hatte keinen Einfluss auf die Morphologie des Pharynx (Anhang Abb. 27 und Abb. 28). Eine Veränderung der Pharynxmorphologie erscheint somit als Ursache für die verringerte Pumpaktivität nach Platinbehandlung unwahrscheinlich.

3.2 Platinderivate verursachen keine Störung der sensorischen Wahrnehmung in *C. elegans*

Die verringerte Pumpfrequenz, die bei den CisPt-behandelten Nematoden beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 8a), wirft die Frage auf, ob die behandelten Tiere möglicherweise nicht in der Lage sind die Nahrungsquelle wahrzunehmen und aus diesem Grund eine reduzierte Pumpfrequenz aufweisen. Patienten, die platinierende Agenzien im Rahmen der Krebstherapie erhalten, leiden insbesondere unter sensorischen Beeinträchtigungen [47]. Daher sollte untersucht werden, ob Beeinträchtigungen bei der Sensorik auch in dem Modellorganismus *C. elegans* nach einer Platinbehandlung auftreten.

Zum primären chemosensorischen Organ von *C. elegans* gehören die Amphidneurone, welche im Pharynx lokalisiert sind [115]. Ihre Zellkörper befinden sich im *terminalen Bulbus* und die zilierten Axone reichen vom Nervenring bis in den vorderen Pharynxbereich [168]. Die sensorischen Neurone von *C. elegans* können durch Zilia (subzelluläre Organellen) extrazelluläre Reize wahrnehmen [168]. Die

Phasmidneurone (PHA und PHB) sind im Schwanzbereich hinter dem Anus des Tieres ansässig [115]. Strukturelle Untersuchungen der sensorischen Neurone sind durch Einsatz von Farbstoffen möglich. Diese fluoreszierenden Farbstoffe werden von den Amphid- und Phasmidneuronen aufgenommen [97]. Der molekulare Mechanismus hinter dieser Aufnahmefähigkeit ist noch nicht bekannt [169]. In Abb. 9 ist die Visualisierung der Amphid- und Phasmidneurone unbehandelter und Platin-behandelter Tiere mittels DiO-Färbung dargestellt.

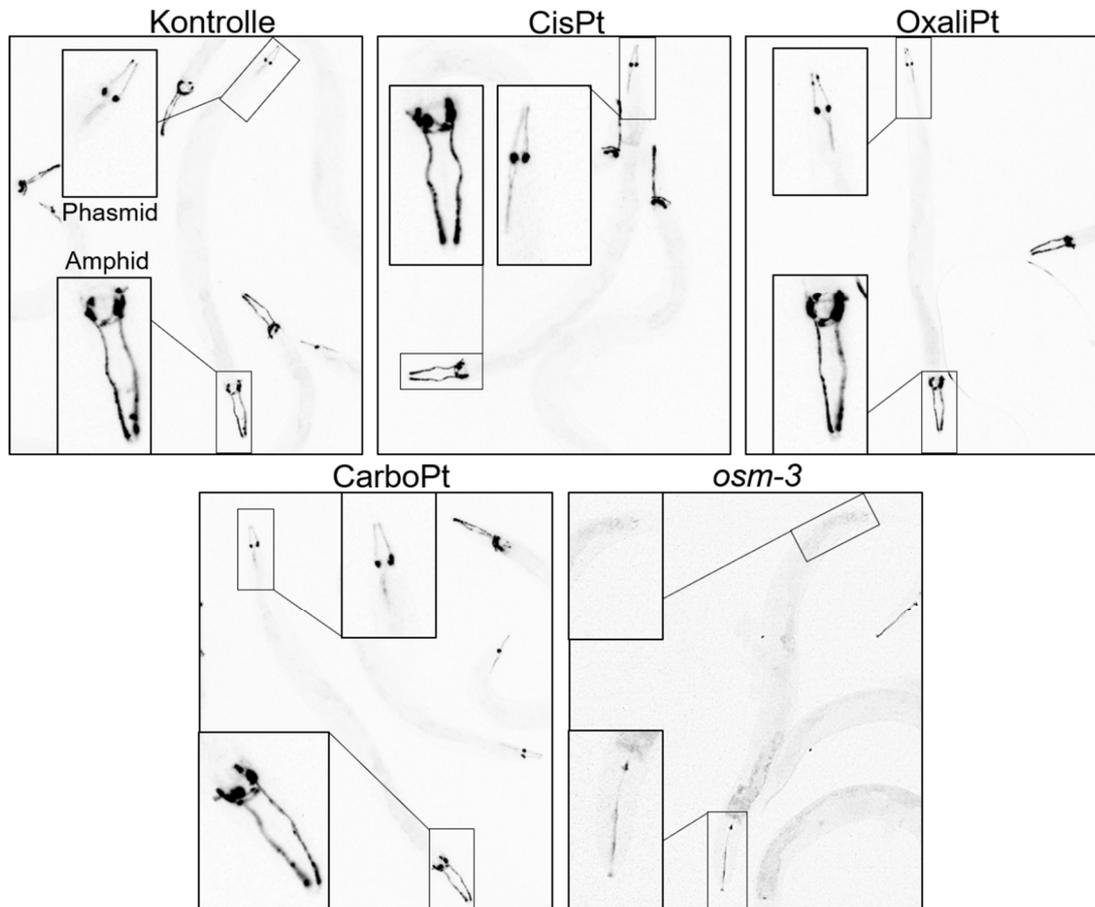


Abb. 9: Morphologische Unauffälligkeit der Amphid- und Phasmidneurone nach 96-stündiger Platinbehandlung.

Die Amphid- und Phasmidneurone von N2 *C. elegans* wurden nach 96 h Inkubation mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt mittels DiO-Färbung angefärbt. Die *osm-3* Mutante wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die repräsentativen Bilder der Nematoden aus n=2 unabhängigen Versuchen und insgesamt N \geq 30/Gruppe. Pro Gruppe ist der gesamte Nematode gezeigt. Die Amphidneurone (Pharynx) und Phasmidneurone (Schwanz) sind jeweils vergrößert dargestellt.

Mit der DiO-basierten Färbemethode können die ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK und AWB Amphidneurone, sowie die PHA und PHB Phasmidneurone sichtbar gemacht werden [166]. Eine Übersicht dieser Neurone, ihrer Funktion und der beteiligten Neurotransmitter ist in Tab. 12 im Anhang zusammengestellt. Eine 48- und 96-stündige Inkubation mit den Platinanaloga führte zu keiner nachweisbaren

Beeinträchtigung der Morphologie der oben genannten Neurone (Anhang Abb. 29 und Abb. 9). Die Amphid Dendrite sind in allen Gruppen sichtbar und weisen keine Unterbrechungen auf. Des Weiteren sind auch keine morphologischen Unterschiede bei den Amphid- und Phasmidneuronen zu verzeichnen (Abb. 9 und Anhang Abb. 29). Als Positivkontrolle wurde die *osm-3* Mutante eingesetzt. *Osm-3* kodiert für die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Mikrotubuli Motor-Aktivität und ist in die Organisation der Zilia involviert [169]. Ein Fehlen dieses Gens beeinträchtigt die Morphologie der Neurone und dies hat eine insuffiziente Färbung mit Fluoreszenzstoffen zur Folge [170], wie in Abb. 9 zu sehen ist. In der *osm-3* Mutante sind weder Amphid- und Phasmidneurone, noch Amphid Dendrite sichtbar (Abb. 9 und Anhang Abb. 29). Das fehlende Anfärben der Neurone ist mit einem Defekt der Zilia der *osm-3* Mutante assoziiert [169]. Demnach kann angenommen werden, dass die betrachteten Amphid- und Phasmidneurone nach Platinbehandlung keine morphologisch nachweisbaren Schäden aufweisen. Ob auch die Funktionalität der sensorischen Neurone unverändert ist, sollte mit ausgewählten Amphidneuronen in einem nachfolgenden Experiment überprüft werden.

Unter Verwendung des Chemotaxis Assay wurde die Funktionalität dreier sensorischer Amphidneurone (AWA, AWB und AWC) (Anhang Tab. 12) überprüft. Nematoden nutzen ihre sensorischen Fähigkeiten, um Futter wahrzunehmen und schädliche Umgebungen zu vermeiden [117, 171]. *C. elegans* ist in der Lage flüchtige Substanzen wahrzunehmen und entsprechend auf anziehende oder repulsive Stoffe zu reagieren [172]. Dabei wird angenommen, dass die Substanzen den Stoffwechselprodukten von Bakterien ähneln und so die Anwesenheit einer Nahrungsquelle suggerieren [173]. Der Attraktant Diacetyl wird von den Nematoden mit den AWA Neuronen wahrgenommen [172]. Das Ergebnis des Versuchs zeigte, dass nach 96-stündiger Behandlung mit platinierenden Agenzien die Tiere immer noch in der Lage sind Diacetyl wahrzunehmen (Abb. 10a). Erwartungsgemäß nimmt die als Positivkontrolle eingesetzte *odr-7* Mutante (*odr-7* kodiert für ein geruchsspezifisches Mitglied der Kernrezeptor-Superfamilie) das Diacetyl schlechter wahr als die Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 10a) [174]. Wie gut eine Substanz wahrgenommen wird, wird mittels Chemotaxis Index (CI) angegeben. Dabei bedeutet ein CI von 0 keine Attraktion/Repulsion und ein CI von 1/-1 maximale Attraktion/Repulsion [172]. Bei den AWB Neuronen ist der Neurotransmitter ACh involviert [175] und die Aufgabe dieser Neurone ist die Vermeidungsreaktion [176], eine Art Schutzmechanismus vor repulsiven Stoffen. Die eingesetzte Substanz 2-Nonanon wirkt als Repellent [176], d. h. die Nematoden meiden diese Substanz, wenn die AWB Neurone funktionell sind. Diese Vermeidung wird durch einen

negativen CI (-1) deutlich [176]. Die Meidung des 2-Nonanon ist bei allen behandelten Nematoden zu beobachten, trotz des niedrigen CI (-0,6 bis -0,4) (Anhang Abb. 30a).

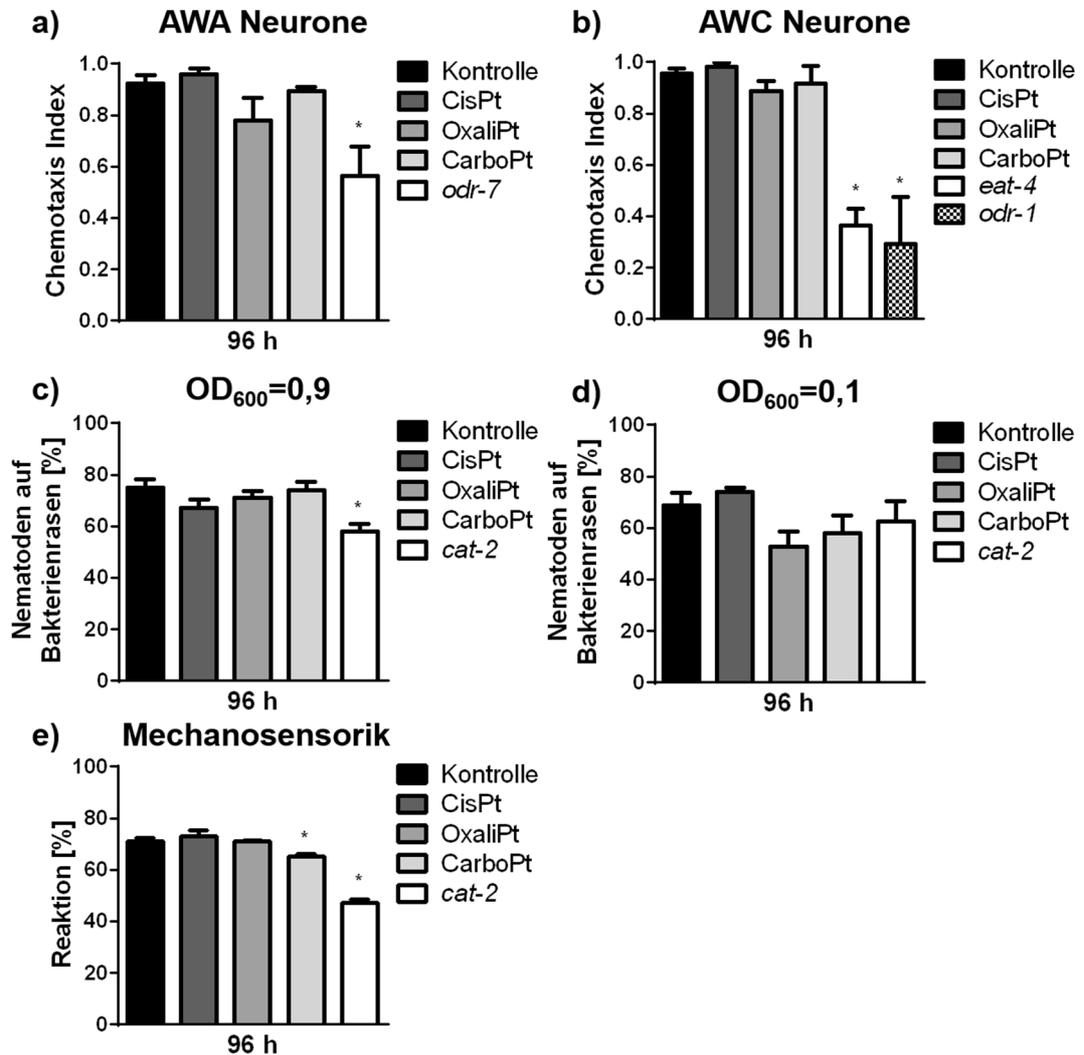


Abb. 10: Platinierende Agenzien haben keinen Einfluss auf die Sensorik.

Die sensorische Wahrnehmung wurde mit verschiedenen Experimenten überprüft. Die Inkubation der N2 Tiere vor den Versuchen wurde für 96 h mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und CarboPt durchgeführt. Für die jeweiligen Versuche wurden unterschiedliche Mutanten als Positivkontrolle eingesetzt. a) Chemotaxis Assay mit 0,1 % Diacetyl. Die *odr-7* Mutante diente als Positivkontrolle. Aufgetragen sind Mittelwert + SEM aus $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 317$ /Gruppe; $*p \leq 0,05$ (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). b) Chemotaxis Assay mit 1 % Benzaldehyd. Die *eat-4* und *odr-1* Mutanten dienten als Positivkontrolle. Aufgetragen sind Mittelwert + SEM aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 181$ /Gruppe; $*p \leq 0,05$ (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). c) Food Attraction Assay mit $OD_{600}=0,9$. Die *cat-2* Mutante wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Zu sehen sind Mittelwert + SEM aus $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 470$ /Gruppe; $*p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test) d) Food Attraction Assay mit $OD_{600}=0,1$. Die *cat-2* Mutante diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind Mittelwert + SEM aus $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 460$ /Gruppe; $*p \leq 0,05$ (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). e) Mechanosensory Assay. Die *cat-2* Mutante wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert + SEM aus $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 90$ /Gruppe; $*p \leq 0,05$ (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

Die OxaliPt-behandelten Tiere weisen ein verändertes repulsives Verhalten auf (Anhang Abb. 30a). Der bestimmte CI tendiert bei OxaliPt zum Positiven, was für eine Beeinträchtigung der AWB Neurone spricht. Die als Positivkontrolle eingesetzte *tax-4* Mutante (*tax-4* kodiert für zyklischen Nukleotid-gesteuerten Kanal) zeigt ebenfalls eine Vermeidungsreaktion auf (Anhang Abb. 30a), obwohl sie laut Literatur nicht in der Lage sein sollte das 2-Nonanon wahrzunehmen [176].

Der Neurotransmitter bei AWC Neuronen ist Glu [177]. Die AWC Neurone spielen eine wichtige Rolle beim lokalen Suchverhalten, welches die Tiere bei der Futtersuche aufzeigen [177]. Wie bereits bei den AWA Neuronen (Abb. 10a) ist auch die Funktionalität der AWC Neurone nach Gabe von platinierenden Agenzien unverändert sowohl nach 96 h (Abb. 10b) als auch nach 168-stündiger Inkubation (Anhang Abb. 30b). Die Mutanten *eat-4* (vesikulärer Glu Transporter) und *odr-1* (Transmembran-Guanylylzyklase) haben defekte AWC Neurone [172, 177] und nehmen dadurch das Benzaldehyd, wie erwartet, schlechter wahr (Abb. 10b und Anhang Abb. 30b).

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Morphologie und Funktionalität der betrachteten sensorischen Neurone gegeben sind. Dies impliziert, dass die Behandlung der Nematoden mit Platin-basierten Chemotherapeutika die Wahrnehmung von *E. coli* als Nahrungsquelle nicht beeinträchtigen sollte. Deshalb sollte in einem weiteren Schritt die generelle Wahrnehmung von Futter mit dem *Food Attraction Assay* überprüft werden. Bei diesem Versuch wird bestimmt wie viele Tiere den *E. coli* Bakterienrasen nach einer gewissen Zeit erreicht haben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Platin-behandelten Tiere in der Lage sind sowohl eine höhere ($OD_{600}=0,9$) (Abb. 10c) als auch eine niedrigere Bakteriendichte ($OD_{600}=0,1$) (Abb. 10d) wahrzunehmen. Lediglich bei OxaliPt wurde eine tendenziell hemmende Wirkung bei geringer Futterdichte festgestellt (Abb. 10d). Die *cat-2* Mutante, welcher das erste Enzym (Tyrosinhydroxylase) der DA-Biosynthese fehlt, wurde als Positivkontrolle eingesetzt, da sie Bakterien weniger gut wahrnimmt [89, 178, 179]. Die verminderte Wahrnehmung der *cat-2* Tiere ist bei einer höheren Bakteriendichte (Abb. 10c) zu sehen, bei einer niedrigeren Bakteriendichte hingegen nicht (Abb. 10d). Eine Beeinträchtigung der Futterwahrnehmung Platin-behandelter Tiere erscheint aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse unwahrscheinlich.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss der Platinbehandlung auf die Mechanosensorik überprüft. Durch die mechanosensorische Wahrnehmung sind die Nematoden in der Lage ihre Bewegungen nach lokalem Suchverhalten und Erreichen des Bakterienrasens zu verlangsamen bzw. zu stoppen [138]. Für den Versuch wurden die Vor- und Zurückbewegungen der Tiere nach Antippen gezählt [161]. Bei

der Mechanosensorik spielt der Neurotransmitter DA eine bedeutsame Rolle [178], weshalb die *cat-2* Mutante erneut als Positivkontrolle eingesetzt wurde. In Abb. 10e ist zu sehen, dass die Mechanosensorik in CisPt- und OxaliPt-behandelten Individuen, im Vergleich zu unbehandelten Tieren, unverändert ist. Nur die CarboPt-behandelten sowie die *cat-2* Nematoden zeigen eine Reduktion auf.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich das Pumpverhalten von *C. elegans* in Gegenwart von repulsiven Substanzen verringert [133]. Ein möglicher repulsiver Einfluss von CisPt als Ursache für die beobachteten hemmenden Effekte auf das Pumpverhalten konnte durch einen weiteren Chemotaxis Assay ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit generierten Daten belegen, dass die platinierenden Substanzen weder anziehend noch abstoßend auf die Nematoden wirken (Anhang Abb. 30c).

Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Exposition mit Platinanaloga keinen Einfluss auf die Morphologie sowie die Funktionalität der betrachteten Amphid- und Phasmidneurone hat. Eine verminderte Wahrnehmung der Nahrungsquelle kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

3.3 Exogenes Serotonin führt zu hyperaktiviertem Pumpverhalten in Platin-behandelten *C. elegans*

Neben *E. coli* wirkt auch 5-HT als Pumpstimulus bei elektrophysiologischen Messungen [153, 157]. Vor der Messung im ScreenChip™ System wurden die Platin-behandelten Tiere für 20 Minuten mit 10 mM 5-HT inkubiert. In Abb. 11a ist zu sehen, dass die Messung in Gegenwart von 10 mM 5-HT bereits in den Kontrolltieren zu einer höheren Pumpfrequenz führt als dies mit dem Stimulus *E. coli* erreicht werden konnte (vgl. Abb. 8a). Auch in der Literatur ist hinreichend beschrieben, dass exogenes 5-HT zu einer Erhöhung der Pumpfrequenz führt [128, 136, 157]. Erstaunlich ist jedoch, dass die CisPt-behandelten Tiere nicht mehr den zuvor beobachteten Effekt, d. h. eine reduzierte Pumpfrequenz (vgl. Abb. 8a,e), aufweisen. Die verringerte Pumpfrequenz, welche in Anwesenheit von *E. coli* nach CisPt Gabe beobachtet werden konnte, lässt sich in Gegenwart von 10 mM 5-HT nicht mehr feststellen (Abb. 11a). Aufgrund der insgesamt erhöhten Pumpfrequenz haben sich auch die Pumpdauer (Abb. 11b), das IPI (Abb. 11c) und die R/E Ratio (Abb. 11d) in allen Behandlungsgruppen verringert. Die Ergebnisse werfen die Frage auf, ob mit 10 mM 5-HT eine zu hohe Konzentration gewählt wurde, sodass aufgrund des zu starken Stimulus keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mehr zu erkennen sind.

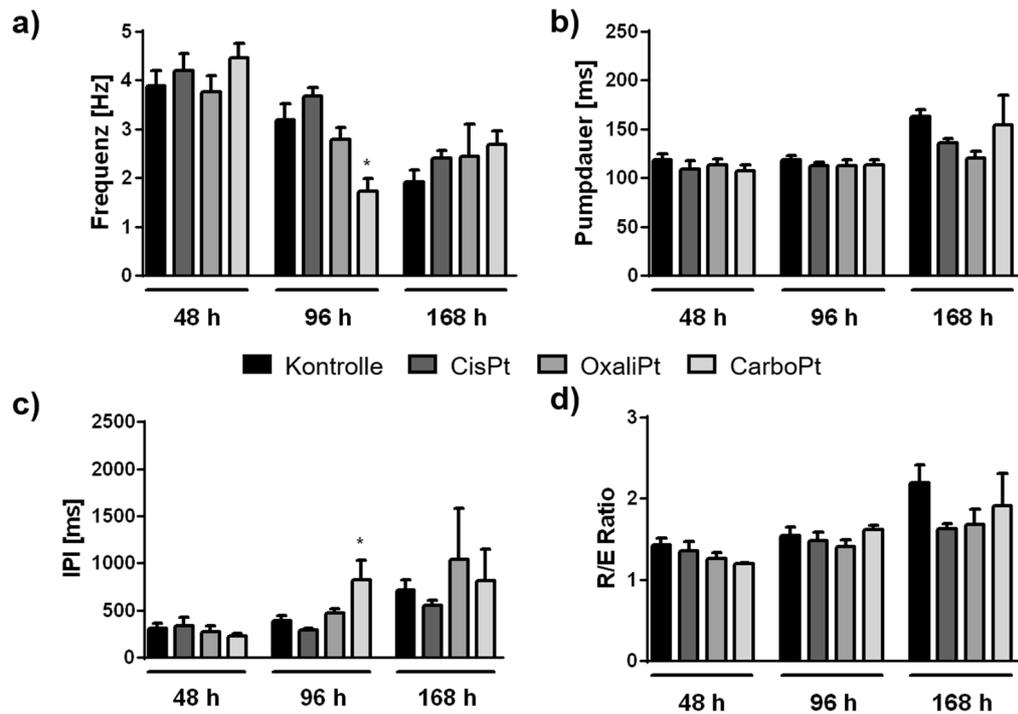


Abb. 11: Gesättigtes Pumpverhalten in Gegenwart von 10 mM Serotonin.

Messung der elektrophysiologischen Parameter a) Frequenz, b) Pumpdauer, c) IPI und d) R/E Ratio mit dem ScreenChip™ System in Gegenwart von 10 mM 5-HT. Die Messungen fanden nach 48 h, 96 h und 168 h Inkubation von N2 Tieren mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt statt. Gezeigt sind Mittelwert + SEM aus $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 29$ /Gruppe; * $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrolle (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

Aus diesem Grund wurde der Einfluss von 5-HT dosisabhängig (2, 5, 10 und 20 mM 5-HT) auf die Pumpfrequenz untersucht (Abb. 12). Zusätzlich wurde mit 20 mM 5-HT eine höhere Konzentration verwendet, um den vermuteten Sättigungseffekt ab einer Konzentration von 10 mM zu bestätigen. Ohne Stimulus (0 mM 5-HT) ist die Pumpfrequenz nahezu bei null und steigt mit zunehmender 5-HT Konzentration an (Abb. 12a). Auffällig ist, dass sich eine Verdopplung der 5-HT Konzentration ebenfalls in einer Verdopplung der Pumpfrequenz widerspiegelt (Abb. 12a). Allerdings ist ab einer Konzentration von 10 mM 5-HT ein Sättigungseffekt zu beobachten. Die Frequenz liegt hier bei ca. 3 Hz und kann durch Steigerung der 5-HT Konzentration auf 20 mM nicht weiter erhöht werden (Abb. 12a). Die Pumpdauer, das IPI und die R/E Ratio (Abb. 12b-d) bleiben ebenfalls ab 10 mM 5-HT unverändert. Damit bestätigt sich die vorab geäußerte Hypothese, dass das zuvor beobachtete Pumpverhalten der behandelten Tiere in Anwesenheit von 10 mM 5-HT (vgl. Abb. 11) auf einen Sättigungseffekt zurückzuführen ist.

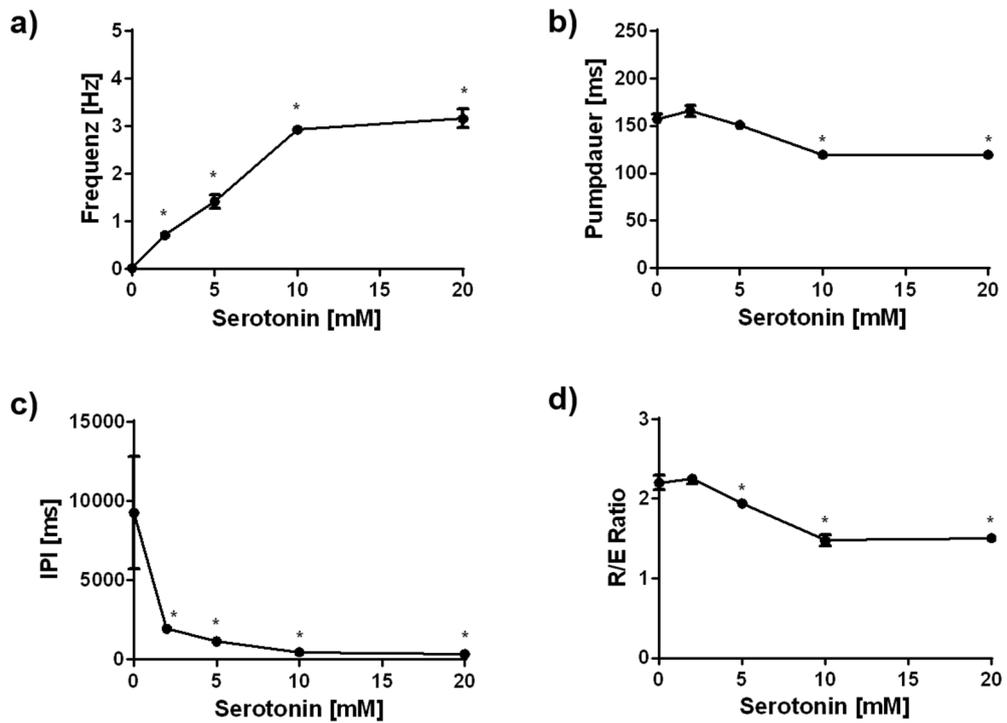


Abb. 12: Dosisabhängiger Einfluss von Serotonin auf das Pumpverhalten.

Der Einfluss von steigenden 5-HT Konzentrationen (0-20 mM) wurde mit dem ScreenChip™ System untersucht. Die Messung erfolgte mit 96 h in Kontrollmedium kultivierten N2 Tieren in Gegenwart der zuvor genannten 5-HT Konzentrationen. Aufgetragen sind verschiedene Parameter a) Frequenz, b) Pumpdauer, c) IPI und d) R/E Ratio. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM aus $n=3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 42$ /Gruppe; * $p \leq 0,05$ vs. 0 mM 5-HT (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

Basierend auf den Ergebnissen der Dosisabhängigkeit (vgl. Abb. 12) wurde eine niedrigere 5-HT Konzentration für die nachfolgenden elektrophysiologischen Messungen ausgewählt. Bei der Messung mit 5 mM 5-HT als Pumpstimulus konnte bei den Kontrolltieren nach 48 h eine vergleichbare Frequenz (Abb. 13a) festgestellt werden, die die Tiere bei der Messung mit dem Pumpstimulus *E. coli* aufwiesen (vgl. Abb. 8a). Die mit Chemotherapeutika behandelten Nematoden zeigen nach 48 h Inkubation jedoch dasselbe hyperaktivierte Pumpen, das sie bereits bei der Messung in Gegenwart von 10 mM 5-HT aufwiesen (vgl. Abb. 11). Die ursprünglich verringerte Pumpfrequenz der CisPt-behandelten Tiere (vgl. Abb. 8a) ist in Gegenwart von 5 mM 5-HT nicht mehr sichtbar (Abb. 13a). Eine Behandlung der Nematoden mit den Platinanalogia führte zu einer höheren Pumpfrequenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 13a). Dies ist für CisPt auch nach 96-stündiger Behandlung zu sehen. Generell kann hier auch wieder die altersbedingte Abnahme der Pumpfrequenz beobachtet werden. Trotzdem ist bei Platin-behandelten Tieren über einen Zeitraum von 168 h eine tendenziell erhöhte Pumpfrequenz sichtbar, verglichen zur unbehandelten Kontrollpopulation (Abb. 13a).

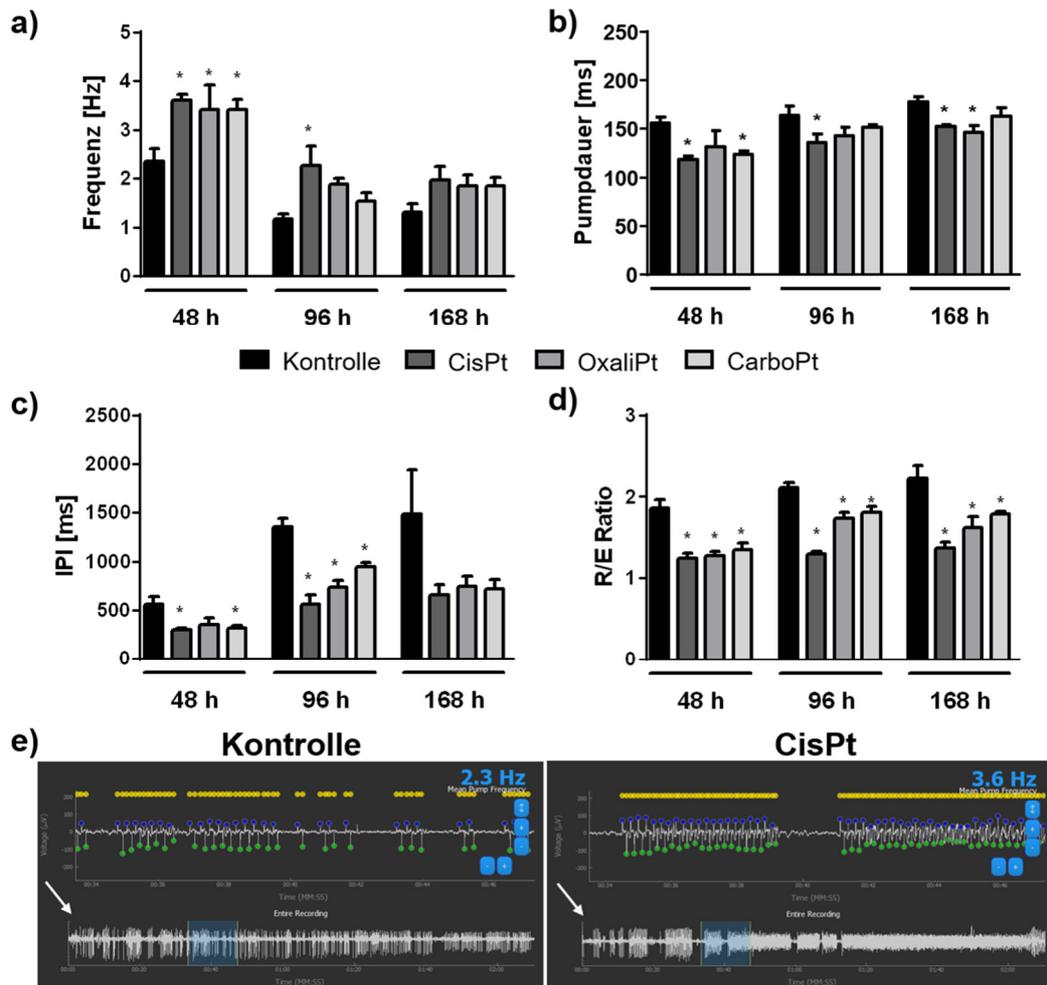


Abb. 13: Hyperaktives Pumpverhalten Platin-behandelter *C. elegans* bei Stimulation mit 5 mM Serotonin.

Elektrophysiologische Messung von N2 Nematoden nach 48 h, 96 h und 168 h Inkubation mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt. Die Messung fand mit dem ScreenChip™ System in Gegenwart des Pumpstimulus 5-HT (5 mM) statt. Die reduzierte 5-HT Konzentration ist auf die Ergebnisse der 5-HT Dosisabhängigkeit zurückzuführen (vgl. Abb. 12). In der Abbildung sind verschiedener Parameter aufgeführt. a) Pumpfrequenz, b) Pumpdauer, c) IPI und d) R/E Ratio. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM aus $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 44$ /Gruppe; * $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrolle (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). e) Zeigt repräsentative original EPGs der Kontroll- und CisPt-Gruppe nach 48 h. Die gesamte Aufnahme der EPGs ist unter *Entire Recording* (weißer Pfeil) zu sehen.

Die Pumpdauer der behandelten Tiere ist aufgrund der erhöhten Pumpfrequenz in Gegenwart von 5 mM 5-HT im Vergleich zur Kontrolle geringer (Abb. 13b), was auf eine beschleunigte Relaxation des pharyngealen Muskels durch die M3 Motorneurone hindeutet [131]. Einhergehend mit der reduzierten Frequenz und Pumpdauer ist das IPI der behandelten Tiere verkürzt (Abb. 13c). Die Kontrolltiere zeigen ein verlängertes IPI auf, verglichen zu den behandelten Tieren (Abb. 13c), welches dem verlängerten IPI der CisPt-behandelten Nematoden bei der Messung mit *E. coli* ähnelt (vgl. Abb. 8c). Die R/E Ratio der mit Platin-behandelten Tiere ist zu den gemessenen Zeitpunkten reduziert im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13d).

In Abb. 13e sind die repräsentativen EPGs der Kontrolle und der mit CisPt inkubierten Nematoden nach 48-stündiger Inkubationszeit gezeigt. In den EPGs ist der Unterschied der beiden Pumpfrequenzen sehr gut verdeutlicht. Unter „*Entire Recording*“ ist die hohe Anzahl der Pumpvorgänge zu sehen.

Die Möglichkeit, dass eine kalorische Restriktion, bedingt durch die reduzierte Pumpfrequenz und eine dadurch verminderte Aufnahme von Nahrung, zu dem hyperaktiven Pumpverhalten der CisPt-behandelten Tiere in Gegenwart von 5-HT führt, sollte mit dem nachfolgenden Experiment überprüft werden. Dazu wurden wildtypische Tiere für 24 h in *E. coli* OP50⁻¹ enthaltendem Medium inkubiert und anschließend einem 24-stündigem Nahrungsentzug unterzogen. Eine 48-stündige Hungerperiode war nicht möglich, da durch den langen Futterentzug die Larven innerhalb des Uterus des Elterntieres schlüpfen und somit eine Auswertung unmöglich machen [180]. Bei der Messung mit dem ScreenChip™ System in Gegenwart von *E. coli* zeigten die gehungerten Tiere im Vergleich zur Kontrolle ein verstärktes Pumpverhalten und eine verdoppelte Frequenz auf (Anhang Abb. 31a). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Literatur [181]. Die Pumpdauer, das IPI sowie die R/E Ratio sind reduziert im Vergleich zur Kontrolle und der CisPt-behandelten Tiere (Anhang Abb. 31a). Dies spricht für einen beschleunigten Pumpvorgang und eine erhöhte Pharynxaktivität [128]. Bei der Messung in Gegenwart von 5 mM 5-HT zeigt sich ebenfalls ein erhöhtes Pumpverhalten der gehungerten Tiere als bei den Kontrolltieren (Anhang Abb. 31b). Auch die Pumpdauer ist bei den gehungerten Nematoden erhöht, verglichen zur Kontrolle und zur CisPt-Gruppe. Dahingegen unterscheiden sich das IPI und die R/E Ratio der gehungerten und CisPt-behandelten Tiere nicht (Anhang Abb. 31b). Jedoch pumpen die CisPt-behandelten Nematoden in Gegenwart von 5-HT mehr als die gehungerten Tiere (Anhang Abb. 31b). Dies lässt eine kalorische Restriktion als Grund für das hyperaktive Pumpverhalten, welches die CisPt behandelten Tiere in Gegenwart von 5 mM 5-HT aufweisen, weitestgehend ausschließen.

Eine Behandlung mit platinierenden Substanzen führt offensichtlich zu einer Sensibilisierung der Nematoden gegenüber 5-HT. Die Erhöhung der Pumpaktivität durch 5-HT ist nur möglich, wenn die beim Pumpvorgang beteiligten M3 und MC Motorneurone funktionsfähig sind [128]. Aus diesem Grund kann ausgeschlossen werden, dass die eingesetzten Platinanaloga die Funktionalität der zuvor genannten Neurone schädigt. Deshalb wurde in nachfolgenden Versuchen der Einfluss der Platinanaloga auf die serotonerge Neurotransmission untersucht, welche neben den Motorneuronen unerlässlich für die Pumpaktivität ist [151].

3.4 Serotonin mindert die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans*

Durch Absenken der 5-HT Konzentration während der Messung im ScreenChip™ System sollte überprüft werden, ob die behandelten Tiere bei geringerer 5-HT Konzentration mit einer vergleichbaren Frequenz wie die Kontrollpopulation bei 5 mM 5-HT pumpen. Unter Berücksichtigung der 5-HT Konzentrationsreihe (vgl. Abb. 12) wurden für die Messung 2 mM 5-HT eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die Pumpfrequenz der Platin-behandelten Tiere in Gegenwart von 2 mM 5-HT (Abb. 14a) der Frequenz der Kontrolle bei 5 mM 5-HT entspricht (vgl. Abb. 13a). Zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ist kein Unterschied bei der Pumpfrequenz zu sehen (Abb. 14a).

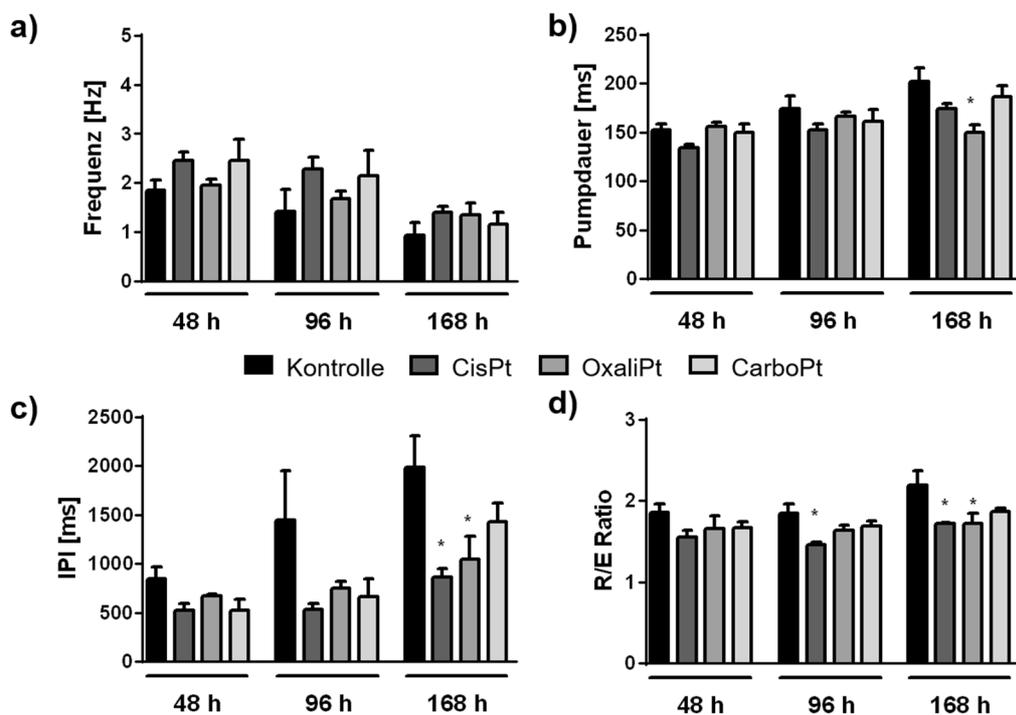


Abb. 14: Der Cisplatin-induzierten Reduzierung der Pumpfrequenz kann durch 2 mM Serotonin entgegengewirkt werden.

Elektrophysiologische Messung von N2 Individuen nach 48 h, 96 h und 168 h Inkubation mit 100 µM CisPt, 300 µM OxaliPt und 1 mM CarboPt im ScreenChip™ System mit 2 mM 5-HT. In der Abbildung sind die Ergebnisse verschiedener Parameter dargestellt. a) Pumpfrequenz, b) Pumpdauer, c) IPI und d) R/E Ratio. Zu sehen sind Mittelwerte + SEM aus n≥3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt N≥43/Gruppe; *p<0,05 vs. jeweilige Kontrolle (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

Auch die Pumpdauer ist in allen Gruppen unverändert (Abb. 14b). Ein erhöhtes IPI ist lediglich zum späteren Versuchszeitpunkt (168 h) bei CisPt und OxaliPt behandelten Tieren zu beobachten (Abb. 14c). Die R/E Ratio ist nach 48-stündiger Behandlung mit den Platinderivaten unverändert, jedoch kann nach 96 h und 168 h eine reduzierte R/E Ratio bei der CisPt Gruppe beobachtet werden (Abb. 14d). Aufgrund der

vergleichbaren Ergebnisse der gemessenen Parameter der unbehandelten und der behandelten Tiere kann die Hypothese aufgestellt werden, dass 5-HT in Konzentration von 2 mM notwendig ist, um die Pumpaktivität in CisPt-behandelten Tieren aufrechtzuerhalten.

Der Fokus der nachfolgenden Untersuchungen bezog sich auf eine Inkubationszeit von 48 h, da zu diesem Zeitpunkt das hypersensitive Pumpverhalten in Gegenwart von 5 mM 5-HT (vgl. Abb. 13) am stärksten ausgeprägt war. Des Weiteren wurden die Versuche nur noch mit CisPt durchgeführt, da mit diesem Chemotherapeutikum Unterschiede im Pumpverhalten während der Messung mit *E. coli* OP50⁻¹ beobachtet werden konnten (vgl. Abb. 8). Die Festlegung beruht zudem darauf, dass CisPt im Vergleich zu Oxali- und CarboPt neurotoxischer ist, sowohl in der Klinik [10, 182], in vorherigen *C. elegans* Studien [147] als auch im Rahmen dieser Arbeit (vgl. Abb. 8).

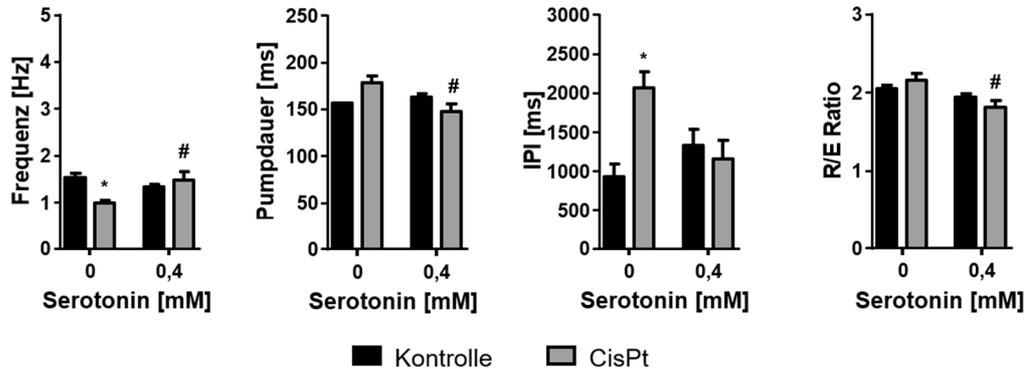
Basierend auf der zuvor genannten Arbeitshypothese, dass den CisPt-behandelten Tieren möglicherweise 5-HT für eine suffiziente Neurotransmission und damit einen effizienten Pumpprozess fehlt, wurde eine Co-Inkubation von CisPt mit 2 mM 5-HT durchgeführt. Während der 48-stündigen Co-Behandlung mit 2 mM 5-HT zeigte sich jedoch ein negativer Einfluss auf den Phänotyp der Nematoden. Die Individuen aller behandelten Gruppen waren deutlich kleiner als alterssynchrone und unbehandelte Tiere (Daten nicht gezeigt). In einem darauffolgenden Versuch wurde die Anatomie der Kontroll- und CisPt-Tiere, nach einer 48-stündigen Co-Inkubation mit verschiedenen 5-HT Konzentrationen (0,1-1,6 mM), qualitativ untersucht (Anhang Abb. 32a). Die Inkubation mit 0,4 mM 5-HT hatte keine morphologische Veränderung zur Folge (Anhang Abb. 32a), weshalb diese Konzentration für die weiteren Co-Inkubationsversuche mit CisPt ausgewählt wurde.

Eine Co-Inkubation mit 0,4 mM 5-HT und CisPt führte dazu, dass CisPt den inhibierenden Effekt auf die Pumpfrequenz in Anwesenheit von *E. coli* verliert (Abb. 15a). Die Pumpdauer und die R/E Ratio sind niedriger, wenn CisPt-behandelte Tiere mit 0,4 mM 5-HT co-inkubiert wurden, im Vergleich zu den nur mit CisPt behandelten Tieren (Abb. 15a). Die Platin-behandelten Nematoden weisen ein verlängertes IPI auf, welches bei Co-Inkubation mit 0,4 mM 5-HT nicht feststellbar ist (Abb. 15a). Demnach ist die eingesetzte 5-HT Konzentration ausreichend, um die CisPt-induzierte Abnahme der Pumpfrequenz zu verhindern.

Der beobachtete neuroprotektive Effekt von 0,4 mM 5-HT könnte auch auf eine reduzierte zytotoxische Aktivität des CisPt zurückzuführen sein, die durch die Co-Inkubation mit 5-HT vermittelt wurde. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass CisPt in *C. elegans* aufgenommen wird, Addukte mit der DNA ausbildet und zur Apoptose führt [147]. Deshalb wurde überprüft, ob sich nach einer 48-stündigen Co-Inkubation

mit CisPt und 5-HT (0,4 und 2 mM) die Zahl der durch CisPt Behandlung induzierten apoptotischen Körper in der Gonade verringert. Mit dem Versuch konnte gezeigt werden, dass eine Co-Inkubation mit 5-HT keinen Einfluss auf die CisPt-induzierte Apoptose hat (Anhang Abb. 32b).

a) OP50-1



b) 5 mM 5-HT

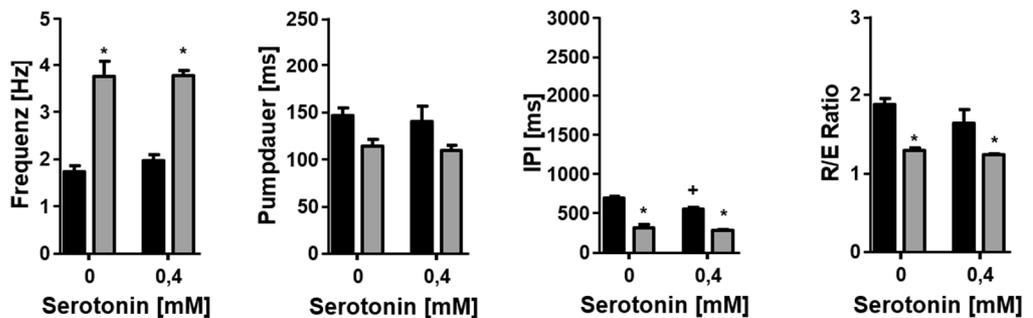


Abb. 15: Co-Inkubation mit 0,4 mM Serotonin verhindert die Cisplatin-induzierte Abnahme der Pumpfrequenz.

Überprüfung der Pharynxaktivität nach 48-stündiger Co-Inkubation von N2 Nematoden mit Kontroll- oder 100 µM CisPt-enthaltendem Medium mit 0,4 mM 5-HT. Die Messung wurde mit dem ScreenChip™ System ausgeführt und für diesen Zweck verschiedene Pumpstimuli (*E. coli* und 5 mM 5-HT) eingesetzt. a) Messung in Gegenwart von *E. coli* OP50⁻¹ (OD₆₀₀=0,9). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM aus n=3 unabhängigen Versuchen mit N≥43; *p≤0,05 vs. jeweilige Kontrolle; #p≤0,05 vs. CisPt + 0 mM 5-HT (One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test). b) Messung in Gegenwart von 5 mM 5-HT. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM aus n=3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt N≥45/Gruppe; *p≤0,05 vs. jeweilige Kontrolle; #p≤0,05 vs. CisPt + 0 mM 5-HT; +p≤0,05 vs. Kontrolle + 0 mM 5-HT (One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test).

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob ein Fehlen von 5-HT während des Pumpvorgangs ursächlich für das hyperaktive Verhalten ist, welches die mit CisPt inkubierten Tiere bei der Messung in Gegenwart von 5 mM 5-HT (vgl. Abb. 13a) zeigten. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen in Anwesenheit des Pumpstimulus 5 mM 5-HT nach Co-Inkubation mit 0,4 mM 5-HT sind in Abb. 15b zusammengestellt. Bei der Betrachtung der Pumpfrequenz ist sowohl bei den CisPt-behandelten Tieren die charakteristische hyperaktivierte Pumpfrequenz zu beobachten, als auch in der CisPt + 0,4 mM co-inkubierten Population (Abb. 15b).

Die Pumpdauer ist in allen Gruppen unverändert (Abb. 15b). Das IPI bei den Kontroll + 0,4 mM 5-HT Tieren ist im Vergleich zur basalen Kontrolle niedriger, bei gleichbleibender Frequenz (Abb. 15b). Auch die CisPt und CisPt + 0,4 mM 5-HT Tiere weisen ein niedrigeres IPI auf als die jeweilige Kontrolle. Die R/E Ratio der Kontrolle und Kontroll + 0,4 mM 5-HT sowie der CisPt und CisPt + 0,4 mM 5-HT Tiere ist unverändert. Jedoch unterscheidet sich die Ratio zwischen Kontrolle und CisPt sowie Kontrolle + 0,4 mM 5-HT und CisPt + 0,4 mM 5-HT deutlich (Abb. 15b).

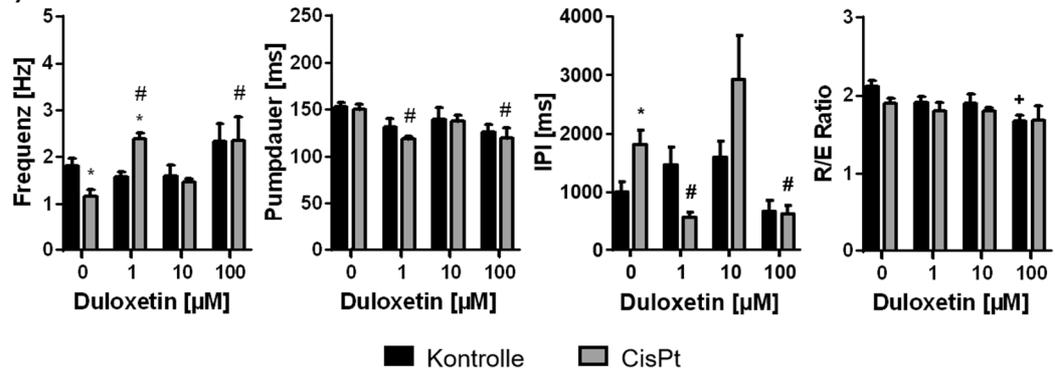
Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, kann eine Supplementation mit 0,4 mM 5-HT die neurotoxische Wirkung von CisPt auf *C. elegans* kompensieren ohne die Zytotoxizität von CisPt zu beeinflussen. Dem überkompensatorischen Phänotyp in Gegenwart von 5 mM 5-HT konnte eine Co-Inkubation mit 0,4 mM 5-HT nicht entgegenwirken. Eine chronische Depletion von endogen gebildetem 5-HT führt zu einem verminderten Pumpverhalten [136, 183], welches durch Ergänzung von 5 mM 5-HT im Kulturmedium revertiert werden kann [136]. Eine unzureichende serotonerge Neurotransmission in CisPt-inkubierten Tieren kann als Ursache der verminderten Pumpaktivität in Gegenwart von *E. coli* also angenommen werden.

3.5 Neurprotektive Wirkung des SSNRI Duloxetin® in *C. elegans*

Es konnte gezeigt werden, dass eine Co-Inkubation mit 5-HT einen positiven Einfluss auf das Pumpverhalten CisPt-behandelter Tiere hat (vgl. Abb. 15). Aus diesem Grund sollte die Neuroprotektion unter Verwendung eines humanrelevanten Medikaments untersucht werden, welches bereits klinisch gegen diabetische Neuropathie und CIPN eingesetzt wird [58, 61]. Bei diesem Medikament handelt es sich um den SSNRI Duloxetin®, der durch die Blockierung des 5-HT Wiederaufnahmetransporters eine verlängerte Wirksamkeit des 5-HT im synaptischen Spalt ermöglicht [184]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Dulox ebenfalls neuroprotektive Effekte nach CisPt Behandlung in *C. elegans* zeigt. Die Wirksamkeit von Dulox wurde dosisabhängig (1-100 µM) nach 48-stündiger Co-Inkubation mit CisPt im ScreenChip™ System untersucht. Bei der Messung in Gegenwart von *E. coli* zeigte sich, dass der CisPt-induzierten Reduktion der Pumpfrequenz durch Dulox entgegengewirkt werden konnte (Abb. 16a). Bereits die niedrigste Dulox Konzentration (1 µM) ist neuroprotektiv. Darüber hinaus ist eine Überkompensation mit 1 µM Dulox zu beobachten (Abb. 16a), die dem hyperaktiven Pumpverhalten ähnelt, das bei den Messungen mit 5 mM 5-HT festgestellt wurde (vgl. Abb. 13a). Bei höheren Dulox Konzentrationen (≥10 µM) blieb dieser Effekt jedoch aus (Abb. 16a). Die Pumpfrequenz der CisPt-behandelten Tiere, welche mit 100 µM Dulox co-inkubiert wurden, erhöht sich nicht weiter, verglichen mit 1 µM Dulox (Abb. 16a). Die Pumpdauer und das IPI erniedrigen sich bei den mit 1 oder 100 µM Dulox

co-inkubierten CisPt Tieren (Abb. 16 a). Die R/E Ratio ist bei allen Gruppen nahezu unverändert (Abb. 16a).

a) OP50-1



b) 5 mM 5-HT

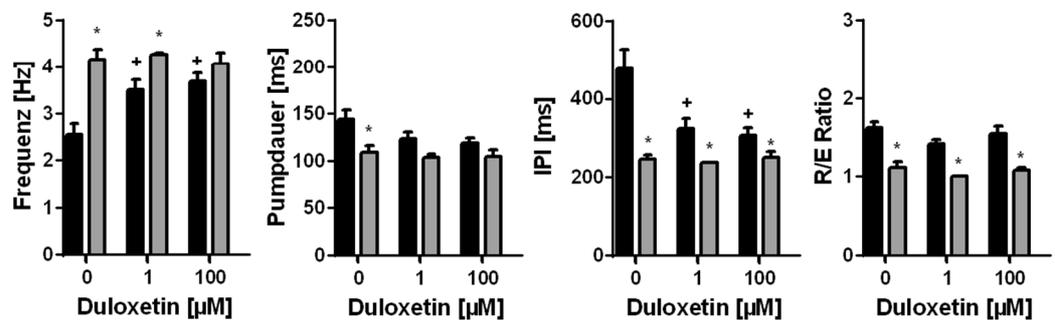


Abb. 16: Co-Inkubation mit Duloxetine® verhindert die Cisplatin-induzierte Abnahme der Pumpfrequenz.

Messung des pharyngealen Pumpverhaltens im ScreenChip™ System nach 48-stündiger Co-Inkubation von N2 *C. elegans* mit Kontroll- oder CisPt-enthaltendem Medium mit verschiedenen Konzentrationen des SSNRI Dulox (1-100 µM). a) Messung in Gegenwart von *E. coli* OP50-1 (OD₆₀₀=0,9). Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM aus n≥3 unabhängigen Versuchen mit N≥35; *p≤0,05 vs. jeweilige Kontrolle; #p≤0,05 vs. CisPt + 0 µM Dulox; +p≤0,05 vs. Kontrolle + 0 µM Dulox (One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test). b) Messung in Gegenwart von 5 mM 5-HT. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM aus n=3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt N≥45/Gruppe; *p≤0,05 vs. jeweilige Kontrolle; #p≤0,05 vs. CisPt + 0 µM Dulox; +p≤0,05 vs. Kontrolle + 0 µM Dulox (One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test).

Eine Co-Inkubation mit 1 und 100 µM Dulox zeigte bei den Messungen in Gegenwart von *E. coli* die stärksten Effekte (Abb. 16a). Deswegen wurden diese Konzentrationen auch für die Messungen in Gegenwart von 5 mM 5-HT als Pumpstimulus eingesetzt. Der Unterschied bei behandelten und unbehandelten Tieren bei Co-Inkubation mit 1 µM Dulox ist weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu den unbehandelten und behandelten Tieren ohne Dulox (Abb. 16b). Die Angleichung der Pumpfrequenzen bei den höheren Dulox-Konzentrationen (≥10 µM) in behandelten und unbehandelten Tieren ist auf einen Anstieg der Pumpfrequenz der Kontrolle (Abb. 16b) zurückzuführen. Die Frequenz ist in den CisPt-Gruppen unverändert bei ca. 4 Hz.

Auch die Pumpdauer, das IPI und die R/E Ratio der co-inkubierten CisPt-Gruppen unterscheiden sich nicht zur CisPt + 0 μ M Dulox Gruppe (Abb. 16b).

Die Ergebnisse belegen somit, dass eine neuroprotektive Aktivität von Dulox ebenfalls in *C. elegans* beobachtet werden kann. Die Annahme, dass CisPt die serotonerge Neurotransmission stört, wird durch das Ergebnis der neuroprotektiven Wirksamkeit einer Dulox Co-Inkubation weiter gefestigt. Zur weiteren Analyse der hierbei beteiligten molekularen Mechanismen sollte der Einfluss von CisPt nachfolgend auf die 5-HT-Biosynthese, 5-HT-Rezeptoren und den 5-HT Wiederaufnahmetransporter untersucht werden.

3.6 Serotonerge Mechanismen (SER-7) sind in der Cisplatin-induzierten Schädigung des Pumpverhaltens involviert

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass 5-HT-abhängige Mechanismen durch CisPt beeinträchtigt werden und dies in einer eingeschränkten pharyngealen Neurotransmission resultiert. Um die Frage zu beantworten inwieweit 5-HT-regulierte Mechanismen bei den neurotoxischen Effekten von CisPt auf die Pharynxaktivität involviert sind, sollte der Einfluss von CisPt in 5-HT Mutanten untersucht werden. Die zuvor beobachtete Sensitivität der CisPt-behandelten Nematoden gegenüber 5-HT erlaubt vier mögliche Einflussmöglichkeiten des CisPt auf serotonerge Mechanismen. So könnten die 5-HT-Biosynthese, die 5-HT-Rezeptor Synthese oder die Bindung von 5-HT an 5-HT-Rezeptoren, die nachgeschaltete Signalweiterleitung von 5-HT Rezeptoren sowie die 5-HT-Freisetzung durch CisPt gestört werden bzw. eine Kombination verschiedener dieser Aspekte. Um die ersten beiden Möglichkeiten zu adressieren, wurden 5-HT Mutanten eingesetzt, die Defekte in der 5-HT-Biosynthese aufweisen, denen funktionelle 5-HT-Rezeptoren oder 5-HT Wiederaufnahmetransporter fehlen.

Ob CisPt einen Einfluss auf die 5-HT-Biosynthese hat, sollte mit der *tph-1* Mutante überprüft werden, welcher das erste Enzym der Biosynthese fehlt (Tryptophan Hydroxylase, Abb. 17a,b) [183, 185].

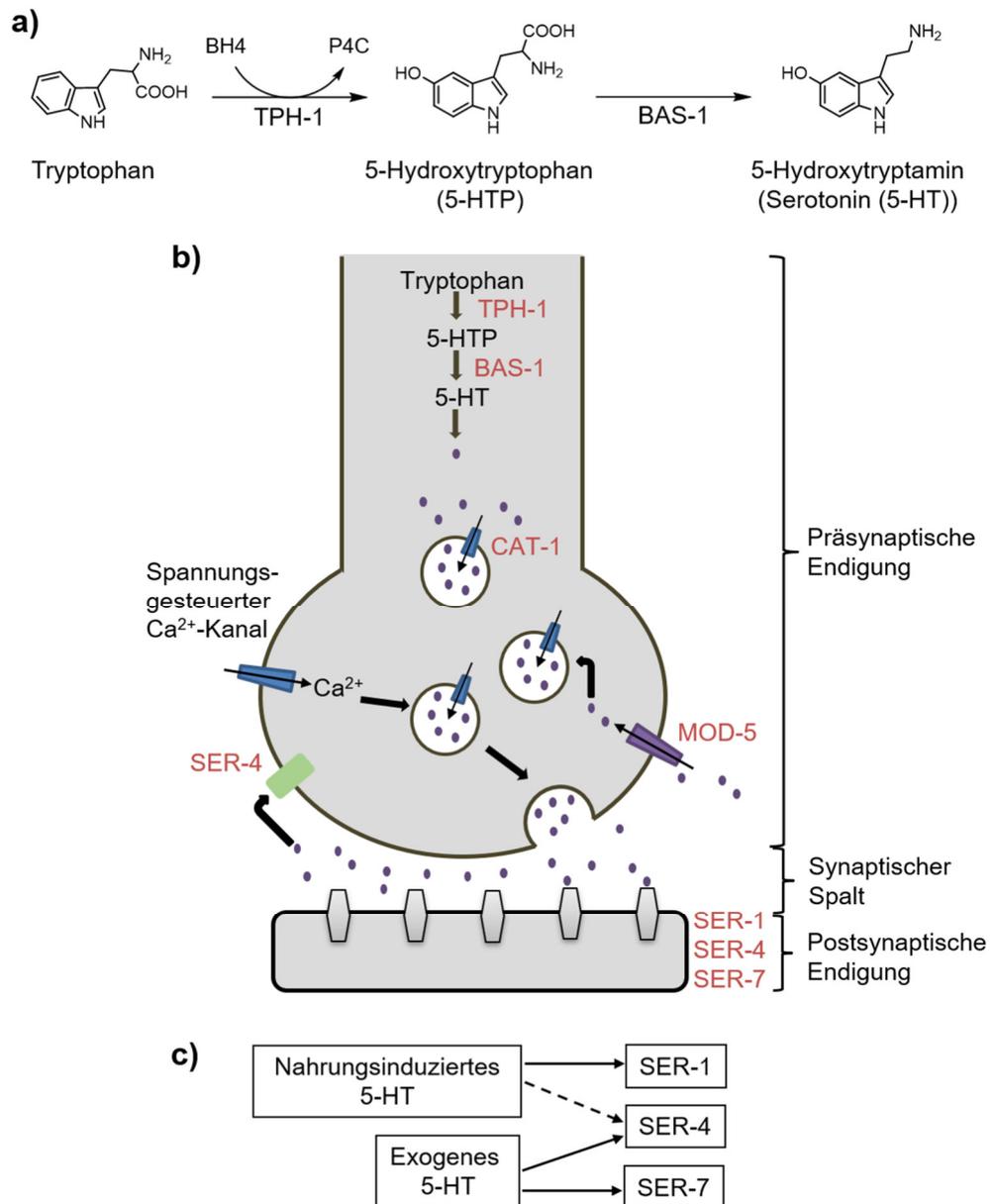


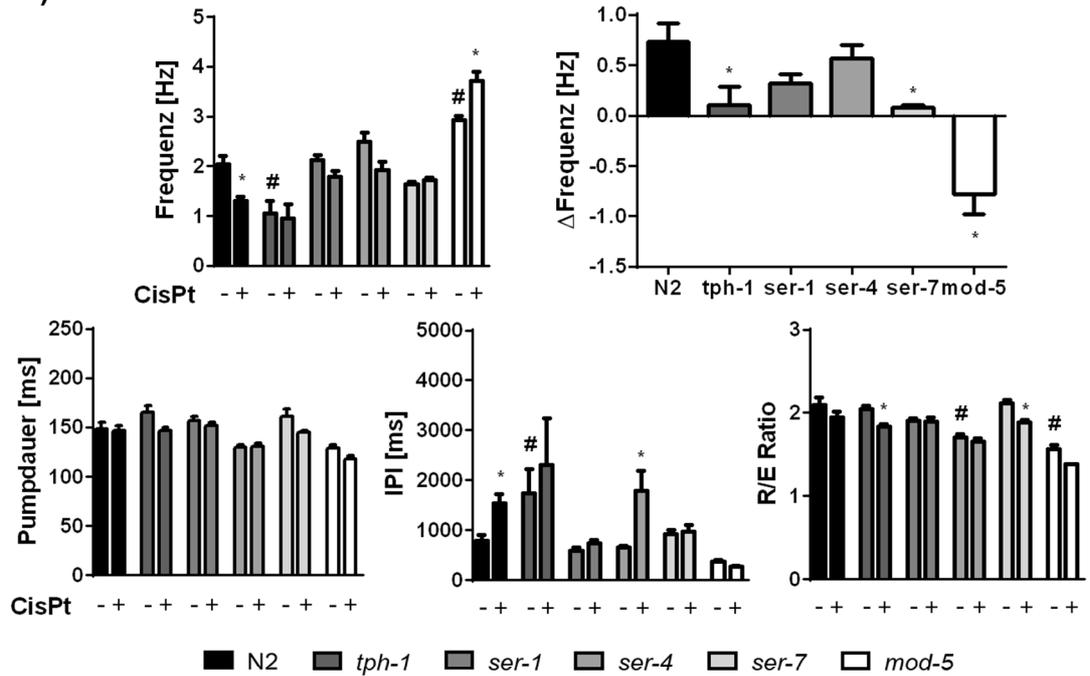
Abb. 17: Serotoninsynthese und serotonerge Neurotransmission.

a) Bei der 5-HT-Biosynthese katalysiert das Enzym Tryptophan Hydroxylase (TPH-1) den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu 5-HTP. An der Bildung des Co-Faktors BH4 (Tetrahydrobiopterin) ist der Transkriptionsfaktor CAT-4 beteiligt. Die aromatische L-Aminosäure Decarboxylase (BAS-1) ist bei der Umsetzung von 5-HTP zu 5-HT involviert. b) Serotonerge Neurotransmission an der Synapse. 5-HT wird durch die Enzyme, beschrieben in a), gebildet, durch CAT-1 (vesikulärer Monoamin-Transporter) in Vesikel verpackt und durch Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort bindet 5-HT an die spezifischen 5-HT-Rezeptoren (SER-1, SER-4 und SER-7) der postsynaptischen Endigung, um das Aktionspotential weiterzuleiten. Durch den 5-HT Wiederaufnahmetransporter MOD-5 gelangt 5-HT aus dem synaptischen Spalt zurück in die präsynaptische Endigung und kann dort wieder in synaptische Vesikel verpackt werden. (Eigene Darstellung angelehnt an [186]). c) Übersicht der 5-HT-Rezeptoren und deren spezifische Rolle beim Pumpvorgang. SER-1 ist beim futter-induzierten Pumpen beteiligt und wird dabei von SER-4 unterstützt. Die Stimulation des Pumpens durch exogenes 5-HT wird von SER-7 und SER-4 reguliert. (Eigene Darstellung angelehnt an [136]).

TPH-1 katalysiert die Umwandlung von Tryptophan in 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), welches in einem zweiten Schritt durch die aromatische L-Aminosäure Decarboxylase (BAS-1) zu 5-HT katalysiert wird (Abb. 17a,b) [185, 187]. CAT-4 (GTP-Cyclohydrolase I) fungiert als Transkriptionsfaktor für TPH-1 [185, 188]. Die *bas-1* und *cat-4* Mutanten wurden für die Untersuchung des Einflusses auf die 5-HT-Biosynthese nicht ausgewählt, da BAS-1 und CAT-4 nicht selektiv für die 5-HT-Biosynthese sind [185, 187]. Das Fehlen von *tph-1* führt dazu, dass der Mutante endogen gebildetes 5-HT fehlt [183]. Des Weiteren wurden Rezeptormutanten eingesetzt, um den Einfluss der entsprechenden Rezeptoren auf das hyperaktive Pumpen (vgl. Abb. 13, Abb. 15b und Abb. 16b) zu überprüfen. Die 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptoren SER-4 bzw. SER-1 sind für die nahrungsabhängige Stimulation [136] und der 5-HT₇-Rezeptor SER-7, welcher u. a. in den Motoneuronen (MC und M3) des Pharynx exprimiert wird [141], für die 5-HT-induzierte Erhöhung der pharyngealen Pumpfrequenz (Abb. 17b,c) erforderlich [136, 141]. Zudem wurde das Verhalten der *mod-5* Mutante nach CisPt Behandlung untersucht. Durch das Fehlen des 5-HT Wiederaufnahmetransporters MOD-5 wird mehr 5-HT im synaptischen Spalt akkumuliert (Abb. 17b) [189], wodurch 5-HT länger wirken kann. Die Auswirkungen der Mutation in *mod-5* sind also vergleichbar mit der Wirkung von SSNRI, wie z.B. Dulox [184].

In Abb. 18 sind die Ergebnisse der ScreenChip™ System Messungen mit den zuvor beschriebenen Mutanten dargestellt. Die Pumpfrequenz der unbehandelten Tiere der SER-Rezeptormutanten ist dabei übereinstimmend mit der wildtypischen Frequenz. Die Behandlung der *ser-1* und *ser-4* Mutanten mit CisPt führte zu einem ähnlichen Verlauf, den auch der Wildtyp nach CisPt Exposition aufweist (Abb. 18a). Lediglich die *ser-7* Mutante offenbart nach CisPt Behandlung keine Verringerung der Pumpfrequenz, verglichen zur *ser-7* Kontrolle (Abb. 18a). Im Gegensatz dazu ist die Pumprate der unbehandelten *tph-1* Mutante deutlich niedriger als die des unbehandelten Wildtyps und mit der des CisPt-behandelten Wildtyps vergleichbar (Abb. 18a). Die niedrigere basale Pumpfrequenz der *tph-1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp stimmt mit elektrophysiologischen Studien anderer Arbeitsgruppen überein [136, 167]. Die verminderte basale Pumpfrequenz der *tph-1* Mutante kann nicht durch eine verringerte Futterwahrnehmung begründet werden (Anhang Abb. 33). Dadurch, dass die basale Pumpfrequenz der *tph-1* Mutante bereits so niedrig ist, hat die Behandlung mit CisPt keinen weiteren inhibitorischen Einfluss auf die Frequenz. Bei der *mod-5* Mutante zeigt sich dagegen ein ganz anderes Bild. Hier erhöht die Behandlung mit CisPt die Frequenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, welche allerdings auch deutlich über der wildtypischen Frequenz liegt (Abb. 18a).

a) OP50-1



b) 5 mM 5-HT

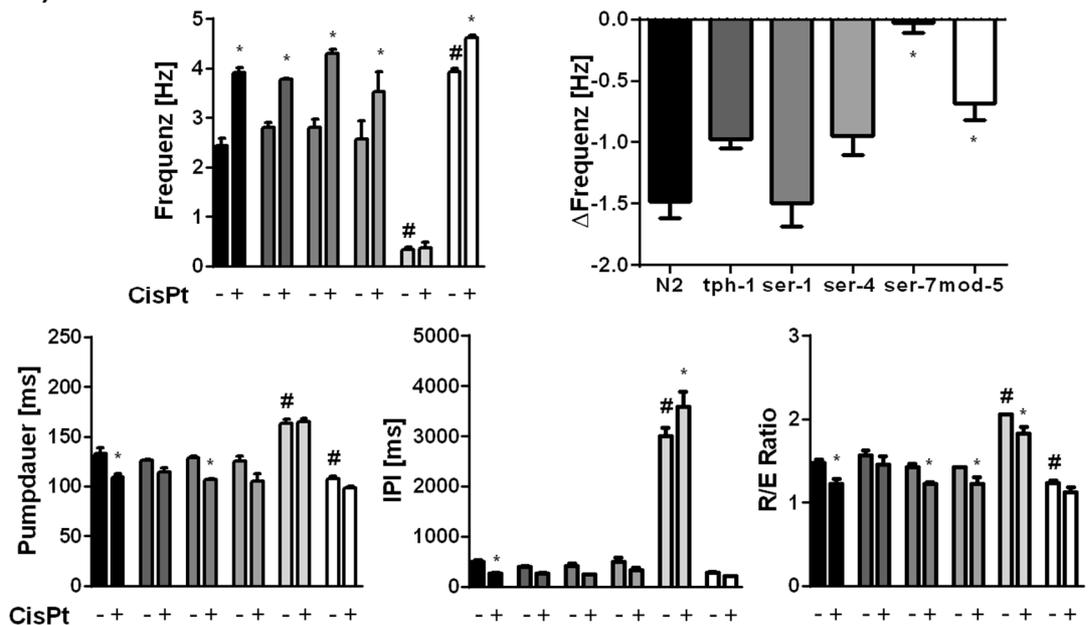


Abb. 18: Cisplatin interveniert mit Serotonin-assoziierten Mechanismen der Neurotransmission.

Die Messung der Pharynxaktivität von N2, *tph-1*, *ser-1*, *ser-4*, *ser-7* und *mod-5* Mutanten erfolgte, nach 48-stündiger Inkubation mit 100 μ M CisPt, mit dem ScreenChip™ System in Gegenwart von *E. coli* und 5-HT. Dargestellt sind die Pumpfrequenz, die Deltafrequenz (Frequenz Kontrolle – Frequenz CisPt), die Pumpdauer, das IPI und die R/E Ratio. a) *E. coli* OP50-1 (OD₆₀₀=0,9). Gezeigt sind Mittelwert + SEM aus n \geq 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt N \geq 42/Gruppe. (*p \leq 0,05 vs. jeweilige Kontrolle und #p \leq 0,05 vs. N2 Kontrolle mit One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). b) 5 mM 5-HT. Aufgetragen sind Mittelwert + SEM aus n \geq 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt N \geq 36/Gruppe. (*p \leq 0,05 vs. jeweilige Kontrolle und #p \leq 0,05 vs. N2 Kontrolle mit One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

Die Pumpdauer bleibt in allen untersuchten Gruppen unverändert (Abb. 18a). Das IPI des behandelten Wildtyps ist verlängert (Abb. 18a), wie es aus den Resultaten des vorherigen Versuchs bereits zu beobachten war (vgl. Abb. 8c). Zusätzlich ist das IPI der *ser-4* Mutante nach CisPt Behandlung erhöht, verglichen zur unbehandelten *ser-4* Kontrolle und die *tph-1* Mutante besitzt ein verlängertes IPI im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle (Abb. 18a). Die R/E Ratio verringert sich, wenn die *tph-1* und *ser-7* Mutanten mit CisPt behandelt wurden. Gegenüber der wildtypischen Kontrolle weisen die *ser-4* und *mod-5* Mutanten eine verringerte R/E Ratio auf (Abb. 18a).

Bei der Verwendung von 5 mM 5-HT als Pumpstimulus ist bei allen Gruppen ein einheitliches Verhalten zu beobachten. Alle *C. elegans* Stämme, die mit CisPt behandelt wurden, weisen ein hyperaktives Pumpen auf (Abb. 18b). Nur bei der *ser-7* Mutante zeichnet sich eine andere Reaktion nach CisPt-Inkubation ab (Abb. 18b). Zwischen unbehandelter und CisPt-behandelter *ser-7* Mutante ist kein Unterschied bei der Pumpfrequenz nachzuweisen (Abb. 18b). Die *ser-7* Mutante zeigt bereits unter basalen Bedingungen eine deutlich niedrigere Frequenz als der Wildtyp (Abb. 18b). Der Unterschied in der Pumpfrequenz verringert sich zwischen den CisPt-behandelten und unbehandelten *mod-5* Tieren in Gegenwart von 5 mM 5-HT (Abb. 18b). Die CisPt-Reaktion der *mod-5* Mutante ähnelt somit den überkompensatorischen Effekten, die beim Wildtyp nach CisPt Behandlung in Gegenwart von 5 mM 5-HT beobachtet wurden (vgl. Abb. 13a, Abb. 15b, Abb. 16b). Die Pumpdauer zwischen Kontrolltieren und CisPt-behandelten Tieren ist beim Wildtyp und bei der *ser-1* Mutante reduziert (Abb. 18b). Bei *ser-7* und *mod-5* Kontrolltieren ist diese im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle erhöht bzw. reduziert. Das IPI zwischen Kontrolle und CisPt der wildtypischen und *ser-7* Tiere ist verringert (Abb. 18b). Auffällig ist auch hier wieder, dass die *ser-7* Mutante bereits basal ein reduziertes IPI im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Alle Stämme, die mit CisPt behandelt wurden, zeigen ein reduziertes R/E Verhältnis, außer die *mod-5* Mutante. Basal haben die *ser-7* und die *mod-5* Mutante eine erhöhte bzw. eine erniedrigte Ratio, verglichen zum Wildtyp (Abb. 18b).

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass eine beeinträchtigte serotonerge Neurotransmission ursächlich für die CisPt-induzierte Neurotoxizität ist. Des Weiteren scheinen insbesondere SER-7-regulierte Mechanismen für die CisPt-induzierte Schädigung der pharyngealen Neurotransmission von großer Bedeutung zu sein.

3.7 Cisplatin führt zu einer erhöhten mRNA Expression von *cat-4*

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Veränderungen der Expression von Genen, deren Genprodukte mit der 5-HT Signaltransmission im Zusammenhang stehen, zur CisPt-vermittelten Schädigung der pharyngealen Neurotransmission beitragen. Eine Übersicht der überprüften Gene ist in Tab. 13 im Anhang zusammengestellt. Eine 48-stündige Inkubation mit CisPt hatte keinen Einfluss auf die mRNA Expression der 5-HT-Biosynthese Enzyme *tph-1* und *bas-1*, führte jedoch zu einer leicht erhöhten Expression von *cat-4* (Abb. 19a). Bei *cat-4* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher im ersten Schritt der Biosynthese von 5-HT und DA involviert ist [185]. Ein Einfluss von CisPt auf die Expression von *mod-1* (5-HT-gesteuerter Chlorid-Kanal) und dem 5-HT Wiederaufnahmetransporter *mod-5* konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 19a). Auch die Genexpressionen der 5-HT-Rezeptoren *ser-1*, *ser-4*, *ser-5* und *ser-7* sind nach CisPt Behandlung unverändert (Abb. 19a). Ebenso ist die mRNA Expression des vesikulären Transporters *cat-1*, welcher für den Transport von 5-HT und DA in synaptische Vesikel verantwortlich ist [190], unverändert durch die Behandlung (Abb. 19)

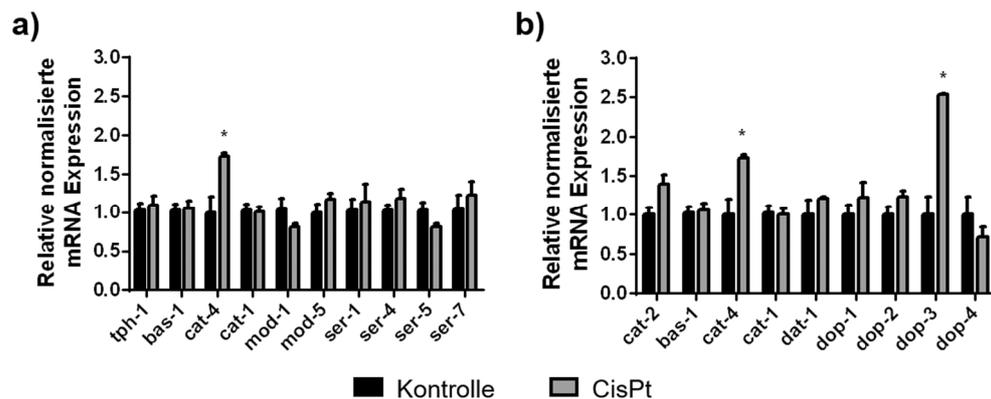


Abb. 19: Die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors *cat-4* ist nach Cisplatin Behandlung erhöht.

In der Abbildung ist die relative normalisierte mRNA Expression von Genen, die an der Regulation der Neurotransmitteraktivität von 5-HT und DA beteiligt sind, dargestellt. Die Inkubation von N2 Tieren erfolgte 48 h mit 0 und 100 μ M CisPt. a) Serotonin: Biosynthese (*tph-1*, *bas-1*, *cat-4*), vesikulärer Transporter (*cat-1*), 5-HT-gesteuerter Chlorid-Kanal (*mod-1*), Wiederaufnahmetransporter (*mod-5*) und Rezeptoren (*ser-1*, *ser-4*, *ser-5* und *ser-7*). b) Dopamin: Biosynthese (*cat-2*, *bas-1*, *cat-4*), vesikulärer Transporter (*cat-1*), Wiederaufnahmetransporter (*dat-1*) und Rezeptoren (*dop-1*, *dop-2*, *dop-3*, *dop-4*). Dargestellt ist der Mittelwert + SEM von $n \geq 2$ unabhängigen Experimenten, mit 3 technischen Replikaten, und insgesamt $N \geq 6000$ /Gruppe. (* $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrolle mit Multiple t-test).

Neben 5-HT spielen auch Glu und ACh eine wichtige Rolle beim Pumpvorgang (s. Kapitel 1.2.3). Deshalb wurde ebenfalls die mRNA Expression von Glu und ACh assoziierten Genen nach CisPt Inkubation untersucht. Die Ergebnisse zeigen keine mit Glu assoziierten Effekte (Anhang Abb. 34a). Nur die mRNA Expression von *ace-1*,

welches für die Acetylcholin Esterase 1 kodiert, ist nach CisPt Behandlung leicht reduziert (Anhang Abb. 34b).

CisPt akkumuliert hauptsächlich in den DRG [65]. Dort werden neben cholinergen [191] auch GABAerge Rezeptoren exprimiert [192]. Deshalb wurde ebenso die Expression GABAerger Gene nach CisPt Exposition überprüft (Anhang Abb. 34c). Eine Änderung der mRNA Expression nach CisPt Behandlung konnte nicht festgestellt werden. Beim Kontraktions- und Relaxationszyklus spielt GABA keine Rolle, sondern vielmehr in muskulären Funktionen, wie der Lokomotion [193]. Der Neurotransmitter DA ist u. a. in Mechanosensorik, Lernverhalten [138] und der Wahrnehmung von Bakterien involviert [179, 194]. Wird die Genexpression von dopaminergen Genen betrachtet, die für Biosynthese, Transport und Rezeptor-assoziierte Vorgänge relevant sind, fällt auf, dass neben *cat-4*, auch die Expression des DA-Rezeptors *dop-3* nach CisPt Inkubation erhöht ist (Abb. 19b).

Es ist vorstellbar, dass eine Behandlung mit CisPt nachgeschaltete Signalmechanismen von 5-HT-Rezeptoren, wie SER-7, in *C. elegans* beeinflusst. Die Ergebnisse der mRNA-Expression zeigen, dass Störungen in der 5-HT Neurotransmission möglicherweise durch eine Induktion der *cat-4* Expression kompensiert werden sollen. In einem nachfolgenden Versuch sollten deshalb die Mengen an endogenem 5-HT und DA überprüft werden, da CAT-4 bei der Biosynthese beider Neurotransmitter als Transkriptionsfaktor fungiert [185, 187].

Für die Bestimmung der 5-HT und DA Mengen wurden die wildtypischen Nematoden 48 h mit den verschiedenen Platinanaloga (Cis-, Oxali- und CarboPt) behandelt. Für die Messung der 5-HT und DA Mengen wurde die HPLC-MS/MS Methode [163] von unserer Kooperationspartnerin Prof. Dr. Julia Bornhorst durchgeführt. In Abb. 20a ist zu sehen, dass sich die 5-HT Menge der Platin-behandelten Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht unterscheidet. Bei den CarboPt-behandelten Nematoden könnte ggf. von einer leicht erniedrigten und bei den CisPt-behandelten Tieren von einer leicht erhöhten Tendenz gesprochen werden. Eine erhöhte Tendenz ist ebenfalls bei der DA Menge nach CisPt und CarboPt Behandlung (Abb. 20b) zu sehen. Diese Tendenz könnte mit der erhöhten *cat-4* Expression in Verbindung gebracht werden (Abb. 19).

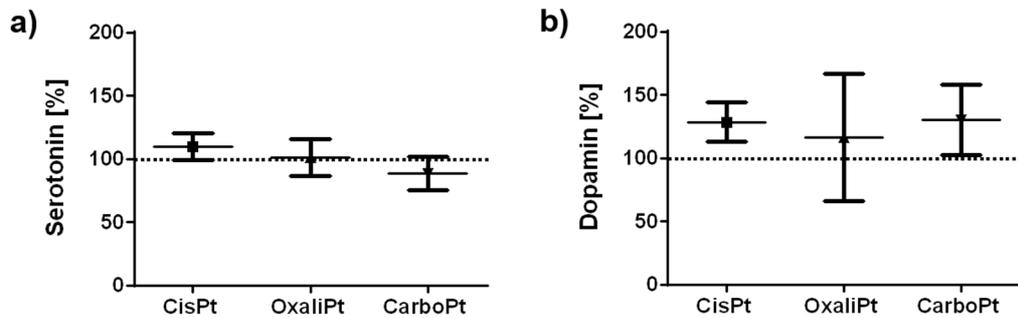


Abb. 20: Unveränderte Serotonin und Dopamin Mengen nach Inkubation mit Platinanaloga.

Die Messung von a) 5-HT und b) DA Mengen erfolgte mit der HPLC-MS/MS Methode (Messung durch Kooperationspartner Prof. Dr. Julia Bornhorst) nach 48 h Inkubation mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt. Gezeigt sind die relativen Werte (Mittelwert \pm SEM) zur unbehandelten Kontrolle von $n=3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 9000$ /Gruppe. Die Kontrolle wird als gepunktete Linie dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede, verglichen zur jeweiligen Kontrolle, festgestellt werden (One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test).

In einem weiteren Schritt sollte die Expression von *tph-1* in den serotonergen Neuronen durch Nutzung des transgenen Stammes GR1366 mgIs42 [*tph-1::GFP* + *rol-6(su1006)*] untersucht werden. Die *tph-1* Expression kann mit Hilfe von GFP in den chemosensorischen ADF und neurosekretorischen NSM Neuronen visualisiert werden [195]. Eine qualitative Betrachtung der Neurone nach 48-stündiger (Abb. 21) sowie 96-stündiger Inkubation (Anhang Abb. 35) mit CisPt weist darauf hin, dass die TPH-1 nach CisPt Behandlung in den NSM und ADF Neuronen aktiv ist und 5-HT somit produziert wird.

Zusätzlich wurden transgene Reporterstämme verwendet, um den Einfluss von CisPt auf die Synthese von ACh und GABA zu untersuchen. Eine 96-stündige Inkubation mit CisPt hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression dieser Neurotransmitter (Anhang Abb. 36 und Abb. 37).

Eine Beeinträchtigung der 5-HT-Biosynthese nach CisPt Inkubation kann also nach Untersuchung der *tph-1* Mutante (Abb. 18), der mRNA-Expression der 5-HT-Biosynthese Gene (Abb. 19), den chromatographischen Messungen der 5-HT Mengen (Abb. 20) und der Nutzung des transgenen *tph-1::GFP* Stammes (Abb. 21 und Anhang Abb. 35) ausgeschlossen werden.

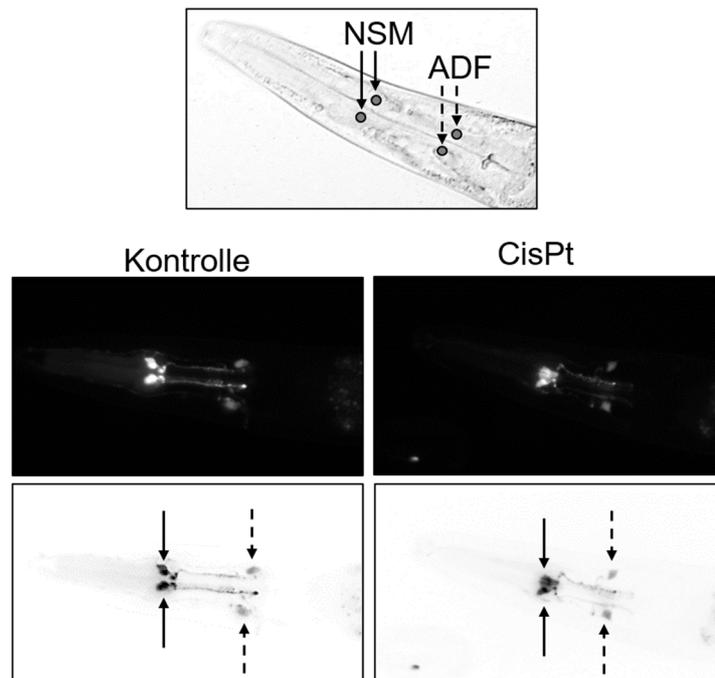


Abb. 21: *tph-1* Expression in NSM und ADF Neuronen.

Visualisierung von im Pharynx lokalisierter serotonerger Neurone mit dem transgenen Stamm GR1366 *mgIs42* [*tph-1::GFP* + *rol-6(su1006)*] nach 48-stündiger Behandlung mit 0 und 100 μ M CisPt. Die Lokalisierung der NSM Neurone ist mit einem durchgehenden Pfeil und die der ADF Neurone mit einem gestrichelten Pfeil gekennzeichnet. Dargestellt sind repräsentative Originalbilder (schwarz) und invertierte Bilder (weiß) aus $n=3$ unabhängigen Experimenten mit insgesamt $N \geq 60$ /Gruppe.

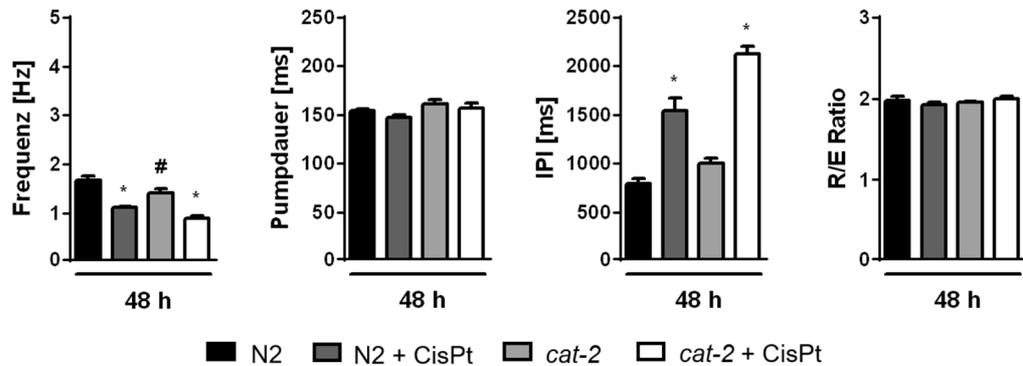
3.8 Cisplatin hat keine unspezifische Wirkung auf die dopaminerge Neurotransmission

Das Enzym BAS-1 sowie der Transkriptionsfaktor CAT-4 sind sowohl an der Biosynthese von 5-HT als auch an der von DA beteiligt [185]. Außerdem werden beide Neurotransmitter über denselben vesikulären Transporter CAT-1 in Vesikel transportiert [190]. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die zuvor beobachteten Effekte nach CisPt Behandlung auf unspezifische Wirkungen auf die dopaminerge Neurotransmission beruht, wurde die *cat-2* Mutante hinzugezogen, welcher das Gen für das erste Enzym der DA-Biosynthese fehlt [185]. DA ist an der Wahrnehmung der Nahrung, jedoch nicht an dem pharyngealen Kontraktions- und Relaxationszyklus beteiligt [194]. Tatsächlich konnte bereits eine Beteiligung von DA beim Pumpverhalten von *C. elegans* durch die Verwendung der *cat-2* Mutante ausgeschlossen werden [194].

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen in Gegenwart von *E. coli* ist auffällig, dass sich der Wildtyp und die Mutante annähernd gleich verhalten (Abb. 22a). Die *cat-2* Mutante weist basal eine niedrigere Pumpfrequenz auf als der Wildtyp. Die Pumpfrequenz in Gegenwart von *E. coli* ist in den CisPt-behandelten wildtypischen und *cat-2* Tieren reduziert, im Vergleich zur

jeweiligen Kontrolle (Abb. 22a). Die Pumpdauer ist in allen Gruppen unverändert und die IPI der behandelten Tiere sind erhöht, verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (Abb. 22a). Sowohl die wildtypischen als auch die *cat-2* Tiere brauchen deutlich mehr Zeit, um mit dem nächsten Pumpvorgang zu starten.

a) OP50-1



b) 5 mM 5-HT

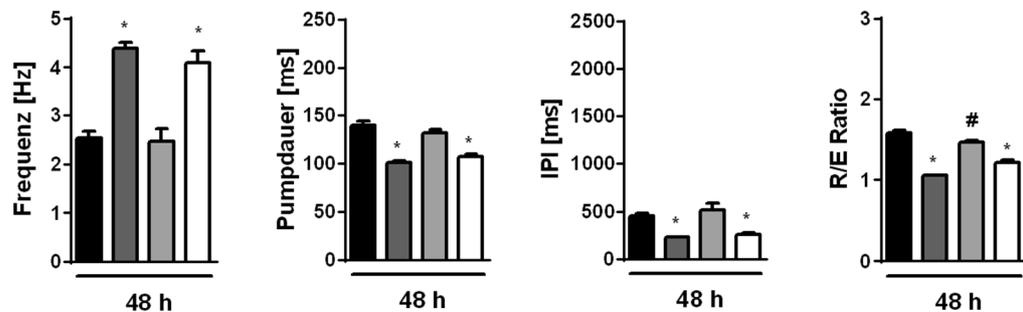


Abb. 22: Dopamin ist nicht am Pumpvorgang beteiligt.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Messungen im ScreenChip™ System. Für die Untersuchungen wurden N2 und *cat-2* Tiere eingesetzt. Die Messung erfolgte in Gegenwart von verschiedenen Pumpstimuli nach einer Inkubationszeit von 48 h mit 0 und 100 μ M CisPt. a) Messung mit *E. coli* OP50⁻¹ (OD₆₀₀=0,9). Bestimmte Parameter sind Frequenz, Pumpdauer, IPI und R/E Ratio. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM von n=3 unabhängigen Experimenten und N \geq 35. (*p \leq 0,05 vs. jeweilige Kontrolle und #p \leq 0,05 vs. N2 Kontrolle mit One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test). b) Messung mit 5 mM 5-HT. Dargestellt sind Frequenz, Pumpdauer, IPI und R/E Ratio. Zu sehen ist der Mittelwert + SEM von n=3 unabhängigen Experimenten und insgesamt N \geq 45/Gruppe. (*p \leq 0,05 vs. jeweilige Kontrolle und #p \leq 0,05 vs. N2 Kontrolle mit One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test).

Werden die Ergebnisse der Messungen mit 5 mM 5-HT betrachtet, fällt auf, dass beide Stämme nach 48 h CisPt Behandlung, eine doppelt so hohe Pumpfrequenz aufweisen wie die jeweilige Kontrolle (Abb. 22b). Eine vergleichbar verringerte Pumpdauer, IPI und R/E Ratio kann nach einer Inkubation mit CisPt im Wildtyp und der *cat-2* Mutante beobachtet werden (Abb. 22b). Das im Wildtyp nach CisPt-Behandlung bekannte hyperaktive Pumpverhalten, in Gegenwart von hohen 5-HT Konzentrationen (vgl. Abb. 13, Abb. 15b, Abb. 16b und Abb. 18b), ist also auch bei CisPt-behandelten *cat-2* Nematoden zu sehen.

Zusammenfassend zeigen der Wildtyp und die *cat-2* Mutante sowohl basal als auch nach CisPt Behandlung ein einheitliches Verhalten. Eine unspezifische Wirkung von CisPt auf die dopaminerge Neurotransmission ist unwahrscheinlich. Eine Beteiligung der DNA-Schadensantwort an der durch CisPt ausgelösten verminderten Pumpfrequenz konnte durch Nutzung der NER Mutante *xpc-1* ebenfalls nicht beobachtet werden (Anhang Abb. 38).

3.9 Cisplatin reduziert die Eiablage von *C. elegans*

Mit den elektrophysiologischen Untersuchungen des pharyngealen Pumpverhaltens konnte eine Beeinträchtigung der 5-HT Neurotransmission durch CisPt festgestellt werden. Als nächstes sollte überprüft werden, ob sich dieser Effekt nur auf den Pumpvorgang beschränkt oder auch andere Verhaltensweisen von *C. elegans* betroffen sind. Ein weiteres Verhalten, bei dem die 5-HT Neurotransmission bedeutend ist, ist die Eiablage in *C. elegans*. Generell ist bekannt, dass CisPt die Fertilität von *C. elegans* dosisabhängig reduziert [196]. Das bei der Eiablage benötigte 5-HT wird, anders als beim Pumpverhalten, nicht von den NSM und ADF Neuronen, sondern den Hermaphrodit spezifischen Neuronen (HSN) freigesetzt, welche sich in der Vulva befinden [197]. Das freigesetzte 5-HT wirkt im Zusammenspiel mit ACh auf die Vulva Muskeln, die wiederum durch Kontraktion das Ablegen der Embryonen ermöglichen [198].

Die Untersuchungen zur Eiablage wurden mit wildtypischen *C. elegans* und den 5-HT Mutanten *tph-1* und *ser-7* durchgeführt. Die Mutanten *tph-1* und *ser-7* wurden erneut als Kontrolle eingesetzt, da 5-HT in den HSN Neuronen durch TPH-1 produziert wird [199] und der SER-7 Rezeptor nicht nur in pharyngealen Neuronen, sondern auch in den Vulva Muskeln, exprimiert wird [141]. Die Tiere wurden 48 h mit CisPt inkubiert. Bei Betrachtung der Ergebnisse ist zu sehen, dass generell eine geringe Anzahl an Eiern pro Tier gelegt wird (Abb. 23a). CisPt reduziert die Anzahl der gelegten Eier pro Individuum beim Wildtyp um etwa 50 % und der *ser-7* Mutante um etwa 74 % (Abb. 23a). Unter basalen Bedingungen legt die *tph-1* Mutante weniger Eier als der Wildtyp (Abb. 23a) [183]. Eine Behandlung mit CisPt verringerte die Anzahl der gelegten Eier bei den *tph-1* Tieren nicht zusätzlich (Abb. 23a).

Bei einer Kombination von OP50⁻¹ mit 2 mM und 5 mM 5-HT kann in den unbehandelten und behandelten wildtypischen und *tph-1* Tieren eine deutlich gesteigerte Eiablage festgestellt werden. In Gegenwart von 2 mM 5-HT zeigen die *tph-1* + CisPt behandelten Nematoden eine doppelt so hohe Anzahl an gelegten Eiern als die unbehandelten *tph-1* Tiere (Abb. 23a). Bei 5 mM 5-HT kann bei den behandelten wildtypischen und *tph-1* Tieren wieder ein hyperaktives Verhalten

beobachtet werden, ähnlich dem des Pumpens (vgl. Abb. 13a, Abb. 15b, Abb. 16b, Abb. 18b und Abb. 22b). Anders als von Hobson *et al.* beobachtet [141], wiesen die *ser-7* Tiere basal in Gegenwart von Bakterien eine geringere Anzahl an Eiern auf als der Wildtyp (Abb. 23a). Eine Behandlung mit CisPt verringerte die Anzahl gelegter Eier der *ser-7* Mutante zusätzlich (Abb. 23a). Eine Kombination von Bakterien und steigenden 5-HT Konzentrationen (2 mM und 5 mM) sowie 5-HT alleine konnten die Zahl der gelegten Eier der *ser-7* Mutante nicht erhöhen (Abb. 23a), wie zu erwarten war [141]. Folglich konnte die Eiablagefähigkeit in wildtypischen und *tph-1*, jedoch nicht in *ser-7* Tieren, durch 5-HT erhöht werden. Dies ähnelt dem Effekt, der beim Messen des Pumpverhaltens in Gegenwart von 5 mM 5-HT (vgl. Abb. 18b) beobachtet wurde.

Basierend auf den Ergebnissen und der Übereinstimmung mit dem hyperaktiven Pumpverhalten ist davon auszugehen, dass CisPt-induzierte Schäden an der serotonergen Neurotransmission zu den schädlichen Effekten dieser platinierenden Verbindung auf die Pharynx- und die Eiablageaktivität beitragen.

In Anlehnung an die Versuchsbedingungen der Eiablage wurde auch ein ähnlicher Aufbau für die elektrophysiologische Messung des Pumpverhaltens als Kontrollexperiment eingesetzt (Anhang Abb. 39). Die Messungen der 48 h in Kontroll- und CisPt-Medium inkubierten Tiere fand dazu im ScreenChip™ System in Anwesenheit von *E. coli* OP50⁻¹ und steigenden 5-HT Konzentrationen (0,4-5 mM) statt. Bei Betrachtung der Ergebnisse wird bereits bei OP50⁻¹ + 0,4 mM 5-HT deutlich, dass die Pumpfrequenz der CisPt-behandelten Tiere wieder auf Kontrollniveau gesteigert werden kann (Anhang Abb. 39). Auch das hyperaktivierte Pumpverhalten, das sonst bei CisPt-behandelten Tieren bei 5 mM 5-HT zu beobachten war (vgl. Abb. 13a, Abb. 15b, Abb. 16b, Abb. 18b und Abb. 22b), ist bei einer Kombination von Bakterien und 5-HT bereits bei 2 mM 5-HT zu erkennen (Anhang Abb. 39). Vermutlich führt die Kombination von *E. coli* und niedrigen 5-HT Konzentrationen zu einer Potenzierung der Pumpstimulus Wirkung, welche sich in einem erhöhten Pumpverhalten (Anhang Abb. 39) und Eiablageverhalten (Abb. 23a) widerspiegelt. Übereinstimmend mit der erhöhten Pumpfrequenz ist das IPI der CisPt-inkubierten Tiere in Gegenwart von OP50⁻¹ + 2 mM 5-HT reduziert (Anhang Abb. 39).

Die größten Unterschiede in der Eiablagefähigkeit konnten zwischen unbehandelten und CisPt-behandelten wildtypischen Tieren in Gegenwart von OP50⁻¹ und 5 mM 5-HT beobachtet werden (Abb. 23a). Deshalb wurden diese Bedingungen für einen weiteren Eiablageversuch eingesetzt. In diesem Co-Inkubationsversuch sollte untersucht werden, ob 5-HT (0,4 mM) und Dulox (1 µM oder 100 µM) neben der Pumpfrequenz (vgl. Abb. 15a und Abb. 16a) auch die Eiablagefähigkeit von

CisPt-behandelten Tieren erhöhen können. Die Eiablageaktivität in Gegenwart von *E. coli* ist bei allen CisPt-inkubierten Nematoden deutlich reduziert, verglichen zu den jeweiligen Kontrollgruppen (Abb. 23b). Eine Supplementation mit 100 µM Dulox ist dagegen in der Lage die Anzahl gelegter Eier von CisPt-behandelten Tieren zu erhöhen. CisPt + 100 µM Dulox Tiere legen trotzdem noch weniger Eier als Kontrolle + 100 µM Dulox Tiere (Abb. 23b).

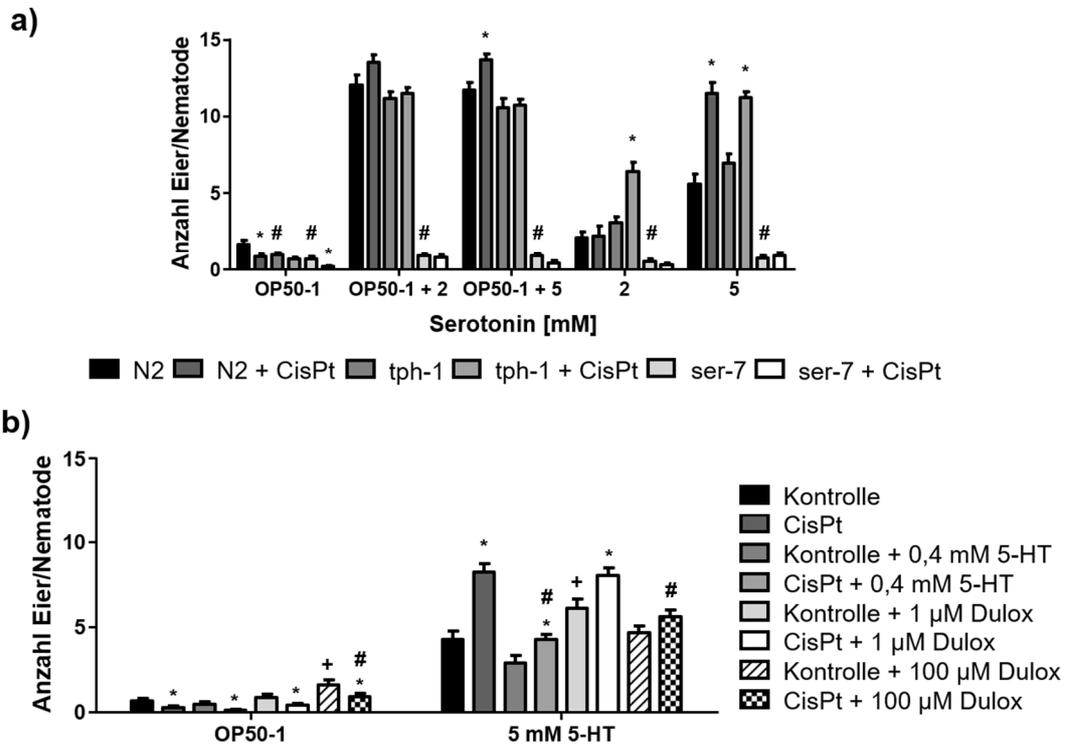


Abb. 23: Duloxetin® hat einen positiven Effekt auf die Eiablage von Cisplatin-behandelten Nematoden.

Die Fähigkeit zur Eiablage wurde nach 48 h Inkubation von a) N2, *tph-1* und *ser-7* Tieren mit 0 und 100 µM CisPt untersucht. Nach der Inkubationszeit wurden die Nematoden in flüssige Medien überführt, die *E. coli* OP50⁻¹ (OD₆₀₀=0,9), 5-HT (2 mM oder 5 mM) oder eine Kombination von *E. coli* OP50⁻¹ (OD₆₀₀=0,9) + 5-HT (2 mM oder 5 mM) enthielten. Die Anzahl der gelegten Eier wurde nach 2 h gezählt und als Mittelwert + SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt N≥45/Gruppe angegeben. (*p≤0,05 vs. jeweilige Kontrolle, #p≤0,05 CisPt vs. CisPt-Gruppen mit Multiple t-test). b) Eiablagefähigkeit nach 48-stündiger Co-Inkubation von N2 *C. elegans* mit Kontroll- oder CisPt-enthaltendem Medium mit 0,4 mM 5-HT oder Dulox (1 µM oder 100 µM). Nach der Inkubation wurden die Nematoden in *E. coli* OP50⁻¹ (OD₆₀₀=0,9) oder 5 mM 5-HT enthaltende Medien überführt. Die gelegten Eier wurden nach 2 h gezählt. Dargestellt sind Mittelwert + SEM aus n=3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt N≥42/Gruppe. (*p≤0,05 vs. jeweilige Kontrolle, +p≤0,05 Kontrolle vs. Kontrolle, #p≤0,05 CisPt vs. CisPt-Gruppen mit Multiple t-test).

In Gegenwart von 5 mM 5-HT verändern sich die Aktivitäten der Eiablage (Abb. 23b). Generell ist die Zahl der gelegten Embryonen in allen Gruppen erhöht, jedoch weniger stark als in dem Vorversuch (Abb. 23a). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der Co-Inkubationsversuch mit 5-HT eines anderen Herstellers durchgeführt wurde.

Nichtsdestotrotz sind in 5 mM 5-HT enthaltendem Medium Unterschiede zwischen den Kontroll- und CisPt-Gruppen zu sehen (Abb. 23b), welche sich nach Co-Inkubation mit 100 μ M Dulox zwischen Kontroll- und CisPt-behandelten Tieren verringern (Abb. 23b). Co-Inkubationen mit 0,4 mM 5-HT und Dulox (1 μ M und 100 μ M) führten sogar dazu, dass die überkompensatorischen Effekte der CisPt-behandelten Tiere in Gegenwart von 5 mM 5-HT weniger stark ausgeprägt waren (Abb. 23b). Dies unterscheidet sich zu den Beobachtungen, die beim Pumpverhalten gemacht wurden. Bei den elektrophysiologischen Messungen konnte ein Einfluss auf die Hypersensitivität der CisPt-Tiere in Gegenwart von 5 mM 5-HT, nach Co-Behandlung mit 5-HT oder Dulox, nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 15b und Abb. 16b).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass eine Behandlung mit CisPt zu einer verringerten Eiablage führt. In Gegenwart von hohen 5-HT Konzentrationen zeigt sich zudem ein ähnliches hyperaktives Verhalten wie es auch bei den elektrophysiologischen Messungen beobachtet werden konnte. Eine protektive Wirkung von Dulox vor CisPt konnte sowohl auf die Pharynx- als auch auf die Eiablageaktivität festgestellt werden.

3.10 Cisplatin führt zu kognitiven Schäden in *C. elegans*

Krebserkrankte Patienten, die mit einer Chemotherapie behandelt werden, entwickeln oftmals kognitive Probleme - das sogenannte „*Chemobrain*“ [200]. Das *Chemobrain* äußert sich u. a. in einer reduzierten Aufmerksamkeitsspanne sowie Lern- und Erinnerungsdefiziten [200]. Besonders bei Patienten, die während ihrer Kindheit Chemotherapie erhielten, konnten Jahre nach der Behandlung schwere neurologische Funktionsstörungen nachgewiesen werden [201]. *C. elegans* besitzt die Fähigkeit des assoziativen Lernens [202] und kann daher als Modellorganismus für die Untersuchung kognitiver Störungen eingesetzt werden. Am Lernvorgang in *C. elegans* sind eine Reihe von Neuronen, Neuropeptide und Neurotransmitter, wie DA und 5-HT, beteiligt [202-204].

Nach einer 96-stündigen Inkubation mit den Platinderivaten Cis-, Oxali- und CarboPt sollte kontrolliert werden, ob das Lernverhalten in *C. elegans* gestört ist. Dazu wurde der *Learning Assay* eingesetzt, welchem das assoziative Lernen zugrunde liegt. Dabei lernen die Tiere einen Odorant, in diesem Fall Benzaldehyd, mit Hungern zu assoziieren [202]. Benzaldehyd stellt einen Attraktant dar und wurde in diesem Versuchsaufbau eingesetzt, da Platin-behandelte Nematoden in der Lage sind, diese Substanz wahrzunehmen, wie zuvor gezeigt (vgl. Abb. 10b und Abb. 24 (naive Gruppe)). Die Konditionierung, d. h. die Assoziation von Benzaldehyd mit der Abwesenheit von Futter führt dazu, dass die Kontrolltiere in einem darauffolgenden

Chemotaxis Assay das Benzaldehyd vermeiden (Abb. 24a) [162]. Diese Vermeidung kann anhand eines negativen CI ($-0,125 \pm 0,09$) abgelesen werden. Die Platin-behandelten Tiere werden weiterhin vom Benzaldehyd angezogen (Abb. 24a), was durch den positiven CI deutlich wird. Eine Behandlung mit Platinderivaten führt offensichtlich dazu, dass die Tiere nicht in der Lage sind die kognitive Verknüpfung zwischen Benzaldehyd und Hungern herzustellen. Interessanterweise ist das Lerndefizit bei CisPt-behandelten Nematoden (CI: $0,461 \pm 0,09$) am stärksten ausgeprägt (Abb. 24a) und übersteigt sogar das der Positivkontrolle *cat-2* (Abb. 24a). Die dopaminerge Mutante *cat-2* wurde zur Kontrolle eingesetzt, da die dopaminerge Neurotransmission bekanntermaßen wichtig für das assoziative Lernen ist [203].

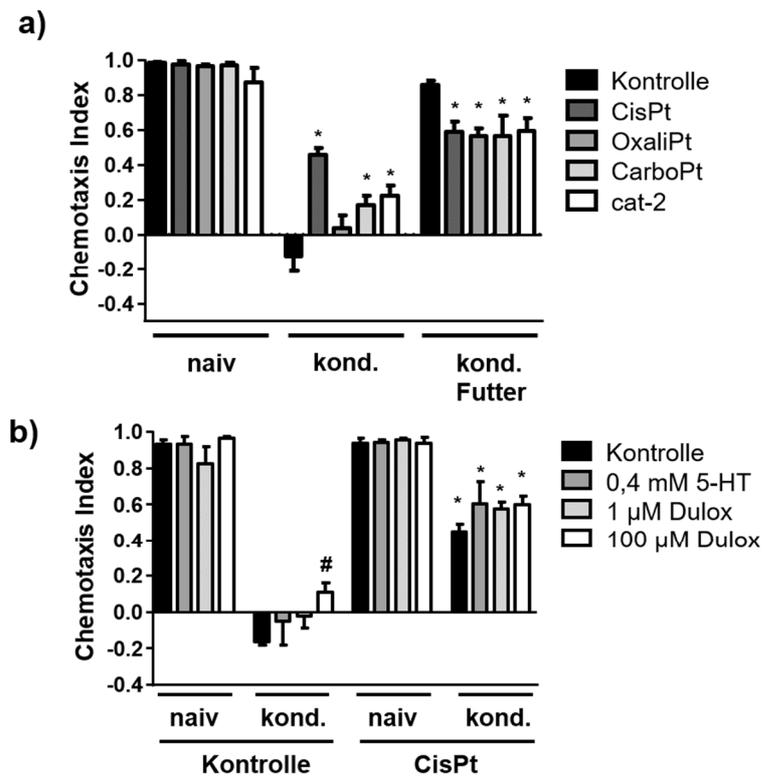


Abb. 24: Behandlung mit Platinderivaten führt zu verminderter Lernleistung.

Der Einfluss von Platinanaloga auf das Lernverhalten von N2 *C. elegans* wurde nach a) einer 96-h Behandlung mit 100 μM CisPt, 300 μM OxaliPt oder 1 mM CarboPt untersucht. naiv: 1 h hungern; konditioniert (kond.): 1 h hungern in Anwesenheit von 100 % Benzaldehyd; konditioniert mit Futter (kond. Futter): Nahrungsangebot in Anwesenheit von 100 % Benzaldehyd. Die *cat-2*-Mutante wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM aus $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten mit insgesamt $N \geq 237$ /Gruppe. (* $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrolle, One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test). b) *Learning Assay* nach 96 h Co-Inkubation der N2 Tiere mit 0 oder 100 μM CisPt mit 5-HT (0,4 mM) oder Dulox (1 μM oder 100 μM). Dargestellt ist der Mittelwert + SEM aus $n=3$ unabhängigen Experimenten mit insgesamt $N \geq 219$ /Gruppe untersuchten Nematoden. * $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrolle und # $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle kond. (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test).

In einem weiteren Kontrolleexperiment sollte verdeutlicht werden, dass die Beobachtungen, die bei den konditionierten Tieren gemacht wurden, auf ein gelerntes

(Kontrolle) bzw. nicht gelerntes (CisPt) Verhalten zurückzuführen sind. In diesem Experiment wurden die unbehandelten und behandelten Tiere in Gegenwart von Futter konditioniert (kond. Futter), d. h. *E. coli* OP50⁻¹ in Anwesenheit von Benzaldehyd. Auffallend ist, dass nur die Kontrolle einen ähnlichen CI ($0,862 \pm 0,024$) zeigte, wie die naiven Kontrolltiere (Abb. 24a). Im Gegensatz dazu hatten die mit Platinanaloga behandelten kond. Futter Gruppen sowie die *cat-2*-Mutante einen reduzierten CI (ca. 0,566 bis 0,591) im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass Platin-behandelte Tiere generell in der neuroassoziativen Konditionierung beeinträchtigt sind.

Durch die Untersuchungen des assoziativen Lernens konnte gezeigt werden, dass vor allem CisPt-behandelte *C. elegans* eine deutlich reduzierte Lernleistung aufweisen (Abb. 24a). Eine Co-Inkubation mit 5-HT oder Dulox konnte bereits das Pumpverhalten (vgl. Abb. 15 und Abb. 16) und Dulox zusätzlich das Eiablageverhalten (vgl. Abb. 23b) der CisPt-behandelten Tiere steigern. Deshalb sollte in einem nächsten Versuch überprüft werden, ob eine Co-Inkubation mit 5-HT und Dulox ebenfalls neurokognitiven Schutz gegen CisPt-induzierte Lerndefizite bietet. Für die Co-Inkubation mit 5-HT (0,4 mM 5-HT) sowie Dulox (1 oder 100 μ M) wurden sowohl ein 48- als auch ein 96-stündiger Analysezeitpunkt gewählt. In Abb. 24b sind die Ergebnisse nach 96-stündiger Co-Inkubation zu sehen. Der *Learning Assay* fand erneut unter Verwendung von Benzaldehyd statt. Die naiven Gruppen weisen wieder eine starke Anziehung zu Benzaldehyd auf (Abb. 24b). Die niedrigen CI der konditionierten Kontrollgruppen machen deutlich, dass die Tiere das Benzaldehyd vermeiden (Abb. 24b). Eine 96-stündige Co-Inkubation bei unbehandelten Tieren mit 100 μ M Dulox führt zu einem schlechteren Lernverfolg, verglichen zur Kontrolle ohne Dulox (Abb. 24b). Dieser negative Einfluss von Dulox war nach einer 48-stündigen Behandlung noch nicht zu beobachten (Anhang Abb. 40). Der CI der konditionierten CisPt-Gruppen ist nach Co-Inkubation mit 5-HT und Dulox nach 48 h und nach 96 h weiterhin erhöht (Abb. 24b und Anhang Abb. 40).

Anhand der Ergebnisse des *Learning Assays* lässt sich ableiten, dass eine Behandlung mit CisPt zu einem adversen Einfluss auf die Fähigkeit von *C. elegans* zum assoziativen Lernen führt. Eine Co-Inkubation mit 5-HT und Dulox lieferte keinen neurokognitiven Schutz vor CisPt. Die durch eine Supplementierung ausgelösten präventiven Effekte von 5-HT und Dulox nach einer Behandlung mit CisPt sind in *C. elegans* demnach nur auf die Neurotransmission während des Pump- und Eiablagevorgangs beschränkt.

4. Diskussion

4.1 Die Einschränkung des pharyngealen Pumpens durch Cisplatin beruht auf einer neurotoxischen Wirkung

In der vorliegenden Arbeit wurde *C. elegans* als Modellorganismus eingesetzt, um den Pathomechanismus einer Platin-basierten CIPN zu entschlüsseln. Die Festlegung der eingesetzten äquitoxischen Konzentrationen von Cis-, Oxali- und CarboPt beruhte hierbei auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe [147]. Die grundlegenden zytotoxischen Eigenschaften von CisPt in *C. elegans* wurden bereits in vorherigen Studien beschrieben. Dort konnte gezeigt werden, dass CisPt dosisabhängig aufgenommen wird, 1,2-GpG Intrastrang Vernetzungen ausbildet und Apoptose induziert [147]. Auch die Entwicklung von *C. elegans* wird nach CisPt Behandlung dosisabhängig beeinträchtigt. So kommt es zu einem verzögerten Eintritt in die adulte Phase [147, 205] und die Körperlänge der Tiere verringert sich drastisch mit steigender CisPt Konzentration [205]. Außerdem haben die Nematoden, welche mit Platinanaloga behandelt wurden, viel weniger Nachkommen [196]. Die Zahl der gelegten Eier ist reduziert und gleichzeitig erhöht sich die Zahl unbefruchteter Eier [205]. Die Infertilität geht vermutlich auf eine durch CisPt ausgelöste Störung der Funktionalität der Spermien zurück [205]. Die in dieser Arbeit gezeigte Abnahme der Fertilität durch CisPt Behandlung ist mit jener, welche in vorherigen Studien beobachtet werden konnte [205], vergleichbar.

Unter Verwendung des ScreenChip™ Systems mit dem Pumpstimulus *E. coli* konnten unterschiedliche Einflüsse auf das Pumpverhalten der Nematoden nach Inkubation mit Platinanaloga beobachtet werden. Dabei hatte CisPt bereits nach 48 h die größte neurotoxische Wirkung, die anhand einer reduzierten Pumpfrequenz und einem erhöhten IPI abzulesen war. Die CisPt-behandelten Tiere brauchen demnach viel länger, um mit dem nächsten Pumpvorgang zu starten. Dies lässt vermuten, dass CisPt in *C. elegans* neurotoxischer wirkt als Oxali- und CarboPt. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit den Vorarbeiten [147] und der klinischen Situation, bei der bereits niedrige CisPt-Dosen ausreichend für die Ausbildung einer CIPN sind [46]. Ab einer CisPt Konzentration von 50 µM konnte mit steigender Konzentration keine weitere Reduktion der Pumpfrequenz in *C. elegans* nachgewiesen werden, was möglicherweise auf einen Sättigungseffekt von CisPt hindeuten könnte.

Neben einer neurotoxischen Wirkung von CisPt, welche die verringerte Pharynxaktivität begünstigt, wäre ebenfalls denkbar, dass diese verringerte Aktivität auf einer myotoxischen Wirkung auf die beteiligten pharyngealen Muskeln beruht. Mit dem Alter nimmt die Muskelintegrität von *C. elegans* stetig ab, was sich auch in einer

veränderten Struktur der pharyngealen Muskeln widerspiegelt [206]. Für den Pumpvorgang und die dadurch induzierte Nahrungsaufnahme ist ein funktionaler Pharynx grundlegend. Weiterhin ist ein korrektes Zusammenspiel der involvierten Muskeln und des Nervensystems bei der neuromuskulären Signalweiterleitung von besonderer Wichtigkeit [155]. Bei alternden Tieren sind die Pumpvorgänge aufgrund der physiologischen Alterung reduziert [154]. Die durch CisPt-induzierte Hemmung der Pumpfrequenz war in Anwesenheit des Pumpstimulus 5-HT nicht mehr nachweisbar, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Eine Stimulation mit 5-HT konnte die Pumpfrequenz in alten Tieren (168 h) nicht auf das Niveau anheben, welches junge Tiere (48 h) aufwiesen. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen von Chow *et al.* überein, die daraus schlussfolgerten, dass strukturelle Veränderungen der pharyngealen Muskulatur mit der funktionellen Abnahme des Pharynx zusammenhängen [207]. Mit der FITC Färbemethode konnte im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass die eingesetzten Platinanaloge keinen Einfluss auf die Pharynxmorphologie haben, sowohl nach 48-stündiger als auch nach 96-stündiger Behandlung. Eine Degeneration pharyngealer Muskeln nach Platinbehandlung ist daher als unwahrscheinlich anzunehmen. Außerdem konnten wir in vorherigen Studien darstellen, dass die hier eingesetzten Platin Konzentrationen keinen toxischen Einfluss auf die Körpermuskulatur in *C. elegans* haben [147]. Es ist bekannt, dass das pharyngeale Pumpen ein myogener Prozess ist, der eine niedrige basale Pumpfrequenz gewährleistet [151]. Die innervierenden Motorneurone ermöglichen in Anwesenheit eines Pumpstimulus, wie *E. coli*, den schnellen Pumpvorgang und sind daher maßgeblich am Kontraktions- und Relaxationsprozess beteiligt [129]. Studien mit Blei und Cadmium haben ergeben, dass das pharyngeale Pumpen in *C. elegans* bei gleicher Schwermetall-Konzentration früher betroffen ist als die Körpermuskulatur [149]. Zudem haben Crone *et al.* gezeigt, dass CisPt u. a. im Pharynx akkumuliert [208], in welchem die größte Anzahl an Ganglien ansässig ist [115]. Deshalb ist davon auszugehen, dass das CisPt dort auch am stärksten wirkt. Die vorrangig neurotoxische Wirkung von CisPt wird auch durch die Ergebnisse der Co-Inkubation mit dem SSNRI Dulox bestätigt. Würden die pharyngealen Muskeln durch CisPt geschädigt werden, könnte die Pumprate durch Dulox nicht stimuliert werden. Dies gilt ebenfalls für die beobachtete Stimulierung des Eiablageverhaltens durch 5-HT und Dulox nach CisPt Behandlung. Die Eiablagefähigkeit kann nicht durch 5-HT stimuliert werden, wenn die involvierten Vulva Muskeln geschädigt sind [199]. Zusammenfassend kann daher angenommen werden, dass CisPt in *C. elegans* vorrangig neurotoxisch und nicht myotoxisch wirkt. Dies weist also auf eine neurotoxische Wirkung von CisPt auf das pharyngeale Pumpen und die Eiablage hin.

Patienten, die Platinderivate als Chemotherapeutikum erhalten und eine manifestierte CIPN aufweisen, klagen vor allem über sensorische Problematiken [47]. Mit der FITC Färbemethode können die sensorischen Amphidneurone in *C. elegans* angefärbt werden [97]. Die Visualisierung dieser Neurone mittels FITC gelang im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur unzureichend, weshalb eine andere Färbemethode (DiO) eingesetzt wurde. Durch die Verwendung von DiO konnten qualitativ keine morphologischen Schäden an den betrachteten Amphid- und Phasmidneuronen beobachtet und durch den Chemotaxis Assay Funktionsstörungen ausgewählter Amphidneurone (AWA, AWB und AWC) nach Platin Inkubation ausgeschlossen werden. In einigen sensorischen Neuronen von *C. elegans*, z. B. AWA, AWC und ADF, werden TRPV Kanäle exprimiert [209]. TRP Kanäle sind Nozizeptoren, welche aufgrund ihrer Beteiligung bei der Schmerzweiterleitung mit der CIPN assoziiert wurden [54]. Für Cis- und OxaliPt ist bekannt, dass sie die mRNA Expression der TRPV und TRPA Kanäle erhöhen und dies in einer Hypersensitivität der Nozizeptoren resultieren kann [75]. Die Funktionalität von AWA Neuronen wird in *C. elegans* eingeschränkt, wenn ein Gen für den TRPV Kanal (*osm-9* oder *ocr-2*) fehlt [210]. Des Weiteren wird in der Literatur beschrieben, dass die zuvor genannten TRPV Kanäle die Expression von 5-HT in den chemosensorischen Neuronen regulieren [211]. Dadurch, dass die AWA, AWB und AWC Neurone in der vorliegenden Arbeit nach einer Behandlung mit CisPt immer noch funktional sind und zusätzlich keine Beeinträchtigung der 5-HT Expression in NSM und ADF Neuronen durch CisPt besteht, kann indirekt ausgeschlossen werden, dass TRP Kanäle eine entscheidende Rolle bei der CisPt-vermittelten Neurotoxizität in *C. elegans* spielen.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die toxischen Wirkungen von CisPt auf die Pharynxaktivität persistent sind [147]. In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin ausgeschlossen werden, dass die verringerte Pumprate nach CisPt Exposition einer kalorischen Restriktion oder einer repulsiven Wirkung der Platinanaloga unterliegt. Ein bitterer Geschmack oder die Anwesenheit repulsiver Substanzen könnte sonst ebenfalls zu einer verringerten Pumprate führen [133, 212]. Dem lokalen Suchverhalten, welches durch die AWC Neurone initiiert wird [177], folgt die Wahrnehmung der Nahrungsquelle und das Erreichen des Bakterienrasens, woraufhin die Bewegung der Nematoden gestoppt bzw. verlangsamt wird [179]. Dadurch, dass die AWC Neurone nach CisPt Behandlung immer noch funktional sind, kann vorausgesetzt werden, dass der Neurotransmitter Glu in Platin-behandelten Tieren nicht beeinträchtigt ist, da er für die Funktion der AWC Neurone unerlässlich ist [177]. Weiterhin kann für CisPt und CarboPt die Funktionalität des Neurotransmitters ACh, basierend auf der Funktionalität der AWB Neurone, angenommen werden. Dies ist eine wichtige Beobachtung, da sowohl Glu als auch

ACh maßgeblich an der neuronalen Regulation des Pumpvorgangs [123] und ACh zusätzlich bei der Eiablage [198] beteiligt sind. Die in dieser Arbeit generierten Daten aus den Versuchen zu Chemotaxis, Futterwahrnehmung und Mechanosensorik belegen, dass die Sensorik in *C. elegans* nach einer Behandlung mit Platinanaloga nicht beeinträchtigt ist. Basierend auf diesen Resultaten kann somit geschlossen werden, dass eine Abnahme der Pumpfrequenz und die gleichzeitige Erhöhung des IPI nach CisPt Behandlung ihren Ursprung sehr wahrscheinlich nicht in einer durch CisPt beeinträchtigten Sensorik haben.

4.2 Die Inhibition der serotonergen Neurotransmission ist verantwortlich für die Neurotoxizität von Cisplatin

Die elektrophysiologischen Messungen, welche in der vorliegenden Arbeit mit *E. coli* als Pumpstimulus durchgeführt wurden, zeigten, dass eine 48-stündige Behandlung mit CisPt in *C. elegans* zu einer verminderten Pumpfrequenz und der Pumpstimulus 5-HT zu einem hyperaktiven Pumpverhalten führte. Die Hersteller des ScreenChip™ Systems empfehlen für die Messungen den Einsatz von 10 mM 5-HT, obwohl bereits mit 5 mM 5-HT die maximale Pumpfrequenz erreicht wurde [213]. Auch in anderen Studien wurden meist 10 mM 5-HT für elektrophysiologische Messungen eingesetzt [126, 153, 157, 214, 215]. Aus diesem Grund wurden auch in der hier durchgeführten Studie die ersten Messungen nach Inkubationen mit den Platinderivaten in Gegenwart von 10 mM 5-HT ausgeführt. In Anwesenheit dieser 5-HT Konzentration kam es zu einem Sättigungseffekt, bei welchem zwischen der Pumpfrequenz der unbehandelten und der Platin-behandelten Gruppen keine Unterschiede mehr zu erkennen waren. Einen solchen Sättigungseffekt konnten ebenfalls Weeks *et al.* ab 10 mM 5-HT mit unbehandelten wildtypischen *C. elegans* beobachten [157]. Eine reduzierte 5-HT Konzentration (5 mM) führte – wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt - bei den Platin-behandelten Tieren zu einem hyperaktivierten Pumpverhalten. Der hyperaktive Phänotyp in Gegenwart von 5 mM 5-HT deutet indirekt darauf hin, dass die Neurotransmitter ACh und Glu nach CisPt Behandlung funktional sind. Dies lässt wiederum darauf schließen, dass auch die MC und M3 Neurone intakt sind [128] und nicht durch CisPt geschädigt wurden. Wären die zuvor genannten Neurotransmitter oder die pharyngealen Muskeln durch CisPt beeinträchtigt, könnte das Pumpen durch exogenes 5-HT nicht stimuliert werden [128]. Eine intakte Neurotransmission ist unerlässlich für die Modulation der Pumpaktivität [151]. Die Bindung von 5-HT an die entsprechenden 5-HT-Rezeptoren bewirkt die Ausschüttung von ACh aus den MC Motorneuronen [129] und führt zu einer Kontraktion des pm4 Muskels, welcher u. a. die nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Untereinheit EAT-2 exprimiert [122]. *C. elegans*

Mutanten, denen *eat-2* fehlt, haben eine stark verringerte Pumpfrequenz [129], welche niedriger als die Pumprate der CisPt-behandelten Nematoden ist. Eine CisPt-induzierte Veränderung von EAT-2 wird aufgrund der unveränderten Genexpression von *eat-2* und des beobachteten Pumpverhaltens nicht angenommen. Durch die mit dem ScreenChip™ System gewonnenen Pumpparameter sind weitere Schlussfolgerungen möglich. Die beobachtete gleichbleibende Pumpdauer zwischen unbehandelten Kontrolltieren und CisPt-behandelten Nematoden in Anwesenheit des Pumpstimulus *E. coli* spricht dafür, dass die an der Relaxation der pharyngealen Muskeln beteiligten M3 Motorneurone funktional sind, andernfalls würde sich die Pumpdauer erhöhen [131]. Die Relaxation wird durch die Ausschüttung von Glu aus den M3 Motorneuronen über den Glu-gesteuerten ionotropen Chloridkanal AVR-15 induziert [130]. Ein Fehlen von *avr-15* resultiert in einer verlängerten Pumpdauer, da die Relaxation durch die fehlerhafte Glu Neurotransmission nur insuffizient abläuft [130].

In Gegenwart des Pumpstimulus 5-HT (5 mM) konnte eine erhöhte Pumpfrequenz mit gleichzeitig reduzierter Pumpdauer bei den CisPt-behandelten Nematoden beobachtet werden, was auf einen schnelleren Pumpvorgang schließen lässt als bei den Kontrolltieren. Diese Annahme basiert auf den Beobachtungen von Niacaric & Avery [128] und kann auf die in der Arbeit generierten Ergebnisse der Eiablage erweitert werden, weil sich die Zahl der gelegten Embryonen von CisPt-behandelten *C. elegans* in Anwesenheit von 5 mM 5-HT deutlich erhöht hat. Bei der Co-Inkubation von 1 µM Dulox und CisPt-behandelten Nematoden kann ebenfalls ein beschleunigter Pumpvorgang angenommen werden, verglichen zu der CisPt-behandelten Population. Bei dieser Dulox Konzentration konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Nematoden in Gegenwart von *E. coli* einen vergleichbaren überkompensatorischen Effekt, ähnlich dem der CisPt-behandelten Nematoden in Gegenwart von 5 mM 5-HT, aufwiesen. Bisher gibt es kaum Medikamente, um eine manifestierte CIPN zu behandeln. Einzig der SSNRI Dulox hat sich als erfolgsversprechend in der Therapie von CIPN, sowie in der Behandlung von diabetischer Neuropathie, erwiesen [54, 58, 61]. In der Klinik wird der SSNRI Dulox erst verabreicht, sobald sich eine CIPN ausgebildet hat [59], präventive Maßnahmen wurden in Patienten bisher allerdings nicht beschrieben. Interessanterweise, konnte eine Co-Inkubation mit Dulox einer CisPt-ausgelösten Hemmung der Pumpaktivität in *C. elegans* vorbeugen. Präventive Effekte von Dulox sind in der Forschung jedoch nicht unbekannt. So wurde Dulox bereits präventiv, d. h. 1 h vor Behandlung mit OxaliPt oder Paclitaxel, in Studien mit Mäusen angewandt [62]. Die Neuroprotektion durch Dulox zeigte sich u. a. in einer Erhöhung der IENF Dichte und dem Vorbeugen

neuropathischer Symptome [62]. Die bisher diskutierten Resultate deuten darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen der CisPt-induzierten Schädigung der 5-HT Neurotransmission und dem verringerten Pumpverhalten besteht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Verringerung des endogenen 5-HT zu einer reduzierten Pumpfrequenz führt [136, 183], die durch Zugabe von 5-HT auf das Niveau von wildtypischen Tieren revertiert werden kann [136]. Eine Steigerung der Pumpfrequenz in Gegenwart von 5-HT konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit mit der *tph-1* Mutante beobachtet werden. Außerdem kann geschlussfolgert werden, dass Beeinträchtigungen in der 5-HT Signalweiterleitung nach CisPt Behandlung bestehen, da die *tph-1* Mutante basal und der CisPt-behandelte Wildtyp eine ähnliche pharyngeale Pumpfrequenz aufwiesen. Die erhöhte mRNA Expression des Transkriptionsfaktors CAT-4 deutet eine adaptive Antwort auf CisPt-induzierten Stress an. Die gesteigerte Genexpression von *cat-4* nach CisPt Exposition scheint jedoch keinen Einfluss auf die Pharynxaktivität zu haben, da die Pumpfrequenz nach CisPt Behandlung in Gegenwart von *E. coli* letztendlich reduziert ist. Die Annahme, dass die 5-HT-Biosynthese durch CisPt in *C. elegans* nicht beeinflusst wird, konnte mittels verschiedenster Experimente, wie dem Einsatz der *tph-1* Mutante, der Überprüfung der mRNA Expression der an der 5-HT-Biosynthese beteiligten Gene, Reporterstämmen und der 5-HT Mengenbestimmung mittels HPLC-MS/MS Analyse hinreichend verifiziert werden. Bezüglich der eingesetzten HPLC-MS/MS Methode ist jedoch zu beachten, dass lediglich die 5-HT Gesamtmenge im Tier gemessen wird. Wie viel 5-HT letztendlich im synaptischen Spalt und somit für die Neurotransmission zur Verfügung steht, kann damit nicht beantwortet werden.

Die in dieser Arbeit generierten Daten bezüglich der Co-Inkubation mit Dulox weisen auf einen neuroprotektiven Effekt des SSNRI vor CisPt-induzierten Störungen der Pharynxaktivität hin. SSNRI können das Pumpen nur stimulieren, wenn die beteiligten Neurone funktional sind [128], 5-HT in *C. elegans* gebildet und dieses auch in Vesikel transportiert werden kann [181]. So ist aus der klinischen Praxis bekannt, dass depressive Patienten nur erfolgreich mit SSNRI therapiert werden, wenn diese auch 5-HT produzieren [216]. Dass Dulox die Pumpfrequenz und das Eiablageverhalten von CisPt-behandelten *C. elegans* im Rahmen der hier durchgeführten Versuchsbedingungen stimulieren konnte und das CisPt die 5-HT-Biosynthese nicht schädigt, lässt darauf schließen, dass die innervierenden Neurone durch die platinierende Verbindung nicht beeinträchtigt wurden, 5-HT produziert und in Vesikel transportiert wird. Diese Annahme wird auch durch eine Studie unterstützt, in der die selektiven 5-HT Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Imipramin und Fluoxetin die Pumprate und die Eiablage der 5-HT Mutanten *cat-4* und *cat-1* (Transkriptionsfaktor

der 5-HT-Biosynthese und vesikulärer Transporter) – im Gegensatz zu wildtypischen Tieren - nicht anregen konnten [181, 217, 218]. Die Annahme, dass die in der hiesigen Arbeit beobachteten neuroprotektiven Eigenschaften des SSNRI Dulox in *C. elegans* wahrscheinlich auf serotonerge Mechanismen zurückzuführen sind, wird dadurch unterstützt, dass *C. elegans* bekanntermaßen kein Noradrenalin besitzt [138, 186].

Innerhalb der vorliegenden Studie konnte für 5-HT gezeigt werden, dass es keinen Einfluss auf die zytotoxischen Effekte von CisPt hat. Im Hinblick auf die mögliche Translation der hier erhobenen Befunde ist bedeutsam, dass eine pharmakologische CIPN Prävention die Antitumor-Effizienz der Chemotherapeutika nicht senken soll [55]. Eine veränderte antitumorogene Wirksamkeit von CisPt in Gegenwart von Dulox wird nicht angenommen, da zumindest für OxaliPt in Rattenstudien keine verringerte Antitumoraktivität durch Dulox festgestellt werden konnte [62].

Durch die Supplementierung mit 5-HT und Dulox wird deutlich, dass es sich bei der CisPt-induzierten Schädigung um keine irreversiblen Schäden der neuromuskulären Transmission handelt. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Motorneurone M3 und MC funktional sind und der Pumpvorgang initiiert werden kann. Da neben den genannten Motorneuronen 5-HT unerlässlich für die Pumpaktivität ist [151], scheint 5-HT der kritische Faktor in der CisPt-vermittelten Neurotoxizität in *C. elegans* zu sein. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass den negativen Effekten von CisPt ein Einfluss auf die serotonerge Neurotransmission zugrunde liegt.

4.3 Einfluss von Cisplatin auf verschiedene Mechanismen der serotonergen Neurotransmission

In dem vorherigen Kapitel konnte durch die diskutierten Ergebnisse eine Beteiligung von CisPt an der 5-HT-Biosynthese, der mRNA Expression 5-HT-assoziiierter Gene und dem Verpacken von 5-HT in synaptische Vesikel soweit ausgeschlossen werden. Für die Signalweiterleitung ist die Bindung des 5-HT an spezifische 5-HT-Rezeptoren und die Aktivierung der nachgeschalteten Mechanismen nötig. Die Behandlung der 5-HT-Rezeptor Mutanten mit CisPt zeigte, dass die *ser-1* und die *ser-4* Mutante eine ähnliche Pumpfrequenz aufwiesen wie der Wildtyp. Veränderungen an den Rezeptoren können zu Erkrankungen führen. So gehören z. B. reduzierte 5-HT Mengen und erhöhte 5-HT_{1A} Rezeptor Mengen zu den Begleiterscheinungen von kognitiven Erkrankungen [219]. Eine verminderte 5-HT Produktion oder erhöhte mRNA Expressionen der 5-HT-Rezeptoren konnten in der vorliegenden Arbeit nach CisPt Behandlung in *C. elegans* nicht beobachtet werden. Jedoch wäre denkbar, dass CisPt den SER-4 Rezeptor (Homolog des humanen 5-HT_{1A} Rezeptors) aktiviert wodurch es zu einer gesteigerten Rückkopplung von 5-HT aus dem synaptischen

Spalt kommt und weniger 5-HT zur Signalweiterleitung zur Verfügung steht. Dies könnte das verringerte Pumpverhalten in Gegenwart von *E. coli* erklären. Die unter Verwendung der *ser-4* Mutante erhaltenen Ergebnisse lassen diese Vermutung teilweise zu, da der Unterschied in der Pumpfrequenz zwischen unbehandelten und CisPt-behandelten Tieren bei der *ser-4* Mutante weniger stark ausgeprägt ist als beim Wildtyp. Dies konnte auch für die *ser-1* Mutante (Homolog des humanen 5-HT_{2B/C} Rezeptors) beobachtet werden. In einer Studie mit *knockout* Mäusen konnte eine Beteiligung serotonerger Mechanismen und speziell des 5-HT_{2A} Rezeptors bei der Ausbildung einer CIPN bestätigt werden [220]. Demnach könnte ebenfalls der SER-1 Rezeptor durch CisPt beeinträchtigt und dadurch das futter-induzierte Pumpen gestört werden. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse mit der *ser-7* Mutante weisen darauf hin, dass der SER-7 Rezeptor sehr wahrscheinlich eine herausragende Rolle in der CisPt-induzierten Neurotoxizität in *C. elegans* spielt. Eine Behandlung mit CisPt hatte keinen weiteren Einfluss auf das Pumpverhalten der *ser-7* Mutante. Die 5-HT_{1A} und 5-HT₇-Rezeptoren sind in die Phosphorylierung von Ca²⁺-Kanälen involviert. Der 5-HT_{1A} Rezeptor ist Gi/o Protein gekoppelt und eine Aktivierung dieses Autorezeptors hat eine Hemmung der Adenylylcyclase (AC) zur Folge und damit eine verminderte Menge an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) [139]. Der SER-7 Rezeptor wiederum ist ein Homolog des humanen Gs Protein gekoppelten 5-HT₇-Rezeptors [139], welcher in DRG Neuronen lokalisiert und mit der Nozizeption in Verbindung gebracht wird [221]. Die Gs Protein Untereinheit wirkt stimulierend auf die AC und damit auf die Bildung des cAMP [222]. Das gebildete cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die daraufhin die Ca²⁺-Kanäle phosphoryliert [223] und das cAMP-Response-Element-bindende (CREB) Protein aktiviert [140]. Auf den Transkriptionsfaktor CREB wird später im Rahmen des Einflusses von CisPt auf kognitive Prozesse genauer eingegangen. Eine CisPt-basierte Blockierung des SER-7 Rezeptors würde somit in *C. elegans* in einer verminderten cAMP Menge und einer Beeinträchtigung von *downstream* Prozessen resultieren. In der vorliegenden Arbeit zeigte die *ser-7* Mutante basal in Gegenwart von *E. coli* eine wildtypische Pumpfrequenz, während 5-HT die Pumprate stark reduziert. In der Literatur ist beschrieben, dass exogenes 5-HT das Pumpverhalten über den SER-7 Rezeptor stimuliert und dieser Rezeptor eine entscheidende Rolle beim hyperaktiven Pumpvorgang spielt [136, 141], jedoch nicht beim futterinduzierten Pumpen involviert ist [136]. Daher kann der SER-7 Rezeptor nicht mit dem hyperaktiven Pumpverhalten in Verbindung gebracht werden, welches die CisPt-behandelten Tiere in Gegenwart von 5 mM 5-HT aufwiesen. Eine mögliche Erklärung für den hyperaktiven Phänotyp könnten die Ergebnisse des pharyngealen Pumpens der *mod-5* Mutante liefern. Die Pumpfrequenz, welche bei der *mod-5* Mutante nach CisPt Behandlung beobachtet

werden konnte, ähnelt dem überkompensatorischen Effekt, der beim Wildtyp nach CisPt Inkubation in Gegenwart von 5 mM 5-HT und in Co-Inkubation mit 1 μ M Dulox in Gegenwart von *E. coli* beobachtet werden konnte. Deshalb ist es möglich, dass der Wiederaufnahmetransport von 5-HT aus dem synaptischen Spalt in *C. elegans* durch CisPt gehemmt wird und dies womöglich zu dem hyperaktivierten Pumpverhalten führt. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass eine Dysfunktion des 5-HT Wiederaufnahmetransporters in Mäusen zu einer Protektion vor einer Vincristin-ausgelösten Neuropathie führte [224].

Es wurde berichtet, dass eine chronische Behandlung mit SSRI die Aktivität des 5-HT_{1A} Rezeptors verringert und damit die negative Rückkopplung von 5-HT beeinflusst [225]. Dies könnte eine Ursache für die Überkompensation sein, die mit 1 μ M Dulox in Co-Inkubation mit CisPt beobachtet werden konnte. Die Blockierung von SER-4 und MOD-5 durch Dulox hätte somit eine erhöhte 5-HT Menge im synaptischen Spalt zur Folge, da das 5-HT nicht wieder in die präsynaptischen Nervenendigungen aufgenommen werden kann. Des Weiteren könnte die durch CisPt Behandlung gesteigerte mRNA Expression von *cat-4* hier auch eine Rolle spielen. Die Vermutung liegt nahe, dass durch die erhöhte *cat-4* Genexpression eine möglicherweise reduzierte 5-HT Menge im synaptischen Spalt kompensiert werden soll. Bei der Überprüfung der Gesamtmenge von 5-HT in den Nematoden konnte eine tendenzielle Erhöhung nach CisPt Behandlung beobachtet werden, die sich eventuell bei der Behandlung mit Dulox bemerkbar macht und zum überkompensatorischen Phänotyp beiträgt. Warum dies nur bei einer geringen ($\leq 10 \mu$ M) Dulox Konzentration zu beobachten war, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Die Ergebnisse der Co-Inkubation mit 5-HT könnten ebenfalls einen Hinweis darauf geben, dass in CisPt-behandelten Nematoden in Gegenwart des Pumpstimulus *E. coli* weniger 5-HT im synaptischen Spalt zur Verfügung steht und dies durch die Supplementierung mit 5-HT kompensiert werden konnte. Damit könnte die Theorie aufgestellt werden, dass es durch CisPt zu einer verminderten 5-HT Ausschüttung in den synaptischen Spalt kommt.

Nach den möglichen CisPt-vermittelten Einflüssen auf die 5-HT-Rezeptoren, der nachgeschalteten Signalweiterleitung von 5-HT-Rezeptoren und dem 5-HT Wiederaufnahmetransporter sollen nachfolgend die potentiellen Wirkungen von CisPt auf Prozesse der Signalübertragung im präsynaptischen Endknopf diskutiert werden. Die Annahme, dass CisPt einen Einfluss auf die 5-HT Signalweiterleitung/Freisetzung hat, ist nicht abwegig. So wird der Mechanismus einer weiteren durch CisPt-ausgelösten Nebenwirkung, der Chemotherapie-induzierten Nausea und Emesis (CINV), mit einer übermäßigen Freisetzung von 5-HT in Verbindung

gebracht [226]. In Mäusen wurde der Mechanismus der Ototoxizität nach CisPt Behandlung untersucht und festgestellt, dass die behandelten Tiere weniger synaptische Vesikel aufwiesen [227]. Die Autoren führen den Hörverlust auf eine Akkumulation von Ca^{2+} -Ionen in Zellen des Innenohrs zurück, wodurch es zu einer Dysfunktion der Calcium Signalübertragung und folglich zu einer insuffizienten Neurotransmitterfreisetzung kommt [227]. Außerdem wurde in einer weiteren Studie darüber berichtet, dass CarboPt die Freisetzung von DA und 5-HT in Gehirnregionen (Striatum) von Ratten verhindert und dies ursächlich für kognitive Beeinträchtigungen sein kann [228].

Wenn tatsächlich die Freisetzung von 5-HT durch CisPt betroffen ist, stellt sich die Frage warum nur die Freisetzung dieses Neurotransmitters eingeschränkt sein sollte. Dies könnte mit den unterschiedlichen Arten von synaptischen Vesikeln erklärt werden, in denen sich die Neurotransmitter befinden. GABA, ACh und Glu sind in sogenannte *small clear vesicles* (kleine klare Vesikel, SCV) und Neuropeptide sowie DA und 5-HT werden in *dense core vesicles* (DCV) verpackt [229]. Die Vesikel unterscheiden sich in zweierlei Hinsicht, in ihrer Größe (DCV>SCV) und in dem Mechanismus, der zur Neurotransmitterfreisetzung führt [229]. Für die Ca^{2+} -abhängige Freisetzung der DCVs wird CAPS (Calcium-abhängiges Aktivatorprotein für Sekretion) benötigt. Das Homolog von CAPS in *C. elegans* ist UNC-31, welches im Pharynx, der Spermatheka und der Vulva exprimiert wird [230]. Die Lokalisation wurde mit einem GFP Reporterstamm untersucht und war vor allem dort deutlich, wo es synaptischen Kontakt gibt (Nervenring, ventraler und dorsaler Nervenstrang) [230] und besonders an cholinergen Motorneuron Synapsen [231]. In den Studien wurde gezeigt, dass UNC-31 an der Exozytose von DCVs und der nachfolgenden Aktivierung des Gs Rezeptor vermittelten Signalwegs involviert ist [230, 231]. Dies verdeutlicht wieder die Verbindung zum zuvor erwähnten SER-7 Rezeptor, welcher in der vorliegenden Arbeit in *C. elegans* durch CisPt beeinträchtigt wurde. Ein Einfluss von CisPt auf UNC-31 erscheint jedoch unwahrscheinlich, da in der Literatur beschrieben ist, dass die Pumpfrequenz der Mutante unverändert und zudem die Motilität stark erniedrigt ist, verglichen zum Wildtyp [231, 232]. Damit steht der Phänotyp der *unc-31* Mutante im Widerspruch zu den Resultaten, die mit CisPt erhoben wurden, da 100 μM CisPt das Pumpverhalten reduzieren ohne die Motilität zu beeinträchtigen [147].

Für die Weiterleitung von Aktionspotentialen ist der Einstrom von Ionen in den präsynaptischen Endknopf wichtig, um das Verschmelzen der mit Neurotransmitter gefüllten synaptischen Vesikel zu induzieren [233]. Charakteristisch für die durch OxaliPt-induzierte Neurotoxizität ist die durch die Abgangsgruppe Oxalat ausgelöste

Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen und die Blockierung spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle [76]. Die Komplexierung der Ca^{2+} -Ionen durch Oxalat und die Beeinträchtigung der Na^+ -Kanäle wird mit einer durch OxaliPt verlängerten Refraktärphase (Zeit währenddessen Na^+ -Kanäle nicht aktiviert werden können), der Übererregbarkeit und spontanen Nervenimpulsen assoziiert [77, 234]. Eine Hemmung der Na^+ -Kanäle wurde für Cis- und CarboPt nicht beschrieben [76] und eine Ca^{2+} -Komplexierung ist bei CisPt eher unwahrscheinlich. Jedoch ist bekannt, dass CisPt die Ca^{2+} -Homöostase durch Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle beeinflusst [52]. Daher wäre eine Verlängerung der Refraktärphase nach CisPt Behandlung als Ursache für die reduzierte Pumpfrequenz und das gleichzeitig verlängerte IPI, welches während der elektrophysiologischen Messungen mit dem Pumpstimulus *E. coli* beobachtet werden konnte, denkbar. Warum keine verlängerte IPI nach OxaliPt Behandlung festgestellt werden konnte, könnte an dem unterschiedlichen neurotoxischen Potential und/oder verschiedenen Mechanismen beider Chemotherapeutika liegen. In Säugetieren wurden neun verschiedene Na^+ -Kanäle identifiziert ($\text{Nav}1.1$ – $\text{Nav}1.9$), wobei vor allem $\text{Nav}1.3$, $\text{Nav}1.7$, $\text{Nav}1.8$ und $\text{Nav}1.9$ im peripheren Nervensystem exprimiert werden. Fast alle Na^+ -Kanäle werden in irgendeiner Form mit neuropathischem Schmerz verbunden [235]. In einem diabetischen Neuropathie Modell und in einem Paclitaxel-basierten CIPN Ratten Modell konnten gesteigerte Mengen des $\text{Nav}1.7$ Kanals festgestellt werden [236]. In einigen Studien wird davon berichtet, dass Dulox seine protektive Wirkung durch eine Blockierung der $\text{Nav}1.7$ Kanäle entfaltet, wodurch die Weiterleitung von spontanen Nervenimpulsen verhindert wird [237]. *C. elegans* besitzt keine Na^+ -Kanäle [186], deshalb kann die neuroprotektive Wirkung von Dulox, die in dieser Arbeit auf die CisPt-ausgelöste Neurotoxizität beobachtet werden konnte, nicht auf einen Einfluss der Na^+ -Kanäle zurückgeführt werden. Aktionspotentiale werden in *C. elegans* durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (VGCC) generiert [186]. Aus diesem Grund wird den Ca^{2+} -Ionen und Kanälen nachfolgend besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Störungen von Ca^{2+} -Kanälen, Ca^{2+} -Transportern, Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -bindenden Proteinen können zu einer Depletion von cytosolischen Ca^{2+} -Ionen führen, was wiederum eine Reihe von Krankheiten auslösen kann [238]. Mutationen von im Nervensystem befindlichen VGCC können „ Ca^{2+} -Kanalopathien“ und Krankheiten, wie Lähmungen und Ataxien verursachen [238]. Die VGCCs spielen eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung des Aktionspotentials und ihre Beteiligung an neuropathischen Schmerzen wurde häufig beschrieben [239, 240]. Die VGCCs werden in verschiedene Subtypen (L-, T-, P/Q-, und N-Typ) unterteilt und besitzen verschiedene Lokalisationen und Funktionen [241]. In der Vergangenheit wurden bereits Einflüsse von CisPt auf VGCCs nachgewiesen. So waren die Ströme der L-,

T- und P/Q-Typ Kanäle erniedrigt und die Ströme des N-Typs während der Depolarisationsphase erhöht [241]. In *C. elegans* ist der T-Typ VGCC CCA-1 im Pharynx lokalisiert [186] und sorgt dort durch das Einströmen der Ca^{2+} -Ionen für die Signalweiterleitung zwischen MC Motorneuronen und pm4 Muskel [242]. In der Literatur ist beschrieben, dass CCA-1 ein Regulator der 5-HT Neuromodulation ist [243] und ein Verlust von *cca-1* zu einem verringerten Pumpverhalten führt [244]. Ein Einfluss von CisPt auf einen VGCC ist somit basierend auf der hier beobachteten verminderten Pumpfrequenz der CisPt-inkubierten Nematoden, in Gegenwart des Pumpstimulus *E. coli*, vorstellbar. N-Typ VGCCs sind in den präsynaptischen Endknöpfchen lokalisiert und an der Vesikelexozytose beteiligt [245]. Im Modellorganismus *C. elegans* ist der N-Typ VGCC UNC-2 im Nervensystem und dort vor allem in den AWC und HSN Neuronen, welche jeweils bei der Sensorik und der Eiablage mitwirken, ansässig und besonders bei der Freisetzung von ACh und GABA beteiligt [246]. In einer *in vivo* Studie mit Ratten wurde eine durch CisPt bedingte post-translationale Modifikation neuronaler N-Typ VGCC gezeigt, die in einer erhöhten Protein Menge der N-Typ VGCC bei unveränderter mRNA Expression und erhöhten Calcium Strömen resultierte [247]. Die Autoren gehen von einer funktionalen anstelle einer morphologischen Ursache für die CisPt-induzierte Neuropathie aus, da sie keine strukturellen Veränderungen in Ratten DRG beobachten konnten [247]. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass es sich bei der CisPt-ausgelösten Neurotoxizität in *C. elegans* um eine funktionelle statt einer morphologischen Beeinträchtigung handelt, da ebenfalls keine großen Unterschiede in der Pharynx Anatomie nach Platinbehandlung zu beobachten waren. Die Funktionsstörungen beim pharyngealen Pumpen und der Eiablage könnten somit möglicherweise ihren Ursprung in einer post-translationalen Modulation von serotonergen Faktoren oder ggf. in einer beeinträchtigten Ca^{2+} -Homöostase haben. Dies müsste in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden.

Der Einstrom von Ca^{2+} in die Präsynapse führt zur Aktivierung des SNARE Protein Komplexes, welcher aus den Proteinen Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin besteht, zur Exozytose der mit Neurotransmitter gefüllten synaptischen Vesikel an der präsynaptischen Membran [248] und der darauffolgenden Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt [249]. Die SNARE Proteine in *C. elegans* sind essentiell für die Viabilität der Nematoden und ein Verlust dieser Proteine resultiert in einem L1-Arrest [250]. Aus diesem Grund erscheint es unwahrscheinlich, dass CisPt SNARE Proteine beeinflusst, da sich die CisPt-behandelten Nematoden normal entwickelten. Das Protein Synaptotagmin ist in Vesikeln enthalten und reguliert die Vesikelfreisetzung [126]. Die *snt-1* (kodiert für Synaptotagmin) *C. elegans* Mutante zeigte in elektrophysiologischen Messungen

eine verlängerte Pumpdauer [126]. Eine verlängerte Pumpdauer war in CisPt-behandelten *C. elegans* in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zu beobachten. Dies impliziert, dass CisPt vermutlich keinen Einfluss auf Synaptotagmin hat.

Ein Einfluss von Cis- und OxaliPt auf die Mitochondrien wird als einer der Entstehungsgründe der CIPN angesehen [251]. Die Auswirkungen von mitochondrialen Schädigungen sind vielfältig. Durch die Ausbildung von Platin Addukten mit der mtDNA kommt es z. B. zu respiratorischen Funktionsstörungen, gesteigertem oxidativem Stress und der Aktivierung von Caspasen, die an der mitochondrialen Apoptose beteiligt sind [252]. In der Synapse sind Mitochondrien u. a. für die Aufrechterhaltung der Calcium- und ATP-Spiegel verantwortlich und haben somit einen Einfluss auf die Neurotransmission [253] - Störungen könnten eine Rolle bei der CIPN spielen [254, 255]. In der Vergangenheit wurden morphologische Veränderungen und eine gesteigerte mitochondriale ROS Produktion beobachtet [72, 256]. In kultivierten Ratten DRG konnte nach Cis- und OxaliPt Behandlung eine erhöhte ROS Produktion, funktionelle Beeinträchtigungen der Mitochondrien und eine erniedrigte Ca^{2+} -Ionen Konzentration in den Mitochondrien festgestellt werden [251]. In *C. elegans* konnte unsere Arbeitsgruppe jedoch keine gesteigerten ROS Level nach CisPt Behandlung nachweisen [147]. Schwann Zellen isolieren die Axone im PNS mit Myelin, wodurch die Weiterleitung des Aktionspotentials schneller abläuft [257]. Eine Beeinträchtigung der Schwann Zellen durch eine Therapie mit platinierenden Zytostatika wird mit der Ausbildung der CIPN assoziiert [258]. So konnte in Rattenversuchen beobachtet werden, dass Cis- und OxaliPt zu einer mitochondrialen Dysfunktion der Schwann Zellen führt, die unabhängig von morphologischen Schäden der Mitochondrien ist [258]. Des Weiteren konnten die Autoren eine gestörte Ausbildung von Myelin in Co-Kulturen von Schwann Zellen und DRG Neuronen nachweisen [258]. Die Neurone in *C. elegans* sind nicht myelinisiert [259], weshalb ein etwaiger Einfluss von CisPt auf Myelin nicht mit dem Modellorganismus *C. elegans* untersucht werden kann. Eine Demyelinisierung der peripheren Nerven wird ebenfalls mit der diabetischen Neuropathie verbunden [260, 261], was für die ähnliche Symptomatik der diabetischen Neuropathie und der CIPN spricht. Mitochondrien spielen demnach eine entscheidende pathologische Rolle bei der CIPN. Aus diesem Grund sollte der Einfluss von CisPt auf Mitochondrien in *C. elegans* in weiterführenden Versuchen näher untersucht werden.

In Abstimmung mit der Literatur und den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten könnte der durch CisPt-vermittelten Hemmung der serotonergen Neurotransmission eine Störung der VGCC und der Ca^{2+} -Homöostase zugrunde liegen.

4.4 Der Einfluss von CisPt auf SER-7 Rezeptoren kann ebenfalls ein Auslöser für die Lerndefizite sein

Experimentelle und klinische Studien haben gezeigt, dass CisPt zu einer kognitiven Dysfunktion in Tiermodellen und Patienten führt [200]. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit CisPt ein Lerndefizit in *C. elegans* verursacht. In 78 % der Patienten, die Chemotherapie erhalten, stellen sich kognitive Beeinträchtigungen ein [262], jedoch ist wie bei der CIPN auch der molekulare Mechanismus des *Chemobrain*s noch weitestgehend unverstanden [200]. Das PNS ist durch die Behandlung mit Chemotherapeutika besonders betroffen, da es nicht durch die BHS geschützt wird [45]. Trotzdem kann CisPt durch den Transporter CTR1 ins ZNS gelangen und zu kognitiven Beeinträchtigungen führen [263]. Es wird angenommen, dass CisPt nach dem Überwinden der BHS insbesondere die Oligodendrozyten schädigt [264], welche für die Ummantelung der Axone mit Myelin im ZNS verantwortlich sind. Die Myelinschicht sorgt für eine beschleunigte Reizweiterleitung des Aktionspotentials [257]. Eine Behandlung mit CisPt führte in Ratten zur Ausbildung einer zentralen und periphereren Neurotoxizität, welche sich jeweils in einem Erinnerungsdefizit, einer reduzierten Weiterleitung in sensorischen Nerven und morphologischen Veränderungen der DRG widerspiegelte [265]. Des Weiteren führte CisPt in Mäusen zu kognitiven Beeinträchtigungen und Hirnschäden, die sich in einer verringerten Anzahl dendritischer Dornen und neuronaler Verzweigungen sowie in Veränderungen der weißen Substanz widerspiegeln [266]. Strukturelle Abweichungen der Dendriten und der weißen Substanz nach Exposition mit Chemotherapeutika werden häufig beobachtet und mit der Ausbildung des *Chemobrain*s assoziiert [200, 252, 262], da die myelinisierten Axone in der weißen Substanz lokalisiert sind. Effektive Behandlungsmöglichkeiten für das *Chemobrain* sind bisher nicht vorhanden [200], ähnlich wie bei der CIPN. Eine Co-Inkubation mit 5-HT und Dulox konnte, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die durch CisPt ausgelösten Hemmungen beim pharyngealen Pumpen, jedoch nicht die Lerndefizite in *C. elegans* verhindern. Der fehlende kognitive Schutz durch Dulox könnte auf unterschiedliche molekulare Mechanismen hindeuten, die den Prozessen pharyngeales Pumpen, Eiablage und assoziatives Lernen zugrunde liegen und durch CisPt geschädigt werden. So konnte eine gleichzeitige Behandlung mit dem Antidiabetikum Metformin der Ausbildung von kognitiven Schäden sowie einer CIPN vorbeugen [266], [267]. Die Schädigung der Mitochondrien wird nicht nur als Auslöser für die CIPN angesehen, sondern gilt auch als Schlüsselement der kognitiven Beeinträchtigungen nach einer CisPt Therapie [251, 252, 256, 266]. Die protektiven Wirkungen von Metformin in Bezug auf

Chemobrain und CIPN beruhen demnach auf dem Schutz mitochondrialer Strukturen und der Prävention CisPt-induzierter mitochondrialer Schäden [268].

Erinnerungsverlust und ein gestörtes Lernverhalten sind auch charakteristisch für das klinische Bild anderer neurokognitiver Erkrankungen, wie der Alzheimer Krankheit [269]. Die kognitiven Beeinträchtigungen die mit einer Alzheimer Krankheit einhergehen, werden mit Störungen des serotonergen Systems assoziiert und durch Verlust des 5-HT Transporters begründet [270]. Ohne 5-HT Transporter ist die serotonerge Neurotransmission insuffizient, was einen direkten Einfluss auf die Freisetzung anderer Neurotransmitter hat, wie Glu, ACh und DA [270]. Dies stimmt mit der zuvor geäußerten Hypothese überein, dass vorrangig serotonerge Mechanismen durch CisPt beeinträchtigt werden und 5-HT die kritische Variable in der CisPt-vermittelten Neurotoxizität in *C. elegans* zu sein scheint. Eine etwaige verringerte Menge an beteiligten 5-HT-Rezeptoren wurde im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit diskutiert [270]. Eine veränderte mRNA Expression der 5-HT-Rezeptoren konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Jedoch zeigt sich durch die elektrophysiologischen Messungen mit der *ser-7* Mutante, dass der SER-7 Rezeptor eine entscheidende Funktion bei der CisPt-vermittelten Hemmung der Pumpfrequenz innehat. Tatsächlich wird dem 5-HT₇ Rezeptor auch eine gewisse Rolle in der Funktion des ZNS zugesprochen, u. a. die Nozizeption und das Erinnerungsvermögen, wodurch dieser Rezeptor auch als therapeutisches Ziel für die Behandlung von Erinnerungsdefiziten dient [221]. Dies deutet darauf hin, dass der SER-7 Rezeptor in *C. elegans* am Lernverhalten beteiligt sein könnte. Diese These wird auch dadurch gestützt, dass das Lernen von *C. elegans* 5-HT-abhängig ist [202]. Die CisPt-induzierte Beeinträchtigung des Lernverhaltens in *C. elegans* könnte demnach, wie auch die CisPt-ausgelöste Störung des Pump- und Eiablagevorgangs, von 5-HT abhängen. Weiterhin erscheint für die CisPt-induzierten kognitiven Defizite in *C. elegans* ein Einfluss von CisPt auf die Ca²⁺-Homöostase möglich, da durch eine beeinträchtigte serotonerge Neurotransmission die Aktivierung des CREB betroffen ist, was wiederum Auswirkungen auf die Plastizität und Funktionalität der Synapse hat [270]. Das CREB fungiert als Transkriptionsfaktor und spielt u. a. in Menschen, *Drosophila*, Nagern und *C. elegans* eine Rolle beim Langzeit-Lernen [271, 272]. Eine erhöhte Ca²⁺-Ionen oder cAMP Konzentration kann zu einer erhöhten Aktivität von CREB führen [271], wohingegen ein CREB *knockout* in Mäusen Defizite sowohl beim Kurzzeit- als auch beim Langzeit-Lernen zur Folge hatte [273]. Die in der vorliegenden Arbeit mit CisPt behandelten *C. elegans* zeigten keine Unterschiede in der naiven Gruppe (Hungern ohne Odorant). Erst nach der Konditionierung (Hungern und Benzaldehyd) wurde das CisPt-induzierte Lerndefizit deutlich. Dieser Befund ist vergleichbar mit dem Phänotyp der in der Literatur

beschriebenen *C. elegans crh-1* Mutante (CREB Homolog), die ebenfalls in Gegenwart von Benzaldehyd einen unveränderten CI aufwies, jedoch gravierende Defizite im Langzeit-Lernen (mehrere aufeinanderfolgende Konditionierungen) hatte, verglichen mit der Kontrollpopulation [272]. Eine einmalige Konditionierung hatte in dieser Studie jedoch keinen Einfluss auf das Lernen der *crh-1* Mutante [272]. Trotzdem könnte eine Verbindung zwischen der hier gezeigten CisPt-ausgelösten verminderten Lernleistung und einer gestörten Calcium Signalweiterleitung bestehen. Deshalb müsste das Lerndefizit nach Platinbehandlung in Folgeversuchen in Hinblick auf cAMP und CREB näher untersucht werden.

Neben 5-HT ist auch DA am Lernvorgang in *C. elegans* beteiligt [202-204]. Es gibt Belege, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) bei Patienten, die eine Krebserkrankung überlebt haben, zur Ausbildung des *Chemobrain*s beitragen [200, 274]. Die COMT sind beim Abbau von DA, Adrenalin und Noradrenalin beteiligt [200]. In *C. elegans* wird DA, jedoch kein Adrenalin und Noradrenalin gebildet [138, 186]. Der *Learning Assay* in der vorliegenden Arbeit nach Platinbehandlung zeigte, dass das Lernverhalten besonders nach einer Exposition mit CisPt in *C. elegans* verringert war. Die DA Mutante *cat-2*, welche als Positivkontrolle fungierte, zeigte ein weniger stark ausgeprägtes Lerndefizit als der CisPt-behandelte Wildtyp. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der DA Mutante machen deutlich, dass die durch CisPt verursachten Lerndefizite in *C. elegans* nicht ausschließlich auf eine verminderte 5-HT Neurotransmission zurückzuführen sind. So konnte z. B. eine reduzierte AChE Aktivität nach einer CisPt Inkubation in Ratten festgestellt werden [275]. In Übereinstimmung hiermit war die mRNA Expression von *ace-1* in *C. elegans* nach einer CisPt Behandlung reduziert. Somit wäre denkbar, dass eine veränderte AChE Aktivität einen Einfluss auf die Lernfähigkeit von *C. elegans* hat. Auch DA könnte eine Rolle bei den CisPt-ausgelösten kognitiven Defiziten spielen, da bereits in Vorarbeiten eine qualitative Veränderung der Leuchtkraft der dopaminergen Neurone nach CisPt Exposition beobachtet werden konnte [147]. Eine Beteiligung von DA beim pharyngealen Pumpen konnte anhand der elektrophysiologischen Ergebnisse der *cat-2* Mutante in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden.

Das Ausbleiben eines neurokognitiven Schutzes durch eine Co-Inkubation mit Dulox - bei gleichzeitiger Verbesserung des Pump- und Eiablageverhaltens - macht die Komplexität des Lernens in *C. elegans* deutlich. Eine abschließende Erklärung zu molekularen Mechanismen, die ursächlich für das CisPt-verursachte Lerndefizit in *C. elegans* sind, kann somit nicht getroffen werden.

4.5 *C. elegans* als Modellorganismus für die CIPN

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zur sensorischen Wahrnehmung deuten darauf hin, dass die Chemosensorik in *C. elegans* nicht durch eine Behandlung mit CisPt gestört wird. Charakteristische Symptome, die Patienten nach einer CisPt-basierten Chemotherapie mit einer manifestierten CIPN aufweisen, sind sensorische Wahrnehmungsstörungen [47]. Deshalb stellt sich die Frage, ob *C. elegans* als Modellorganismus für die Untersuchung des Pathomechanismus der CIPN geeignet ist. Grundsätzlich kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die CisPt-behandelten Tiere keine sensorischen Probleme haben. Schließlich wurden lediglich drei Amphidneurone bezüglich ihrer Funktionalität überprüft. Ob evtl. andere chemosensorische Neurone nach einer Behandlung mit den eingesetzten Platinanaloga dysfunktional sind, kann daher nicht beurteilt werden. Die hier untersuchten Neurone (AWA, AWB und AWC) sind vorrangig an der Nahrungssuche und -wahrnehmung beteiligt und wurden deshalb für die Untersuchungen ausgewählt. Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse des Chemotaxis Assay und der Analyse der Mechanosensorik kann demnach geschlussfolgert werden, dass die fürs Überleben notwendigen Funktionen, wie Nahrungssuche und das Spüren von mechanosensorischen Einwirkungen funktional und die CisPt-behandelten Nematoden diesbezüglich nicht geschädigt sind. Durch den Versuchsaufbau kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass feine Unterschiede in der Sensorik zwischen unbehandelten und behandelten Tieren vorliegen. Die Futter- und chemosensorische Wahrnehmung nach Platinbehandlung wurde mittels *Food Attraction* und Chemotaxis Assay jeweils nach 2 h überprüft. Möglicherweise hätten innerhalb dieser Zeit Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Nematoden beobachtet werden können, wenn engmaschigere Überprüfungen der Versuchstiere, z. B. alle 15 Minuten, durchgeführt worden wären. So hätte ggf. festgestellt werden können, ob Platin-behandelte Nematoden den Bakterienrasen (*Food Attraction*) oder den Attraktant (Chemotaxis) später erreichen als die unbehandelten Kontrolltiere. Im Vergleich dazu erlauben die Untersuchungen des pharyngealen Pumpens mittels elektrophysiologischer Methodik genauere Untersuchungen, da innerhalb kurzer Zeit jeder Pumpvorgang analysiert werden kann. Des Weiteren gibt es auch verschiedene Schweregrade (0-4/5) in die eine vorliegende CIPN eingeteilt wird. Die Schwere einer CIPN kann von leicht (Grad 1) über schwerwiegend (Grad 4) bis zum Tod (Grad 5) reichen [42]. Demnach könnte in dem hier vorliegenden Sachverhalt evtl. eine leichte CIPN bei den Platin-behandelten Nematoden vorliegen, weshalb bei den durchgeführten Versuchen keine signifikanten Unterschiede zu sehen waren.

Letztlich kann zum jetzigen Zeitpunkt vermutet werden, dass 5-HT an der CisPt-ausgelösten Neurotoxizität in *C. elegans* beteiligt ist. Dadurch, dass das einzig bisher empfohlene CIPN Medikament Dulox ebenfalls die CisPt-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans* verhindern kann, wird die Eignung von *C. elegans* als 3R-konformes *in vivo* Modell für die Entschlüsselung des der CIPN zugrundeliegenden Mechanismus deutlich. Basierend auf den generierten Ergebnissen mit Dulox kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei der CisPt-induzierten Neurotoxizität in *C. elegans* und im Menschen um einen ähnlichen Pathomechanismus handeln kann. Abschließend kann geschlussfolgert werden, dass es mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen möglich ist, die Platin-basierte Neurotoxizität im Modellorganismus *C. elegans* weiter zu untersuchen, um letztendlich human relevante neuroprotektive Maßnahmen zur Linderung der Platin-induzierten Neuropathie entwickeln zu können.

4.6 Modell für die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans*

Die Einflussmöglichkeiten onkologisch relevanter Platinanaloga auf die neuronale Signalweiterleitung sind mannigfaltig und konnten im Rahmen dieser Dissertation nicht vollumfänglich und im Detail betrachtet werden. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch CisPt vielmehr serotonerge als cholinerge oder glutamaterge Mechanismen beeinträchtigt zu sein scheinen. Anhand der generierten Ergebnisse und unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Datenlage wird folgender Mechanismus (Abb. 25) für die CisPt-ausgelöste Neurotoxizität im Modellorganismus *C. elegans* angenommen.

CisPt beeinträchtigt die neuromuskuläre Pharynxaktivität von *C. elegans* vorrangig durch Hemmung des SER-7 Rezeptors, welcher in den NSM, MC und M3 Neuronen lokalisiert ist (Abb. 25a). Neben der Hemmung des SER-7 Rezeptors könnte CisPt auch den SER-4 Rezeptor aktivieren, wodurch die Menge an 5-HT im synaptischen Spalt reduziert werden würde (Abb. 25b). Dadurch könnte es zu einer insuffizienten serotonergen Neurotransmission und damit zu einem reduzierten Kontraktions- und Relaxationszyklus in Gegenwart des Pumpstimulus *E. coli* kommen. Bei dem beobachteten hyperaktiven Pumpverhalten der Platin-behandelten Nematoden in Gegenwart von 5-HT scheint der Wiederaufnahmetransporter MOD-5 eine entscheidende Rolle zu spielen.

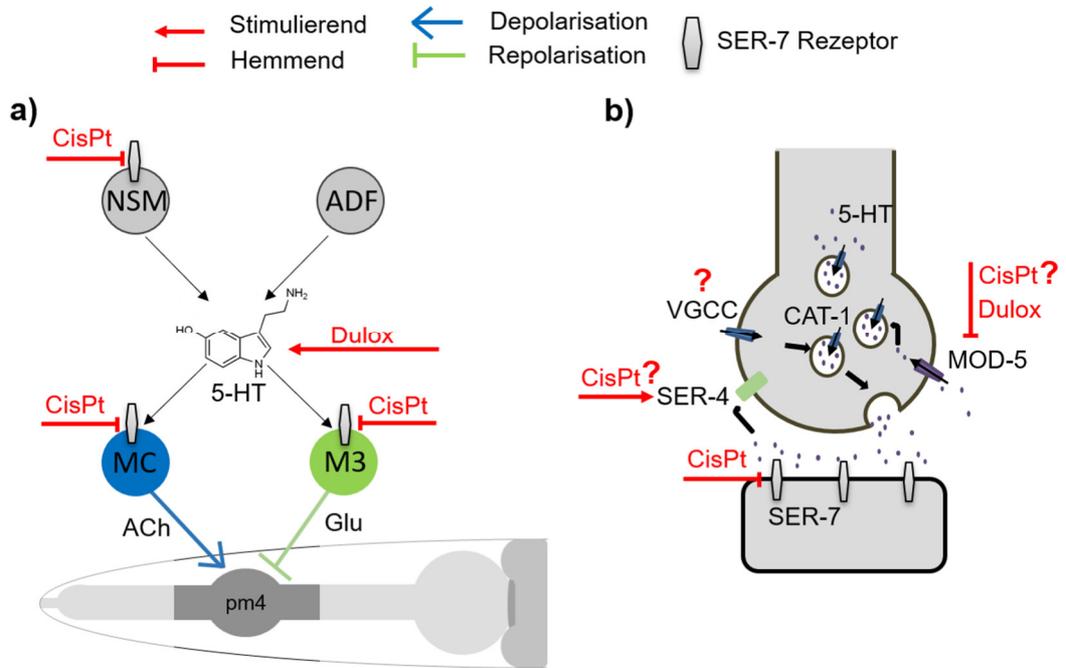


Abb. 25: Möglicher Mechanismus der Cisplatin-ausgelösten Neurotoxizität in *C. elegans*.

Anhand der generierten Ergebnisse wird angenommen, dass CisPt die serotonerge Neurotransmission in *C. elegans* beeinflusst. a) Der SER-7 Rezeptor, welcher in den NSM, MC und M3 Neuronen lokalisiert ist, wird von CisPt blockiert und nimmt so großen Einfluss auf das Pumpverhalten. b) Möglicherweise wird der SER-4 Autorezeptor durch CisPt aktiviert und dies führt zu einem vermehrten Entfernen von 5-HT aus dem synaptischen Spalt. Des Weiteren wird MOD-5 womöglich durch CisPt gehemmt, wodurch das hyperaktive Pumpverhalten der CisPt-behandelten Nematoden in Gegenwart von 5-HT induziert wird. Dies wird durch die Ergebnisse der Co-Inkubation mit 1 μM Dulox gestützt, da die co-inkubierten Nematoden einen ähnlichen überkompensatorischen Effekt wie die CisPt-behandelte *mod-5* Mutante aufwiesen.

5. Ausblick

In nachfolgenden Arbeiten sollte vor allem die Involvierung der Mitochondrien in der CisPt-vermittelten Neurotoxizität untersucht werden. Die in der Diskussion erwähnten publizierten Studien legen nahe, dass Mitochondrien eine besondere Rolle bei der CIPN und dem *Chemobrain* spielen. Aus diesem Grund sollte die Funktionalität der Mitochondrien nach CisPt Behandlung untersucht werden. Mit den Farbstoffen MitoTracker Green FM und MitoTracker Red CM-H2XROS können jeweils die mitochondriale Masse, das mitochondriale Membranpotential sowie die durch Mitochondrien produzierten ROS bestimmt werden [276]. Die ROS Bestimmung wäre nach einer Exposition mit CisPt von besonderer Wichtigkeit in Hinblick auf die in der Literatur beschriebene Assoziation von ROS Produktion und der Ausbildung der CIPN. Als oxidativer Stressmarker könnte z.B. das Phospholipid Cardiolipin dienen, welches in der inneren Mitochondrienmembran ansässig ist. Mittels chromatographischer Methoden kann oxidiertes Cardiolipin bestimmt werden [277]. Mitochondrial erzeugtes Superoxid kann zudem spezifisch mit der MitoSOX™ Red Reagenz nachgewiesen werden, da durch Oxidation der Substanz die rote Fluoreszenz erzeugt wird [278]. Des Weiteren besteht mit der Seahorse Methode die Möglichkeit die mitochondriale Respiration in *C. elegans* zu begutachten [279, 280]. Da die Mitochondrien die „Kraftwerke der Zellen“ sind, ist es sinnvoll energierelevante Nukleotide, wie ATP, ADP, cAMP, NAD⁺ und NADH nach einer CisPt Behandlung mittels chromatographischer Methoden oder Kits zu bestimmen [276, 281-283].

Um die in der Diskussion geäußerte These zu bestätigen, dass TRP Kanäle keine entscheidende Rolle bei der CisPt-vermittelten Neurotoxizität in *C. elegans* spielen, sollte die mRNA Expression der TRP Kanäle nach CisPt Exposition ermittelt werden. Für elektrophysiologische Untersuchungen mit dem ScreenChip™ System von Nematatrix (InVivo Biosystems) stehen auch Mutanten zur Verfügung [186].

Außerdem sollte der Fokus auf die Freisetzung von 5-HT aus synaptischen Vesikeln nach CisPt Inkubation gelegt werden. Dazu können verschiedene Mutanten [250] bei elektrophysiologischen Messungen eingesetzt und in einem qPCR Ansatz parallel die mRNA Expression der beteiligten Gene überprüft werden. Auch die eventuelle Beteiligung der VGCCs in der CisPt-vermittelten Neurotoxizität sollte mit Hilfe von Mutanten [186] untersucht werden. Außerdem könnten verschiedene pharmakologische Inhibitoren von VGCC Subtypen eingesetzt werden, wie z. B. Verapamil (L-Typ), Zonisamid (T-Typ) und ω -Conotoxin (N-Typ).

Der Einsatz des SSNRI Dulox hatte im Rahmen dieser Arbeit neuroprotektive Effekte vor einer durch CisPt ausgelösten Neurotoxizität. Als Negativkontrolle könnte ein

selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) eingesetzt werden, um den vermuteten 5-HT-abhängigen Effekt von Dulox zu verifizieren. Ein möglicher Inhibitor ist das Antidepressivum Reboxetin, welches bereits Paclitaxel-ausgelöste CIPN Symptome in Ratten lindern konnte [284]. Sinnvoll ist der Einsatz von 5-HT Rezeptor-Antagonisten, um den Einfluss von CisPt auf SER-4 (aktivierend) und SER-7 (hemmend) Rezeptor-regulierte Signalmechanismen zu bekräftigen. In nachfolgenden Versuchen könnten weitere potentiell neuroprotektive Substanzen eingesetzt werden, wie das Antidiabetikum Metformin, welches bereits in Nager Studien protektiv gegen CIPN und das *Chemobrain* wirkte [266, 267]. Die protektiven Effekte von Metformin beruhen vermutlich auf einer Verbesserung der mitochondrialen Funktion [268], was die Notwendigkeit der Überprüfung der Einflüsse von CisPt auf die Mitochondrien bestärkt. Aus diesem Grund sollten auch Histondeacetylase 6 (HDAC6) - im mitochondrialen Transport involviert - Inhibitoren untersucht werden, da ebenfalls protektive Wirkungen gegen CisPt-induzierte CIPN und kognitive Dysfunktionen in Mäusen beschrieben wurden [285-287].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine durch CisPt-vermittelte Störung der Neurotransmitter ACh und Glu ausgeschlossen. Mit dem ACh Esterase Inhibitor Aldicarb wird die Menge an ACh im synaptischen Spalt erhöht. Bei wildtypischen Nematoden führt eine Behandlung mit Aldicarb zu einer Paralyse, wohingegen *C. elegans* Mutanten mit einer Störung der ACh Neurotransmission keine Paralysisierung aufweisen [288]. Somit könnte mit der zuvor genannten Methode auch die in dieser Arbeit geäußerte Hypothese überprüft werden, dass CisPt keinen Einfluss auf die ACh-vermittelte Neurotransmission hat. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch der Einsatz von Glutamat-Rezeptor Antagonisten, wie Ketamin, welches ebenfalls vor neuropathischen Schmerzen schützen kann [289].

Wenn die durch CisPt-verursachten neurokognitiven Schäden in *C. elegans* näher untersucht werden sollen, wäre ein *Learning Assay* mit der *chr-1* Mutante (humaner CREB Homolog) empfehlenswert, da dem CREB eine Rolle beim Langzeit-Lernen zugesprochen wird. Es könnten ebenfalls verschiedene Ansätze zur Überprüfung der Lernfähigkeit ausprobiert werden [272, 290].

Neben platinierenden Substanzen gibt es noch weitere CIPN-auslösende Chemotherapeutika, wie Paclitaxel und Vincristin [9], welche ebenfalls in *C. elegans*, in Hinblick auf die serotonerge Neurotransmission, untersucht werden könnten. In Zukunft sollte der 3R-konforme Modellorganismus ebenfalls für die Identifizierung von neuen potentiell neuroprotektiven Substanzen eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Schmidt, J., *Weltweit häufigste Todesursache: Überholt Krebs kardiovaskuläre Erkrankungen?* CardioVasc, 2019(19).
2. WHO, *WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all*. 2020.
3. RKI, *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. 2019. **12**.
4. DeVita, V.T., Jr. and S.A. Rosenberg, *Two hundred years of cancer research*. N Engl J Med, 2012. **366**(23): p. 2207-14.
5. Schwabe, U. and W.-D. Ludwig, *Onkologika*, in *Arzneiverordnungs-Report 2020*. 2020, Springer.
6. Kelland, L., *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(8): p. 573-84.
7. Chiorazzi, A., S. Semperboni, and P. Marmiroli, *Current View in Platinum Drug Mechanisms of Peripheral Neurotoxicity*. Toxics, 2015. **3**(3): p. 304-321.
8. Bowden, N.A., *Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy?* Cancer Lett, 2014. **346**(2): p. 163-71.
9. Windebank, A.J. and W. Grisold, *Chemotherapy-induced neuropathy*. J Peripher Nerv Syst, 2008. **13**(1): p. 27-46.
10. Rabik, C.A. and M.E. Dolan, *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents*. Cancer Treat Rev, 2007. **33**(1): p. 9-23.
11. McWhinney, S.R., R.M. Goldberg, and H.L. McLeod, *Platinum neurotoxicity pharmacogenetics*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(1): p. 10-6.
12. Lokich, J. and N. Anderson, *Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature*. Ann Oncol, 1998. **9**(1): p. 13-21.
13. Kuebler, J.P., et al., *Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07*. J Clin Oncol, 2007. **25**(16): p. 2198-204.
14. Ghosh, S., *Cisplatin: The first metal based anticancer drug*. Bioorg Chem, 2019. **88**: p. 102925.
15. Wang, D. and S.J. Lippard, *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(4): p. 307-20.
16. Pinto, A.L. and S.J. Lippard, *Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA*. Biochim Biophys Acta, 1985. **780**(3): p. 167-80.
17. Cavaletti, G., et al., *Neuronal drug transporters in platinum drugs-induced peripheral neurotoxicity*. Anticancer Res, 2014. **34**(1): p. 483-6.
18. Desoize, B. and C. Madoulet, *Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **42**(3): p. 317-25.
19. Knox, R.J., et al., *Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA*. . Cancer Research, 1986.
20. Fichtinger-Schepman, A.M., et al., *Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation*. Biochemistry, 1985. **24**(3): p. 707-13.
21. Chaney, S.G., et al., *Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function*. J Inorg Biochem, 2004. **98**(10): p. 1551-9.
22. Jamieson, E.R. and S.J. Lippard, *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts*. Chem Rev, 1999. **99**(9): p. 2467-98.
23. Florea, A.M. and D. Busselberg, *Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects*. Cancers (Basel), 2011. **3**(1): p. 1351-71.
24. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis*. Cancer Lett, 2013. **332**(2): p. 237-48.
25. Raymond, E., et al., *Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(3): p. 227-35.
26. Tanida, S., et al., *Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment*. Int J Surg Oncol, 2012. **2012**: p. 862879.

27. Spivak, G., *Nucleotide excision repair in humans*. DNA Repair (Amst), 2015. **36**: p. 13-18.
28. Gillet, L.C. and O.D. Scharer, *Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair*. Chem Rev, 2006. **106**(2): p. 253-76.
29. McKeage, M.J., *Comparative adverse effect profiles of platinum drugs*. Drug Saf, 1995. **13**(4): p. 228-44.
30. Hayes, D.M., et al., *High dose cis-platinum diammine dichloride: amelioration of renal toxicity by mannitol diuresis*. Cancer, 1977. **39**(4): p. 1372-81.
31. Bayo, J., et al., *Chemotherapy-induced nausea and vomiting: pathophysiology and therapeutic principles*. Clin Transl Oncol, 2012. **14**(6): p. 413-22.
32. Boussios, S., et al., *Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: incidence, clinical presentation and management*. Ann Gastroenterol, 2012. **25**(2): p. 106-118.
33. Stojanovska, V., et al., *Neurotoxicity Associated with Platinum-Based Anti-Cancer Agents: What are the Implications of Copper Transporters?* Curr Med Chem, 2017. **24**(15): p. 1520-1536.
34. Billio, A., E. Morello, and M.J. Clarke, *Serotonin receptor antagonists for highly emetogenic chemotherapy in adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(1): p. 1-101.
35. Ranganath, P., L. Einhorn, and C. Albany, *Management of Chemotherapy Induced Nausea and Vomiting in Patients on Multiday Cisplatin Based Combination Chemotherapy*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 1-8.
36. Landier, W., *Ototoxicity and cancer therapy*. Cancer, 2016. **122**(11): p. 1647-58.
37. Oun, R., Y.E. Moussa, and N.J. Wheate, *The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists*. Dalton Trans, 2018. **47**(19): p. 6645-6653.
38. Johnson, C., et al., *Candidate pathway-based genetic association study of platinum and platinum-taxane related toxicity in a cohort of primary lung cancer patients*. J Neurol Sci, 2015. **349**(1-2): p. 124-8.
39. Cassidy, J. and J.L. Misset, *Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management*. Semin Oncol, 2002. **29**(5 Suppl 15): p. 11-20.
40. Kerckhove, N., et al., *Long-Term Effects, Pathophysiological Mechanisms, and Risk Factors of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathies: A Comprehensive Literature Review*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 86.
41. Staff, N.P., et al., *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review*. Ann Neurol, 2017. **81**(6): p. 772-781.
42. Stubblefield, M.D., et al., *NCCN task force report: management of neuropathy in cancer*. J Natl Compr Canc Netw, 2009. **7 Suppl 5**: p. S1-S26; quiz S27-8.
43. Podratz, J.L., et al., *Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons*. Neurobiol Dis, 2011. **41**(3): p. 661-8.
44. Wolf, S., et al., *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies*. Eur J Cancer, 2008. **44**(11): p. 1507-15.
45. Hildebrand, J., *Neurological complications of cancer chemotherapy*. Curr Opin Oncol, 2006. **18**(4): p. 321-4.
46. Grisold, W., G. Cavaletti, and A.J. Windebank, *Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention*. Neuro Oncol, 2012. **14 Suppl 4**: p. iv45-54.
47. Roelofs, R.I., et al., *Peripheral sensory neuropathy and cisplatin chemotherapy*. Neurology, 1984. **34**(7): p. 934-8.
48. Wolf, S.L., et al., *The relationship between numbness, tingling, and shooting/burning pain in patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) as measured by the EORTC QLQ-CIPN20 instrument, N06CA*. Support Care Cancer, 2012. **20**(3): p. 625-32.
49. Grothey, A., *Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity*. Semin Oncol, 2003. **30**(4 Suppl 15): p. 5-13.
50. Pietrangeli, A., et al., *Persistence of high-dose oxaliplatin-induced neuropathy at long-term follow-up*. Eur Neurol, 2006. **56**(1): p. 13-6.
51. Park, S.B., et al., *Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility*. Oncologist, 2011. **16**(5): p. 708-16.
52. Hartmann, J.T. and H.P. Lipp, *Toxicity of platinum compounds*. Expert Opin Pharmacother, 2003. **4**(6): p. 889-901.
53. Quasthoff, S. and H.P. Hartung, *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. J Neurol, 2002. **249**(1): p. 9-17.

54. Flatters, S.J.L., P.M. Dougherty, and L.A. Colvin, *Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): a narrative review*. Br J Anaesth, 2017. **119**(4): p. 737-749.
55. Ma, J., et al., *Beyond symptomatic relief for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Targeting the source*. Cancer, 2018. **124**(11): p. 2289-2298.
56. Staff, N.P., et al., *Platinum-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment*. J Peripher Nerv Syst, 2019. **24 Suppl 2**: p. S26-S39.
57. Lunn, M.P., R.A. Hughes, and P.J. Wiffen, *Duloxetine for treating painful neuropathy or chronic pain*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(4): p. 1-121.
58. Smith, T. and R.A. Nicholson, *Review of duloxetine in the management of diabetic peripheral neuropathic pain*. Vasc Health Risk Manag, 2007. **3**(6): p. 833-44.
59. Smith, E.M., et al., *Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial*. JAMA, 2013. **309**(13): p. 1359-67.
60. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF). *Supportive Therapie bei onkologischen PatientInnen - Langversion 1.3*. 2020 13.Juni.2021]; Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/supportive-therapie/>.
61. Hershman, D.L., et al., *Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline*. J Clin Oncol, 2014. **32**(18): p. 1941-67.
62. Meng, J., et al., *Duloxetine, a Balanced Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitor, Improves Painful Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy by Inhibiting Activation of p38 MAPK and NF-kappaB*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 365.
63. Hu, L.Y., et al., *Prevention and Treatment for Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Therapies Based on CIPN Mechanisms*. Curr Neuropharmacol, 2019. **17**(2): p. 184-196.
64. Poirier, M.C., et al., *Persistence of platinum-amine-DNA adducts in gonads and kidneys of rats and multiple tissues from cancer patients*. Cancer Res, 1992. **52**(1): p. 149-53.
65. Gregg, R.W., et al., *Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity*. J Clin Oncol, 1992. **10**(5): p. 795-803.
66. McDonald, E.S., et al., *Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity*. Neurobiol Dis, 2005. **18**(2): p. 305-13.
67. Ta, L.E., et al., *Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding*. Neurotoxicology, 2006. **27**(6): p. 992-1002.
68. Gill, J.S. and A.J. Windebank, *Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2842-50.
69. Thompson, S.W., et al., *Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies*. Cancer, 1984. **54**(7): p. 1269-75.
70. Kirchmair, R., et al., *Antiangiogenesis mediates cisplatin-induced peripheral neuropathy: attenuation or reversal by local vascular endothelial growth factor gene therapy without augmenting tumor growth*. Circulation, 2005. **111**(20): p. 2662-70.
71. Nospikel, T. and P.C. Hanawalt, *DNA repair in terminally differentiated cells*. DNA Repair (Amst), 2002. **1**(1): p. 59-75.
72. Marullo, R., et al., *Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81162;1-15.
73. Bennett, G.J., T. Doyle, and D. Salvemini, *Mitotoxicity in distal symmetrical sensory peripheral neuropathies*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(6): p. 326-36.
74. Areti, A., et al., *Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 289-95.
75. Ta, L.E., et al., *Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice*. Mol Pain, 2010. **6**: p. 15.
76. Grolleau, F., et al., *A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels*. J Neurophysiol, 2001. **85**(5): p. 2293-7.

77. Kanat, O., H. Ertas, and B. Caner, *Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms*. World J Clin Oncol, 2017. **8**(4): p. 329-335.
78. Barriere, A. and M.A. Felix, *High local genetic diversity and low outcrossing rate in Caenorhabditis elegans natural populations*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1176-84.
79. Schulenburg, H. and M.A. Felix, *The Natural Biotic Environment of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2017. **206**(1): p. 55-86.
80. Stiernagle, T., *Maintenance of C. elegans*. WormBook, 2006.
81. Olsen, A., M.C. Vantipalli, and G.J. Lithgow, *Using Caenorhabditis elegans as a model for aging and age-related diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1067**: p. 120-8.
82. Markaki, M. and N. Tavernarakis, *Modeling human diseases in Caenorhabditis elegans*. Biotechnol J, 2010. **5**(12): p. 1261-76.
83. Alexander, A.G., V. Marfil, and C. Li, *Use of Caenorhabditis elegans as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases*. Front Genet, 2014. **5**: p. 279.
84. Apfeld, J. and S. Alper, *What Can We Learn About Human Disease from the Nematode C. elegans?* Methods Mol Biol, 2018. **1706**: p. 53-75.
85. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
86. Wu, Y. and Y. Luo, *Transgenic C. elegans as a model in Alzheimer's research*. Curr Alzheimer Res, 2005. **2**(1): p. 37-45.
87. Vistbakka, J., et al., *C. elegans as a genetic model system to identify Parkinson's disease-associated therapeutic targets*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012. **11**(8): p. 957-64.
88. Kaletta, T. and M.O. Hengartner, *Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(5): p. 387-98.
89. Chen, P., et al., *Metal-induced neurodegeneration in C. elegans*. Front Aging Neurosci, 2013. **5**: p. 18.
90. Cook, S.J., et al., *Whole-animal connectomes of both Caenorhabditis elegans sexes*. Nature, 2019. **571**(7763): p. 63-71.
91. Varshney, L.R., et al., *Structural properties of the Caenorhabditis elegans neuronal network*. PLoS Comput Biol, 2011. **7**(2): p. e1001066;1-21.
92. Bargmann, C.I. and E. Marder, *From the connectome to brain function*. Nat Methods, 2013. **10**(6): p. 483-90.
93. Sasakura, H. and I. Mori, *Behavioral plasticity, learning, and memory in C. elegans*. Curr Opin Neurobiol, 2013. **23**(1): p. 92-9.
94. Wixon, J., et al., *Caenorhabditis elegans*. Yeast, 2000. **17**(1): p. 37-42.
95. Schierenberg, E. and R. Cassada, *Der Nematode Caenorhabditis elegans — ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus* Biologie in unserer Zeit, 1986.
96. Hobert, O. and P. Loria, *Uses of GFP in Caenorhabditis elegans*. Methods Biochem Anal, 2006. **47**: p. 203-26.
97. Hedgecock, E.M., et al., *Axonal guidance mutants of Caenorhabditis elegans identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes*. Dev Biol, 1985. **111**(1): p. 158-70.
98. Ahringer, J., *Reverse genetics*. WormBook, 2006.
99. Dickinson, D.J. and B. Goldstein, *CRISPR-Based Methods for Caenorhabditis elegans Genome Engineering*. Genetics, 2016. **202**(3): p. 885-901.
100. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
101. Kamath, R.S. and J. Ahringer, *Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans*. Methods, 2003. **30**(4): p. 313-21.
102. Corsi, A.K., B. Wightman, and M. Chalfie, *A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2015. **200**(2): p. 387-407.
103. Chasnov, J.R. and K.L. Chow, *Why are there males in the hermaphroditic species Caenorhabditis elegans?* Genetics, 2002. **160**(3): p. 983-94.
104. White, J.G., et al., *The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1986. **314**(1165): p. 1-340.
105. Schafer, W., *Nematode nervous systems*. Curr Biol, 2016. **26**(20): p. R955-R959.
106. Altun, Z.F. and D.H. Hall, *Muscle system, somatic muscle*. WormAtlas, 2009.
107. Altun, Z.F. and D.H. Hall, *Muscle system, nonstriated muscle*. WormAtlas, 2009.
108. Altun, Z.F. and D.H. Hall, *Introduction*. WormAtlas, 2009.
109. Cassada, R.C. and R.L. Russell, *The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1975. **46**(2): p. 326-42.

110. Baugh, L.R. and P.J. Hu, *Starvation Responses Throughout the Caenorhabditis elegans Life Cycle*. Genetics, 2020. **216**(4): p. 837-878.
111. Herndon, L.A., et al., *Introduction to Aging in C. elegans*. WormAtlas, 2018.
112. Hobert, O., *Specification of the nervous system*. WormBook, 2005.
113. Leung, M.C., et al., *Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology*. Toxicol Sci, 2008. **106**(1): p. 5-28.
114. Hobert, O., L. Glenwinkel, and J. White, *Revisiting Neuronal Cell Type Classification in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2016. **26**(22): p. R1197-R1203.
115. Altun, Z.F. and D.H. Hall, *Nervous system, general description*. WormAtlas, 2011.
116. Hobson, R.J., K.J. Yook, and E.M. Jorgensen, *Genetics of Neurotransmitter Release in Caenorhabditis elegans*. 2017.
117. Bargmann, C.I., *Chemosensation in C. elegans*. WormBook, 2006.
118. Ware, R.W., et al., *The Nerve Ring of the Nematode Caenorhabditis elegans: Sensory Input and Motor Output*. The Journal of Comparative Neurology, 1975.
119. Song, B.M. and L. Avery, *The pharynx of the nematode C. elegans: A model system for the study of motor control*. Worm, 2013. **2**(1): p. e21833-4.
120. Trojanowski, N.F. and D.M. Raizen, *Neural Circuits: From Structure to Function and Back*. Curr Biol, 2015. **25**(16): p. R711-3.
121. Albertson, D.G. and J.N. Thomson, *The pharynx of Caenorhabditis elegans*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1976. **275**(938): p. 299-325.
122. Altun, Z.F. and D.H. Hall, *Alimentary System, Pharynx*. WormAtlas, 2009.
123. Avery, L. and Y.L. You, *C. elegans feeding*. WormBook, 2012.
124. Avery, L. and B.B. Shtonda, *Food transport in the C. elegans pharynx*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 14): p. 2441-57.
125. Raizen, D., et al., *Methods for measuring pharyngeal behaviors*. WormBook, 2012: p. 1-13.
126. Raizen, D.M. and L. Avery, *Electrical activity and behavior in the pharynx of Caenorhabditis elegans*. Neuron, 1994. **12**(3): p. 483-95.
127. Avery, L. and H.R. Horvitz, *Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of C. elegans*. Neuron, 1989. **3**(4): p. 473-85.
128. Niacaris, T. and L. Avery, *Serotonin regulates repolarization of the C. elegans pharyngeal muscle*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 2): p. 223-31.
129. Raizen, D.M., R.Y. Lee, and L. Avery, *Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1995. **141**(4): p. 1365-82.
130. Dent, J.A., M.W. Davis, and L. Avery, *avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in Caenorhabditis elegans*. EMBO J, 1997. **16**(19): p. 5867-79.
131. Avery, L., *Motor neuron M3 controls pharyngeal muscle relaxation timing in Caenorhabditis elegans*. J Exp Biol, 1993. **175**: p. 283-97.
132. Avery, L. and H.R. Horvitz, *A cell that dies during wild-type C. elegans development can function as a neuron in a ced-3 mutant*. Cell, 1987. **51**(6): p. 1071-8.
133. Li, Z., et al., *Dissecting a central flip-flop circuit that integrates contradictory sensory cues in C. elegans feeding regulation*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 776.
134. Axang, C., et al., *Developmental genetics of the C. elegans pharyngeal neurons NSML and NSMR*. BMC Dev Biol, 2008. **8**: p. 38.
135. Franks, C.J., et al., *Anatomy, physiology and pharmacology of Caenorhabditis elegans pharynx: a model to define gene function in a simple neural system*. Invert Neurosci, 2006. **6**(3): p. 105-22.
136. Lee, K.S., et al., *Serotonin-dependent kinetics of feeding bursts underlie a graded response to food availability in C. elegans*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14221;1-11.
137. Song, B.M., et al., *Recognition of familiar food activates feeding via an endocrine serotonin signal in Caenorhabditis elegans*. Elife, 2013. **2**: p. e00329;1-27.
138. Chase, D.L. and M.R. Koelle, *Biogenic amine neurotransmitters in C. elegans*. WormBook, 2007: p. 1-15.
139. Carre-Pierrat, M., et al., *Characterization of the Caenorhabditis elegans G protein-coupled serotonin receptors*. Invert Neurosci, 2006. **6**(4): p. 189-205.
140. Zhao, J., et al., *G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Alzheimer's Disease: A Focus on BACE1 Related GPCRs*. Front Aging Neurosci, 2016. **8**: p. 58.
141. Hobson, R.J., et al., *SER-7, a Caenorhabditis elegans 5-HT7-like receptor, is essential for the 5-HT stimulation of pharyngeal pumping and egg laying*. Genetics, 2006. **172**(1): p. 159-69.

142. Huang, C., C. Xiong, and K. Kornfeld, *Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8084-9.
143. Peterson, R.T., et al., *Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study*. Neurotoxicology, 2008. **29**(3): p. 546-55.
144. Kandarova, H. and S. Letasiova, *Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods*. Interdiscip Toxicol, 2011. **4**(3): p. 107-13.
145. Ju, J., et al., *Cyanobacterial xenobiotics as evaluated by a Caenorhabditis elegans neurotoxicity screening test*. Int J Environ Res Public Health, 2014. **11**(5): p. 4589-606.
146. Cole, R.D., G.L. Anderson, and P.L. Williams, *The nematode Caenorhabditis elegans as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **194**(3): p. 248-56.
147. Wellenberg, A., et al., *Use of C. elegans as a 3R-compliant in vivo model for the chemoprevention of cisplatin-induced neurotoxicity*. Exp Neurol, 2021: p. 341:113705.
148. Helmcke, K.J., D.S. Avila, and M. Aschner, *Utility of Caenorhabditis elegans in high throughput neurotoxicological research*. Neurotoxicol Teratol, 2010. **32**(1): p. 62-7.
149. Boyd, W.A., et al., *The effects of metals and food availability on the behavior of Caenorhabditis elegans*. Environ Toxicol Chem, 2003. **22**(12): p. 3049-55.
150. Meyer, D. and P.L. Williams, *Toxicity testing of neurotoxic pesticides in Caenorhabditis elegans*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2014. **17**(5): p. 284-306.
151. Trojanowski, N.F., D.M. Raizen, and C. Fang-Yen, *Pharyngeal pumping in Caenorhabditis elegans depends on tonic and phasic signaling from the nervous system*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22940;1-10.
152. Goodman, M.B., et al., *Electrophysiological methods for Caenorhabditis elegans neurobiology*. Methods Cell Biol, 2012. **107**: p. 409-36.
153. Avery, L., D. Raizen, and S. Lockery, *Electrophysiological methods*. Methods Cell Biol, 1995. **48**: p. 251-69.
154. Russell, J.C., et al., *Electrophysiological Measures of Aging Pharynx Function in C. elegans Reveal Enhanced Organ Functionality in Older, Long-lived Mutants*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2017. **74**(8): p. 1173-1179.
155. Avery, L., *The genetics of feeding in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1993. **133**(4): p. 897-917.
156. Alvarez-Illera, P., et al., *Mitochondrial Ca(2+) Dynamics in MCU Knockout C. elegans Worms*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(22): p. 8622;1-11.
157. Weeks, J.C., et al., *Anthelmintic drug actions in resistant and susceptible C. elegans revealed by electrophysiological recordings in a multichannel microfluidic device*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2018. **8**(3): p. 607-628.
158. Horvitz, H.R., et al., *Serotonin and octopamine in the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1982. **216**(4549): p. 1012-4.
159. Hu, C., et al., *NeuroChip: a microfluidic electrophysiological device for genetic and chemical biology screening of Caenorhabditis elegans adult and larvae*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64297;1-17.
160. Ke, T., et al., *Generating Bacterial Foods in Toxicology Studies with Caenorhabditis elegans*. Curr Protoc Toxicol, 2020. **84**(1): p. e94;1-14.
161. Hobert, O., et al., *A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol, 1999. **144**(1): p. 45-57.
162. Nuttley, W.M., S. Harbinder, and D. van der Kooy, *Regulation of distinct attractive and aversive mechanisms mediating benzaldehyde chemotaxis in Caenorhabditis elegans*. Learn Mem, 2001. **8**(3): p. 170-81.
163. Schumacher, F., et al., *Highly sensitive isotope-dilution liquid-chromatography-electrospray ionization-tandem-mass spectrometry approach to study the drug-mediated modulation of dopamine and serotonin levels in Caenorhabditis elegans*. Talanta, 2015. **144**: p. 71-9.
164. Baraldo, G., et al., *Modulation of serotonin signaling by the putative oxaloacetate decarboxylase FAHD-1 in Caenorhabditis elegans*. PLoS One, 2019. **14**(8): p. e0220434;1-11.
165. Gartner, A., A.J. MacQueen, and A.M. Villeneuve, *Methods for analyzing checkpoint responses in Caenorhabditis elegans*. Methods Mol Biol, 2004. **280**: p. 257-74.
166. Shaham, S., *Methods in Cell Biology WormBook*, 2006.

167. Hiebert, T., A. Chicas-Cruz, and K. McCormick, *Reduced pharyngeal pumping rates observed in *tph-1* mutants using microfluidic electropharyngeogram (EPG) recordings*. MicroPubl Biol, 2017. **2017**.
168. Inglis, P.N., et al., *The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans** WormBook, 2007.
169. Perkins, L.A., et al., *Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans**. Dev Biol, 1986. **117**(2): p. 456-87.
170. Starich, T.A., et al., *Mutations affecting the chemosensory neurons of *Caenorhabditis elegans**. Genetics, 1995. **139**(1): p. 171-88.
171. Ezak, M.J. and D.M. Ferkey, *The *C. elegans* D2-like dopamine receptor DOP-3 decreases behavioral sensitivity to the olfactory stimulus 1-octanol*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9487;1-9.
172. Bargmann, C.I., E. Hartweg, and H.R. Horvitz, *Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans**. Cell, 1993. **74**(3): p. 515-27.
173. Lemieux, G.A. and K. Ashrafi, *Neural Regulatory Pathways of Feeding and Fat in *Caenorhabditis elegans**. Annu Rev Genet, 2015. **49**: p. 413-38.
174. Sengupta, P., H.A. Colbert, and C.I. Bargmann, *The *C. elegans* gene *odr-7* encodes an olfactory-specific member of the nuclear receptor superfamily*. Cell, 1994. **79**(6): p. 971-80.
175. Pereira, L., et al., *A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans**. Elife, 2015. **4**: p. e12432;1-46.
176. Troemel, E.R., B.E. Kimmel, and C.I. Bargmann, *Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans**. Cell, 1997. **91**(2): p. 161-9.
177. Chalasani, S.H., et al., *Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans**. Nature, 2007. **450**(7166): p. 63-70.
178. Sanyal, S., et al., *Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans**. EMBO J, 2004. **23**(2): p. 473-82.
179. Sawin, E.R., R. Ranganathan, and H.R. Horvitz, **C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway* Neuron, 2000. **26**(3): p. P619-631.
180. Chen, J. and E.P. Caswell-Chen, *Facultative Vivipary is a Life-History Trait in *Caenorhabditis elegans**. J Nematol, 2004. **36**(2): p. 107-13.
181. Avery, L. and H.R. Horvitz, *Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans**. J Exp Zool, 1990. **253**(3): p. 263-70.
182. Amptoulach, S. and N. Tsavaris, *Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues*. Chemother Res Pract, 2011. **2011**: p. 843019;1-5.
183. Sze, J.Y., et al., *Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant*. Nature, 2000. **403**(6769): p. 560-4.
184. Obata, H., *Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(11): p. 2483;1-12.
185. Loer, C.M. and J.B. Rand, *The Evidence for Classical Neurotransmitters in *Caenorhabditis elegans**. WormAtlas, 2016.
186. Hobert, O., *The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans** WormBook, 2013.
187. Loer, C.M. and C.J. Kenyon, *Serotonin-deficient mutants and male mating behavior in the nematode *Caenorhabditis elegans**. J Neurosci, 1993. **13**(12): p. 5407-17.
188. Sze, J.Y., et al., *The *C. elegans* POU-domain transcription factor *UNC-86* regulates the *tph-1* tryptophan hydroxylase gene and neurite outgrowth in specific serotonergic neurons*. Development, 2002. **129**(16): p. 3901-11.
189. Hiebert, T., A. Chicas-Cruz, and K. McCormick, *Basal pharyngeal pumping elevated in *C. elegans mod-5* mutants*. . Micropublication:biology. , 2017.
190. Duerr, J.S., et al., *The *cat-1* gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors*. J Neurosci, 1999. **19**(1): p. 72-84.
191. Genzen, J.R., W. Van Cleve, and D.S. McGehee, *Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes*. J Neurophysiol, 2001. **86**(4): p. 1773-82.
192. Valeyev, A.Y., et al., *Pharmacologically novel GABA receptor in human dorsal root ganglion neurons*. J Neurophysiol, 1996. **76**(5): p. 3555-8.
193. Jorgensen, E.M., *GABA*. WormBook, 2005.
194. Nagashima, T., et al., *Dopamine regulates body size in *Caenorhabditis elegans**. Dev Biol, 2016. **412**(1): p. 128-138.

195. Estevez, A.O., et al., *Both insulin and calcium channel signaling are required for developmental regulation of serotonin synthesis in the chemosensory ADF neurons of Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 2006. **298**(1): p. 32-44.
196. Honnen, S., *Caenorhabditis elegans as a powerful alternative model organism to promote research in genetic toxicology and biomedicine*. Arch Toxicol, 2017. **91**(5): p. 2029-2044.
197. Schafer, W.R., *Egg-laying*. WormBook, 2005.
198. Schafer, W.F., *Genetics of egg-laying in worms*. Annu Rev Genet, 2006. **40**: p. 487-509.
199. Wang, S., et al., *Cadmium-induced serotonergic neuron and reproduction damages conferred lethality in the nematode Caenorhabditis elegans*. Chemosphere, 2018. **213**: p. 11-18.
200. Nguyen, L.D. and B.E. Ehrlich, *Cellular mechanisms and treatments for chemobrain: insight from aging and neurodegenerative diseases*. EMBO Mol Med, 2020. **12**(6): p. e12075;1-17.
201. Anderson, F.S. and A.S. Kunin-Batson, *Neurocognitive late effects of chemotherapy in children: the past 10 years of research on brain structure and function*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(2): p. 159-64.
202. Nuttley, W.M., K.P. Atkinson-Leadbetter, and D. Van Der Kooy, *Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode Caenorhabditiselegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12449-54.
203. Voglis, G. and N. Tavernarakis, *A synaptic DEG/ENaC ion channel mediates learning in C. elegans by facilitating dopamine signalling*. EMBO J, 2008. **27**(24): p. 3288-99.
204. De Fruyt, N., et al., *The role of neuropeptides in learning: Insights from C. elegans*. Int J Biochem Cell Biol, 2020. **125**: p. 105801.
205. Garcia-Rodriguez, F.J., et al., *Genetic and cellular sensitivity of Caenorhabditis elegans to the chemotherapeutic agent cisplatin*. Dis Model Mech, 2018. **11**(6): p. 1-11.
206. Herndon, L.A., et al., *Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing C. elegans*. Nature, 2002. **419**(6909): p. 808-14.
207. Chow, D.K., et al., *Sarcopenia in the Caenorhabditis elegans pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan*. Exp Gerontol, 2006. **41**(3): p. 252-60.
208. Crone, B., et al., *Elemental bioimaging of Cisplatin in Caenorhabditis elegans by LA-ICP-MS*. Metallomics, 2015. **7**(7): p. 1189-95.
209. Xiao, R. and X.Z. Xu, *C. elegans TRP channels*. Adv Exp Med Biol, 2011. **704**: p. 323-39.
210. Tobin, D.M., et al., *Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in C. elegans neurons* Neuron, 2002. **35**(2): p. 307-318.
211. Zhang, S., et al., *Caenorhabditis elegans TRPV ion channel regulates 5HT biosynthesis in chemosensory neurons*. Development, 2004. **131**(7): p. 1629-38.
212. Buchter, C., et al., *Myricetin-mediated lifespan extension in Caenorhabditis elegans is modulated by DAF-16*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(6): p. 11895-914.
213. NemaMetrix. *Serotonin-Induced Pharyngeal Pumping In C. elegans*. 13.Juni.2021]; Available from: <https://invivobiosystems.com/wp-content/uploads/2016/07/5T-Technote.pdf>.
214. Weeks, J.C., et al., *Sertraline, Paroxetine, and Chlorpromazine Are Rapidly Acting Anthelmintic Drugs Capable of Clinical Repurposing*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 975;1-17.
215. Lockery, S.R., et al., *A microfluidic device for whole-animal drug screening using electrophysiological measures in the nematode C. elegans*. Lab Chip, 2012. **12**(12): p. 2211-20.
216. Delgado, P.L., et al., *Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action*. Biol Psychiatry, 1999. **46**(2): p. 212-20.
217. Nurrish, S., L. Ségalat, and J.M. Kaplan, *Serotonin inhibition of synaptic transmission: Galpha(0) decreases the abundance of UNC-13 at release sites* Neuron, 1999. **24**(1): p. 231-42.
218. Weinschenker, D., G. Garriga, and J.H. Thomas, *Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in C. elegans*. J Neurosci, 1995. **15**(10): p. 6975-85.
219. Mattson, M.P., S. Maudsley, and B. Martin, *BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders*. Trends Neurosci, 2004. **27**(10): p. 589-94.

220. Thibault, K., et al., *Serotonin 5-HT_{2A} receptor involvement and Fos expression at the spinal level in vincristine-induced neuropathy in the rat*. Pain, 2008. **140**(2): p. 305-322.
221. Matthys, A., et al., *Role of the 5-HT₇ receptor in the central nervous system: from current status to future perspectives*. Mol Neurobiol, 2011. **43**(3): p. 228-53.
222. Noda, M., et al., *Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors*. Mol Neurobiol, 2004. **29**(1): p. 31-9.
223. Hofer, A.M., *Interactions between calcium and cAMP signaling*. Curr Med Chem, 2012. **19**(34): p. 5768-73.
224. Hansen, N., et al., *Serotonin transporter deficiency protects mice from mechanical allodynia and heat hyperalgesia in vincristine neuropathy*. Neurosci Lett, 2011. **495**(2): p. 93-7.
225. Kulikov, A.V., et al., *Interplay between the key proteins of serotonin system in SSRI antidepressants efficacy*. Expert Opin Ther Targets, 2018. **22**(4): p. 319-330.
226. Janelins, M.C., et al., *Current pharmacotherapy for chemotherapy-induced nausea and vomiting in cancer patients*. Expert Opin Pharmacother, 2013. **14**(6): p. 757-66.
227. Lu, J., et al., *Cisplatin induces calcium ion accumulation and hearing loss by causing functional alterations in calcium channels and exocytosis*. Am J Transl Res, 2019. **11**(11): p. 6877-6889.
228. Kaplan, S.V., et al., *Impaired Brain Dopamine and Serotonin Release and Uptake in Wistar Rats Following Treatment with Carboplatin*. ACS Chem Neurosci, 2016. **7**(6): p. 689-99.
229. Calahorro, F. and P.G. Izquierdo, *The presynaptic machinery at the synapse of C. elegans*. Invert Neurosci, 2018. **18**(2): p. 4.
230. Speese, S., et al., *UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in Caenorhabditis elegans*. J Neurosci, 2007. **27**(23): p. 6150-62.
231. Charlie, N.K., et al., *Presynaptic UNC-31 (CAPS) is required to activate the G alpha(s) pathway of the Caenorhabditis elegans synaptic signaling network*. Genetics, 2006. **172**(2): p. 943-61.
232. Dalliere, N., et al., *Multiple excitatory and inhibitory neural signals converge to fine-tune Caenorhabditis elegans feeding to food availability*. FASEB J, 2016. **30**(2): p. 836-48.
233. Bean, B.P., *The action potential in mammalian central neurons*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(6): p. 451-65.
234. Adelsberger, H., et al., *The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na⁽⁺⁾ channel kinetics on rat sensory neurons*. Eur J Pharmacol, 2000. **406**(1): p. 25-32.
235. Dib-Hajj, S.D., et al., *Sodium channels in normal and pathological pain*. Annu Rev Neurosci, 2010. **33**: p. 325-47.
236. Li, Y., et al., *DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain*. J Neurosci, 2018. **38**(5): p. 1124-1136.
237. Kanzawa-Lee, G.A., et al., *Mechanisms, Predictors, and Challenges in Assessing and Managing Painful Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy*. Semin Oncol Nurs, 2019. **35**(3): p. 253-260.
238. Mekahli, D., et al., *Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(6): p. 1-30.
239. Vink, S. and P.F. Alewood, *Targeting voltage-gated calcium channels: developments in peptide and small-molecule inhibitors for the treatment of neuropathic pain*. Br J Pharmacol, 2012. **167**(5): p. 970-89.
240. Zamponi, G.W., et al., *Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways*. Brain Res Rev, 2009. **60**(1): p. 84-9.
241. Leo, M., et al., *Cisplatin-induced neuropathic pain is mediated by upregulation of N-type voltage-gated calcium channels in dorsal root ganglion neurons*. Exp Neurol, 2017. **288**: p. 62-74.
242. Shtonda, B. and L. Avery, *CCA-1, EGL-19 and EXP-2 currents shape action potentials in the Caenorhabditis elegans pharynx*. J Exp Biol, 2005. **208**(Pt 11): p. 2177-90.
243. Zang, K.E., E. Ho, and N. Ringstad, *Inhibitory peptidergic modulation of C. elegans serotonin neurons is gated by T-type calcium channels*. Elife, 2017. **6**: p. e22771;23.
244. Steger, K.A., et al., *The C. elegans T-type calcium channel CCA-1 boosts neuromuscular transmission*. J Exp Biol, 2005. **208**(Pt 11): p. 2191-203.
245. Westenbroek, R.E., et al., *Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit*. Neuron, 1992. **9**(6): p. 1099-115.

246. Mathews, E.A., et al., *Critical residues of the Caenorhabditis elegans unc-2 voltage-gated calcium channel that affect behavioral and physiological properties*. J Neurosci, 2003. **23**(16): p. 6537-45.
247. Leo, M., et al., *Cisplatin alters the function and expression of N-type voltage-gated calcium channels in the absence of morphological damage of sensory neurons*. Mol Pain, 2017. **13**: p. 1744806917746565.
248. Catterall, W.A., *Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 521-55.
249. Böhm, S., *Neurotransmission und Neuromodulation*, in *Pharmakologie und Toxikologie*. 2016, Springer.
250. Richmond, J., *Synaptic function*. WormBook, 2007.
251. Leo, M., et al., *Platinum-Based Drugs Cause Mitochondrial Dysfunction in Cultured Dorsal Root Ganglion Neurons*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(22).
252. Lomeli, N., et al., *Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats*. Free Radic Biol Med, 2017. **102**: p. 274-286.
253. Chen, H. and D.C. Chan, *Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(4): p. 453-9.
254. Han, Y. and M.T. Smith, *Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN)*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 156.
255. Jaggi, A.S. and N. Singh, *Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy*. Toxicology, 2012. **291**(1-3): p. 1-9.
256. Treçarichi, A. and S.J.L. Flatters, *Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. Int Rev Neurobiol, 2019. **145**: p. 83-126.
257. Salzer, J.L. and B. Zalc, *Myelination*. Curr Biol, 2016. **26**(20): p. R971-R975.
258. Imai, S., et al., *Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells via distinct mechanisms*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 5947;1-14.
259. Oikonomou, G. and S. Shaham, *The glia of Caenorhabditis elegans*. Glia, 2011. **59**(9): p. 1253-63.
260. Hao, W., et al., *Hyperglycemia Promotes Schwann Cell De-differentiation and De-myelination via Sorbitol Accumulation and Igf1 Protein Down-regulation*. J Biol Chem, 2015. **290**(28): p. 17106-15.
261. Cermenati, G., et al., *Diabetes-induced myelin abnormalities are associated with an altered lipid pattern: protective effects of LXR activation*. J Lipid Res, 2012. **53**(2): p. 300-10.
262. Chiu, G.S., et al., *Pifithrin- μ Prevents Cisplatin-Induced Chemobrain by Preserving Neuronal Mitochondrial Function*. Cancer Res, 2017. **77**(3): p. 742-752.
263. Ongnok, B., N. Chattipakorn, and S.C. Chattipakorn, *Doxorubicin and cisplatin induced cognitive impairment: The possible mechanisms and interventions*. Exp Neurol, 2020. **324**: p. 113118;1-22.
264. Dietrich, J., et al., *CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo*. J Biol, 2006. **5**(7): p. 22.
265. Saadati, H., et al., *The Neuroprotective Effect of Mesna on Cisplatin-Induced Neurotoxicity: Behavioral, Electrophysiological, and Molecular Studies*. Neurotox Res, 2021. **39**(3): p. 826-840.
266. Zhou, W., A. Kavelaars, and C.J. Heijnen, *Metformin Prevents Cisplatin-Induced Cognitive Impairment and Brain Damage in Mice*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151890;1-15.
267. Mao-Ying, Q.L., et al., *The anti-diabetic drug metformin protects against chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a mouse model*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100701;1-8.
268. Pintana, H., et al., *Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats*. Life Sci, 2012. **91**(11-12): p. 409-414.
269. Svob Strac, D., N. Pivac, and D. Muck-Seler, *The serotonergic system and cognitive function*. Transl Neurosci, 2016. **7**(1): p. 35-49.
270. Smith, G.S., et al., *Molecular imaging of serotonin degeneration in mild cognitive impairment*. Neurobiol Dis, 2017. **105**: p. 33-41.
271. Silva, A.J., et al., *CREB and memory*. Annu Rev Neurosci, 1998. **21**: p. 127-48.
272. Kauffman, A.L., et al., *Insulin signaling and dietary restriction differentially influence the decline of learning and memory with age*. PLoS Biol, 2010. **8**(5): p. e1000372;14.

273. Chen, G., et al., *CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation*. J Neurosci, 2010. **30**(39): p. 13066-77.
274. Cheng, H., et al., *The COMT (rs165599) gene polymorphism contributes to chemotherapy-induced cognitive impairment in breast cancer patients*. Am J Transl Res, 2016. **8**(11): p. 5087-5097.
275. Oz, M., et al., *Curcumin alleviates cisplatin-induced learning and memory impairments*. Neurobiol Learn Mem, 2015. **123**: p. 43-9.
276. Caito, S.W. and M. Aschner, *NAD⁺ Supplementation Attenuates Methylmercury Dopaminergic and Mitochondrial Toxicity in Caenorhabditis Elegans*. Toxicol Sci, 2016. **151**(1): p. 139-49.
277. Helmer, P.O., et al., *Investigation of cardiolipin oxidation products as a new endpoint for oxidative stress in C. elegans by means of online two-dimensional liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry*. Free Radic Biol Med, 2021. **162**: p. 216-224.
278. Dingley, S., et al., *Mitochondrial respiratory chain dysfunction variably increases oxidant stress in Caenorhabditis elegans*. Mitochondrion, 2010. **10**(2): p. 125-36.
279. Koopman, M., et al., *A screening-based platform for the assessment of cellular respiration in Caenorhabditis elegans*. Nat Protoc, 2016. **11**(10): p. 1798-816.
280. Luz, A.L., et al., *Seahorse Xfe 24 Extracellular Flux Analyzer-Based Analysis of Cellular Respiration in Caenorhabditis elegans*. Curr Protoc Toxicol, 2015. **66**: p. 25 7 1-15.
281. Neumann, C., et al., *The role of poly(ADP-ribose) polymerases in manganese exposed Caenorhabditis elegans*. J Trace Elem Med Biol, 2020. **57**: p. 21-27.
282. Liu, F., et al., *The cAMP-PKA pathway-mediated fat mobilization is required for cold tolerance in C. elegans*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 638.
283. Schiavi, A., et al., *Autophagy induction extends lifespan and reduces lipid content in response to frataxin silencing in C. elegans*. Exp Gerontol, 2013. **48**(2): p. 191-201.
284. Costa-Pereira, J.T., et al., *Role of Spinal Cord alpha2-Adrenoreceptors in Noradrenergic Inhibition of Nociceptive Transmission During Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy*. Front Neurosci, 2019. **13**: p. 1413;1-12.
285. Ma, J., et al., *Pharmacological inhibition of HDAC6 reverses cognitive impairment and tau pathology as a result of cisplatin treatment*. Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 103;1-14.
286. Krukowski, K., et al., *HDAC6 inhibition effectively reverses chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. Pain, 2017. **158**(6): p. 1126-1137.
287. Ma, J., et al., *Cell-specific role of histone deacetylase 6 in chemotherapy-induced mechanical allodynia and loss of intraepidermal nerve fibers*. Pain, 2019. **160**(12): p. 2877-2890.
288. Oh, K.H. and H. Kim, *Aldicarb-induced Paralysis Assay to Determine Defects in Synaptic Transmission in Caenorhabditis elegans*. Bio Protoc, 2017. **7**(14): p. 1-11.
289. Peltoniemi, M.A., et al., *Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy*. Clin Pharmacokinet, 2016. **55**(9): p. 1059-77.
290. Kauffman, A., et al., *C. elegans positive butanone learning, short-term, and long-term associative memory assays*. J Vis Exp, 2011(49): p. 2409;1-10.
291. Gurkar, A.U., et al., *Dysregulation of DAF-16/FOXO3A-mediated stress responses accelerates oxidative DNA damage induced aging*. Redox Biol, 2018. **18**: p. 191-199.

7. Anhang

7.1 Zusätzliche Abbildungen

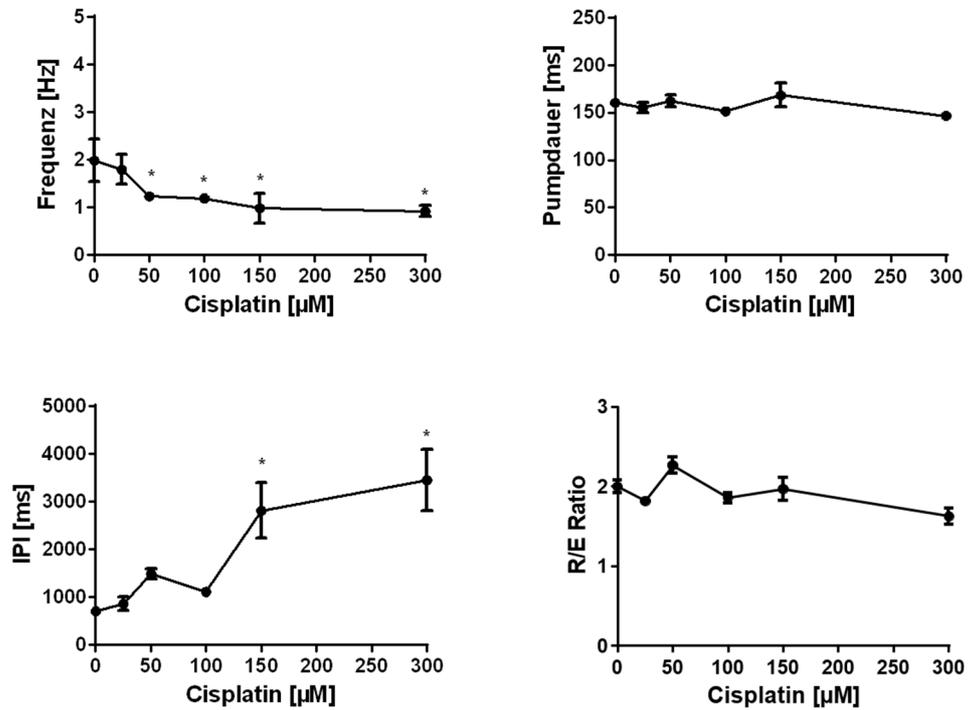


Abb. 26: Cisplatin Dosisabhängigkeit.

N2 Tiere wurden für 48 h mit 0–300 μM CisPt inkubiert. Die Messung wurde in Gegenwart von *E. coli* OP50⁻¹ (OD₆₀₀=0,9) mit dem ScreenChip™ System durchgeführt. In der Abbildung sind die verschiedenen Parameter (Frequenz, Pumpdauer, IPI und R/E Ratio) aufgelistet. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von n≥3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt N≥40/Gruppe. (*p≤0,05 vs. 0 μM CisPt; One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test)

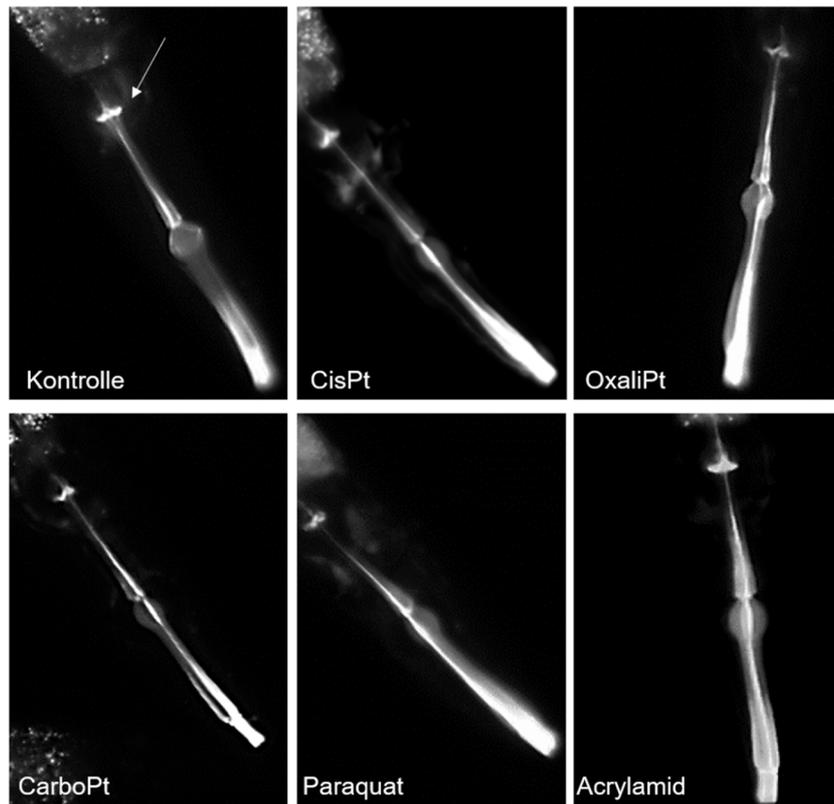


Abb. 27: Unveränderte Pharynxmorphologie nach 48 h Inkubation.

FITC-Färbung von N2 Tieren nach 48 h Inkubation mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt, 1 mM CarboPt, 1,6 mM Paraquat und 4,2 mM Acrylamid. Die gewählten Konzentrationen für Paraquat und Acrylamid beziehen sich auf die Ergebnisse von Wellenberg *et al.* [147]. Zu sehen ist der Pharynx von *C. elegans*. Die FITC-Färbung machte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die einzelnen Kompartimente (*Corpus*, *Isthmus* und *terminaler Bulbus*) sowie den Zermahler (lokalisiert im *terminalen Bulbus*, Pfeil) des Pharynx sichtbar. Dargestellt sind repräsentative Originalbilder aus n=3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 30$ /Gruppe.



Abb. 28: Unveränderte Pharynxmorphologie nach 96 h Inkubation.

FITC-Färbung von N2 Tieren nach 96 h Inkubation mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt, 1 mM CarboPt, 1,6 mM Paraquat und 4,2 mM Acrylamid. Die gewählten Konzentrationen für Paraquat und Acrylamid beziehen sich auf die Ergebnisse aus Wellenberg *et al.* [147]. Zu sehen ist der Pharynx von *C. elegans*. Die FITC-Färbung macht im Rahmen der vorliegenden Arbeit die einzelnen Kompartimente (*Corpus*, *Isthmus* und *terminaler Bulbus*) sowie den Zermahler (lokalisiert im *terminalen Bulbus*, Pfeil) des Pharynx sichtbar. Dargestellt sind repräsentative Originalbilder aus n=3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 30$ /Gruppe.

Tab. 12: Übersicht der Amphid- und Phasmidneurone.

Neurone	Neurotransmitter	Funktion
Amphid		
ASI	Neuropeptide Insulin Insulin-ähnlich	Chemotaxis Thermotaxis
ADL	Glutamat Neuropeptide	Chemotaxis Wahrnehmung von Pheromonen Soziales Futterverhalten
ASK	Glutamat Neuropeptide	Chemotaxis Elektrotaxis Wahrnehmung von Pheromonen Lokales Suchverhalten
AWA	nicht bekannt	Chemotaxis
AWB	Acetylcholin Neuropeptide	Chemotaxis (Vermeidung) Elektrotaxis
AWC	Glutamat Neuropeptid-ähnliches Peptid	Chemotaxis Lokales Suchverhalten Elektrotaxis
ASH	Glutamat Insulin-ähnliches Peptid Neuropeptide	Nozizeptor Elektrotaxis
ASJ	Neuropeptide	Ein-/Austritt in Dauerlarven Stadium Elektrotaxis
Phasmid		
PHA	Glutamat Neuropeptide	Chemorepulsionsverhalten
PHB	Glutamat Neuropeptide	Chemorepulsionsverhalten

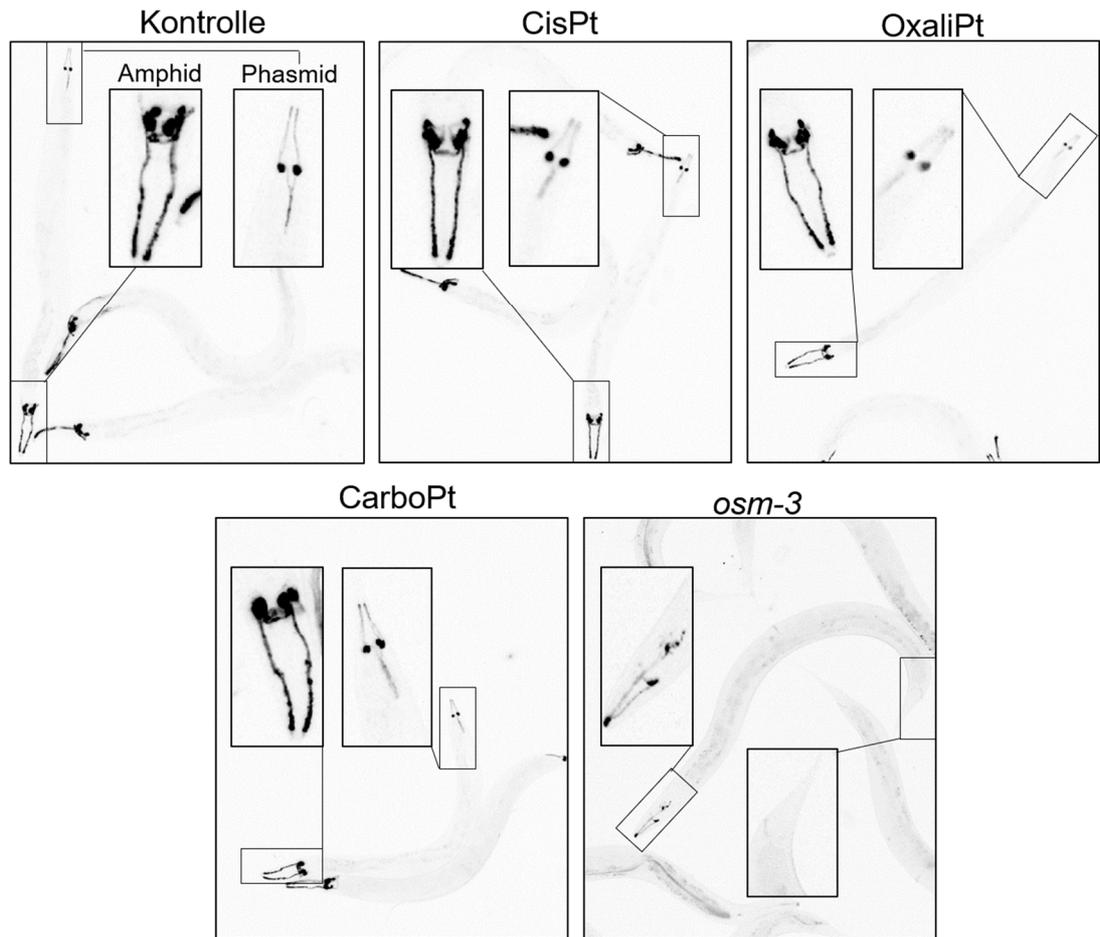


Abb. 29: Morphologische Unauffälligkeit der Amphid- und Phasmidneurone nach 48-stündiger Platinbehandlung.

Die Amphid- und Phasmidneurone von N2 *C. elegans* wurden nach 48 h Inkubation mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt mittels DiO-Färbung angefärbt. Die *osm-3* Mutante wurde als Positivkontrolle eingesetzt. In der Abbildung sind die repräsentativen Bilder der Nematoden aus $n \geq 2$ unabhängigen Versuchen und insgesamt $N \geq 45$ /Gruppe dargestellt. Pro Gruppe ist der gesamte Nematode gezeigt. Die Amphidneurone (Pharynx) und Phasmidneurone (Schwanz) sind jeweils vergrößert dargestellt.

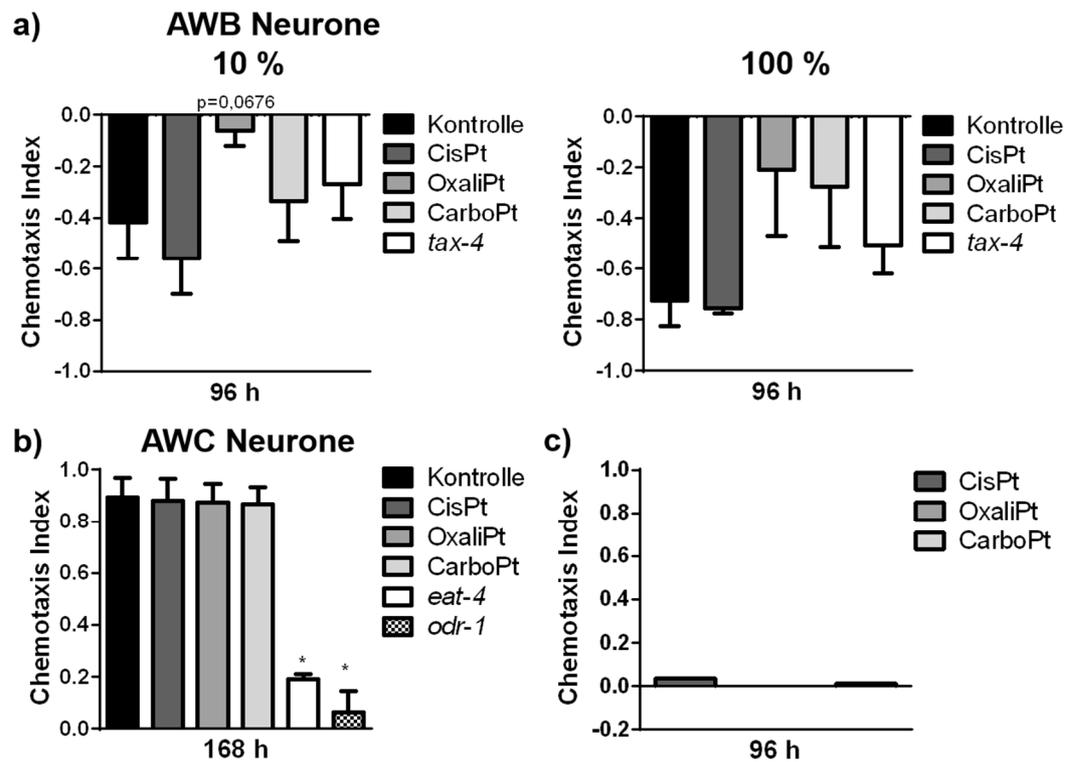
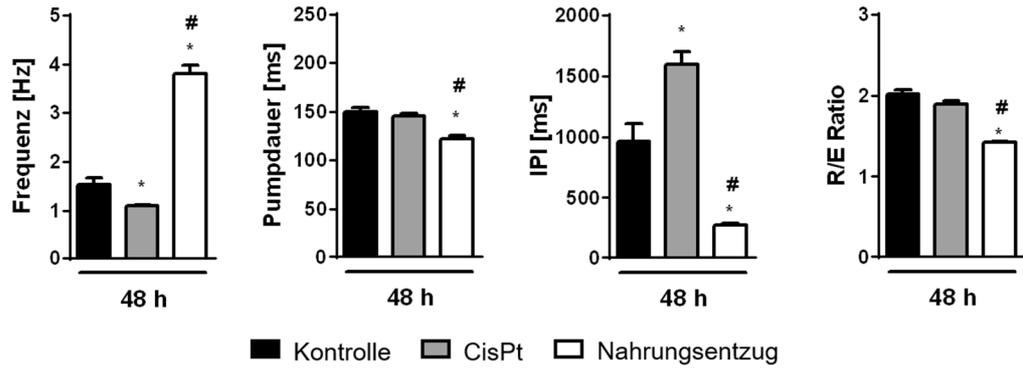


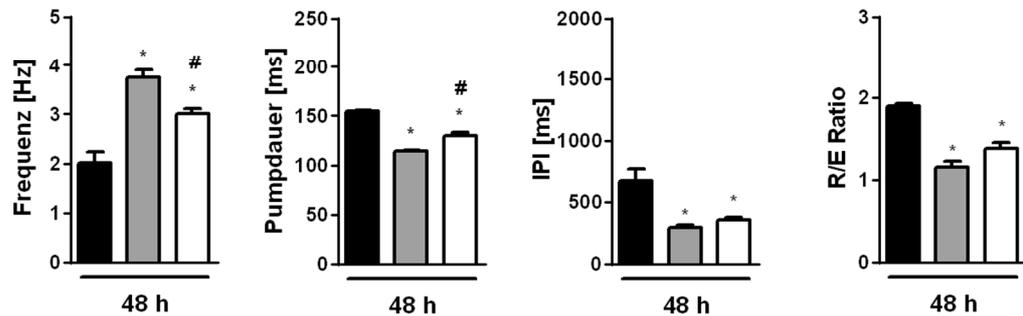
Abb. 30: Untersuchung des Einflusses von Platinanaloga auf die chemosensorische Wahrnehmung.

Einsatz des Chemotaxis Assay zur Untersuchung verschiedener sensorischer Fragestellungen. a) N2 Tiere wurden 96 h mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt inkubiert. Die Substanz 2-Nonanon wurde verdünnt (10 %) und unverdünnt (100 %) zur Überprüfung der Funktionalität der AWB Neurone eingesetzt. Die *tax-4* Mutante diente als Positivkontrolle. Zu sehen sind Mittelwert + SEM aus $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 362$ /Gruppe (mit 10 % 2-Nonanon) und $n \geq 2$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 238$ /Gruppe (mit 100 % 2-Nonanon). Keine signifikanten Unterschiede (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). b) Die Funktionalität der AWC Neurone wurde mit 1 % Benzaldehyd untersucht. N2 Tiere wurden 168 h mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt inkubiert. Die *eat-4* und *odr-1* Mutanten dienten als Positivkontrolle. Aufgetragen sind Mittelwert + SEM aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 282$ /Gruppe; * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). c) Überprüfung des attraktiven/repulsiven Potentials der Platinanaloga. Dazu wurden N2 Tiere 96 h in Kontrollmedium kultiviert. Anschließend wurde ein Chemotaxis Assay mit 100 μ M CisPt, 300 μ M OxaliPt und 1 mM CarboPt durchgeführt. Zu sehen sind Mittelwert + SEM aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt $N \geq 431$ /Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

a) OP50-1



b) 5 mM 5-HT



**Abb. 31: Eine kalorische Restriktion ist nicht ursächlich für das Cisplatin-
ausgelöste hyperaktive Pumpverhalten.**

Messung des Pumpverhaltens mit dem ScreenChip™ System in Anwesenheit verschiedener Pumpstimuli. N2 Tiere wurden 48 h mit 0 und 100 μ M CisPt behandelt. Für den Nahrungsentzug wurde eine N2 Population 24 h in Kontrollmedium kultiviert und anschließend in Kontrollmedium ohne Futterzusatz inkubiert. a) Elektrophysiologische Messung in Gegenwart von *E. coli* OP50⁻¹ (OD₆₀₀=0,9). Gezeigt sind Mean + SEM aus n \geq 3 unabhängigen Versuchen und insgesamt N \geq 45/Gruppe; *p \leq 0,05 vs. Kontrolle; #p \leq 0,05 vs. CisPt (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). b) Elektrophysiologische Messung in Gegenwart von 5 mM 5-HT. Dargestellt sind Mean + SEM aus n=3 unabhängigen Versuchen und insgesamt N \geq 45/Gruppe; *p \leq 0,05 vs. Kontrolle; #p \leq 0,05 vs. CisPt (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

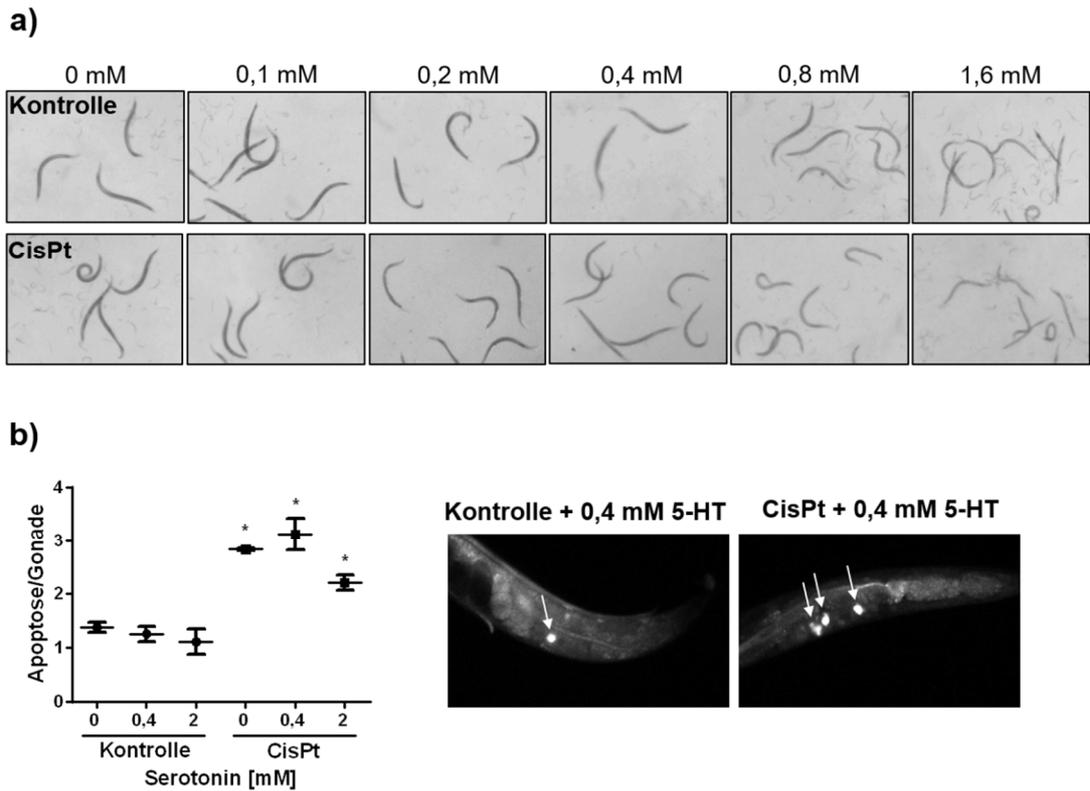


Abb. 32: Serotonin hat keinen Einfluss auf die Cisplatin Zytotoxizität.

a) N2 Tiere wurden 48 h mit 0 und 100 μ M CisPt und 5-HT (0-1,6 mM) co-inkubiert. Anschließend wurde das morphologische Erscheinungsbild qualitativ überprüft. Bilder aus n=1 Versuch mit N \geq 10. b) Apoptose Versuch. N2 Individuen wurden 48 h mit 0 oder 100 μ M CisPt mit 5-HT (0-2 mM) co-inkubiert. Die Anzahl der apoptotischen Körper wurde nach einer AO-Färbung mikroskopisch ausgezählt. Zu sehen sind Mittelwert \pm SEM aus n=3 unabhängigen Versuchen und insgesamt N \geq 36/Gruppe; *p \leq 0,05 vs. jeweilige Kontrolle (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test). Repräsentative Originalbilder der apoptotischen Körper von Kontrolle + 0,4 mM 5-HT und CisPt + 0,4 mM 5-HT.

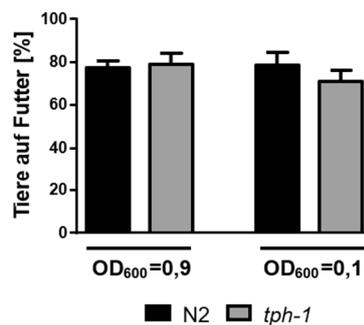


Abb. 33: Futterwahrnehmung der *tph-1* Mutante.

Food Attraction Assay mit N2 und *tph-1* Tieren nach 96 h in Kontrollmedium. Die Futterwahrnehmung wurde mittels zwei verschiedener Bakteriendichten OD₆₀₀=0,9 und OD₆₀₀=0,1 überprüft. Dargestellt sind Mittelwert + SEM aus n \geq 3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt N \geq 506/Gruppe (OD₆₀₀=0,9) und N \geq 450/Gruppe (OD₆₀₀=0,1). Keine signifikanten Unterschiede (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

Tab. 13: Übersicht der Gene für die qPCR.

Verwendete Primer mit Zuordnung der Neurotransmitter, Gen und humanem Homolog.

Neurotransmitter	Gen	Homolog	
Serotonin	<i>tph-1</i>	TPH-1	1. Enzym Biosynthese
	<i>bas-1</i>	DDC	2. Enzym Biosynthese
	<i>cat-4</i>	GCH1	Transkriptionsfaktor für <i>tph-1</i>
	<i>cat-1</i>	SLC18A1 SLC18A2	Vesikulärer Serotonin und Dopamin Transporter
	<i>mod-1</i>		Serotonin-gesteuerter Chloridkanal
	<i>mod-5</i>	SLC6A4	Wiederaufnahmetransporter
	<i>ser-1</i>	HTR2B HTR2C	G-Protein gekoppelter Rezeptor
	<i>ser-4</i>	HTR1A	G-Protein gekoppelter Rezeptor
	<i>ser-5</i>	ADRA1A ADRA1B ADRA1D	G-Protein gekoppelter Rezeptor
	<i>ser-7</i>	HTR7	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Dopamin	<i>cat-2</i>	TH	1. Enzym Biosynthese
	<i>bas-1</i>	DDC	2. Enzym Biosynthese
	<i>cat-4</i>	GCH1	Transkriptionsfaktor für <i>cat-2</i>
	<i>cat-1</i>	SLC18A1 SLC18A2	Vesikulärer Serotonin und Dopamin Transporter
	<i>dat-1</i>	SLC6A2	Wiederaufnahmetransporter
	<i>dop-1</i>	DRD1 DRD5	Rezeptor
	<i>dop-2</i>	DRD4	Rezeptor
	<i>dop-3</i>	DRD2 DRD3 DRD4	Rezeptor
<i>dop-4</i>		Rezeptor	
Acetylcholin	<i>cha-1</i>	CHAT	Biosynthese (Cholin Acetyltransferase)
	<i>unc-17</i>	SLC18A3	Vesikulärer Acetylcholin Transporter
	<i>cho-1</i>	SLC5A7	Cholin Transporter
	<i>snf-6</i>	SLC6A14 SLC6A5	Plasmamembran Transporter
	<i>ace-1</i>	ACHE	Acetylcholinesterase
	<i>ace-2</i>	BCHE	Acetylcholinesterase
	<i>ace-3</i>	BCHE	Acetylcholinesterase
	<i>eat-2</i>	CHRFAM7A FAM7A	non-alpha-Untereinheit nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren
	<i>gar-1</i>		Rezeptor
	<i>gar-2</i>		Rezeptor
<i>gar-3</i>	CHRM1 CHRM3 CHRM5	Rezeptor	
Glutamat	<i>glc-1</i>	GLRA1 GLRA3 GLRA4	Glutamat-gesteuerter Chloridkanal, Untereinheit (GluCl alpha1)

Anhang

	<i>glc-2</i>	GLRA1 GLRA3 GLRA4	Glutamat-gesteuerter Chloridkanal, Untereinheit (GluCl beta)
	<i>glc-3</i>	GLRA1	Glutamat-gesteuerter Chloridkanal
	<i>glc-4</i>		Glutamat-gesteuerter Chloridkanal
	<i>avr-14</i>	GLRA3 GLRA4	Glutamat-gesteuerter Chloridkanal, Untereinheit (GluCl alpha3)
	<i>avr-15</i>	GLRA1 GLRA3 GLRA4	Glutamat-gesteuerter Chloridkanal, Untereinheit (GluCl alpha2)
	<i>eat-4</i>	SLC17A7 SLC17A8	Vesikulärer Transporter
	<i>eat-18</i>		Neurotransmission beteiligt (MC Neuron)
	<i>glr-1</i>	GRIA2 GRIA3	AMPA-typ Ionotroper Rezeptor
	<i>glr-2</i>	GRIA1 GRIA2 GRIA3	AMPA-typ Ionotroper Rezeptor
	<i>glr-4</i>	GRIK1 GRIK3	AMPA-typ Ionotroper Rezeptor
	<i>glr-5</i>	GRIK1 GRIK3	AMPA-typ Ionotroper Rezeptor
	<i>glr-6</i>		AMPA-typ Ionotroper Rezeptor
	<i>glr-7</i>		AMPA-typ Ionotroper Rezeptor
	<i>glr-8</i>		AMPA-typ Ionotroper Rezeptor
	<i>nmr-1</i>	GRIN1	NMDA-typ Ionotroper Rezeptor
	<i>nmr-2</i>	GRIN2B GRIN2C GRIN2D	NMDA-typ Ionotroper Rezeptor
GABA	<i>unc-25</i>	GAD1	Biosynthese
	<i>unc-46</i>		Transmembranprotein
	<i>unc-47</i>	SLC32A1	vesikulärer Transporter
	<i>unc-49</i>		Inhibitorischer GABA Rezeptor
	<i>unc-30</i>	PITX2	Transkriptionsfaktor für <i>unc-25</i> und <i>unc-47</i>
	<i>exp-1</i>		Exzitatorischer GABA Rezeptor
	<i>snf-11</i>	SLC6A1	Transporter

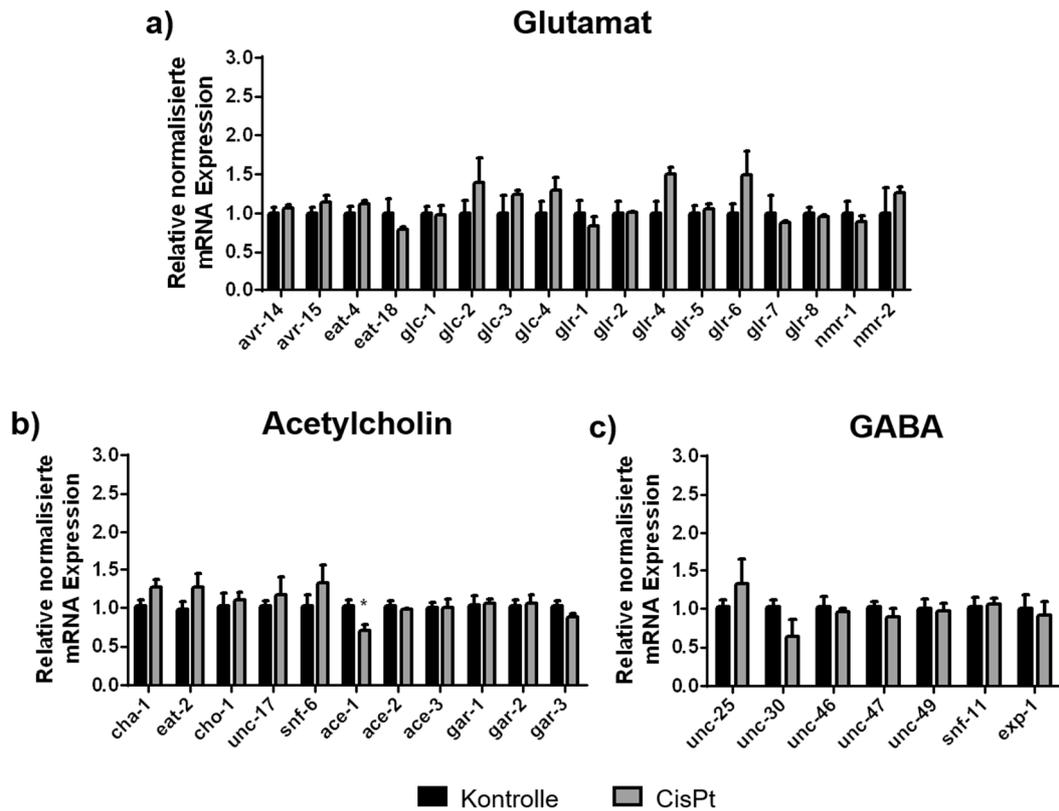


Abb. 34: qPCR Ergebnisse von Acetylcholin, Glutamat und GABA.

Darstellung der relativen normalisierten mRNA Expression Neurotransmitter-assoziiierter Gene. a) Glutamat, b) Acetylcholin und c) GABA. Eine Übersicht der Gene und ihrer Funktion ist in Tab. 13 im Anhang zusammengestellt. Zu sehen sind Mittelwert + SEM aus $n=2-3$ unabhängigen Versuchen, 3 Replikaten und insgesamt $N \geq 6000$ /Gruppe. (* $p < 0,05$ vs. jeweilige Kontrolle mit Multiple t-test).

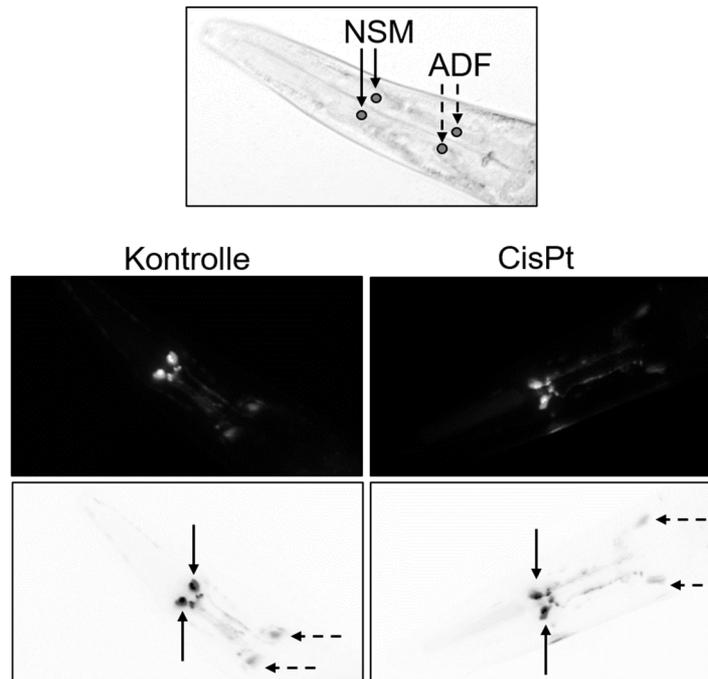


Abb. 35: *tph-1* Expression in serotonergen Neuronen.

Visualisierung von im Pharynx lokalisierter serotonerger Neurone mit dem transgenen Stamm GR1366 *mgIs42 [tph-1::GFP + rol-6(su1006)]* nach 96 h Behandlung mit 0 und 100 μ M CisPt. *tph-1* kodiert für das 1. Enzym (TPH-1) der 5-HT-Biosynthese. Die Lokalisierung der NSM-Neurone ist mit einem durchgehenden Pfeil gekennzeichnet und die der ADF-Neurone mit einem gestrichelten Pfeil. Dargestellt sind repräsentative Originalbilder (schwarz) und invertierte Bilder (weiß) aus n=3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt N \geq 60/Gruppe.

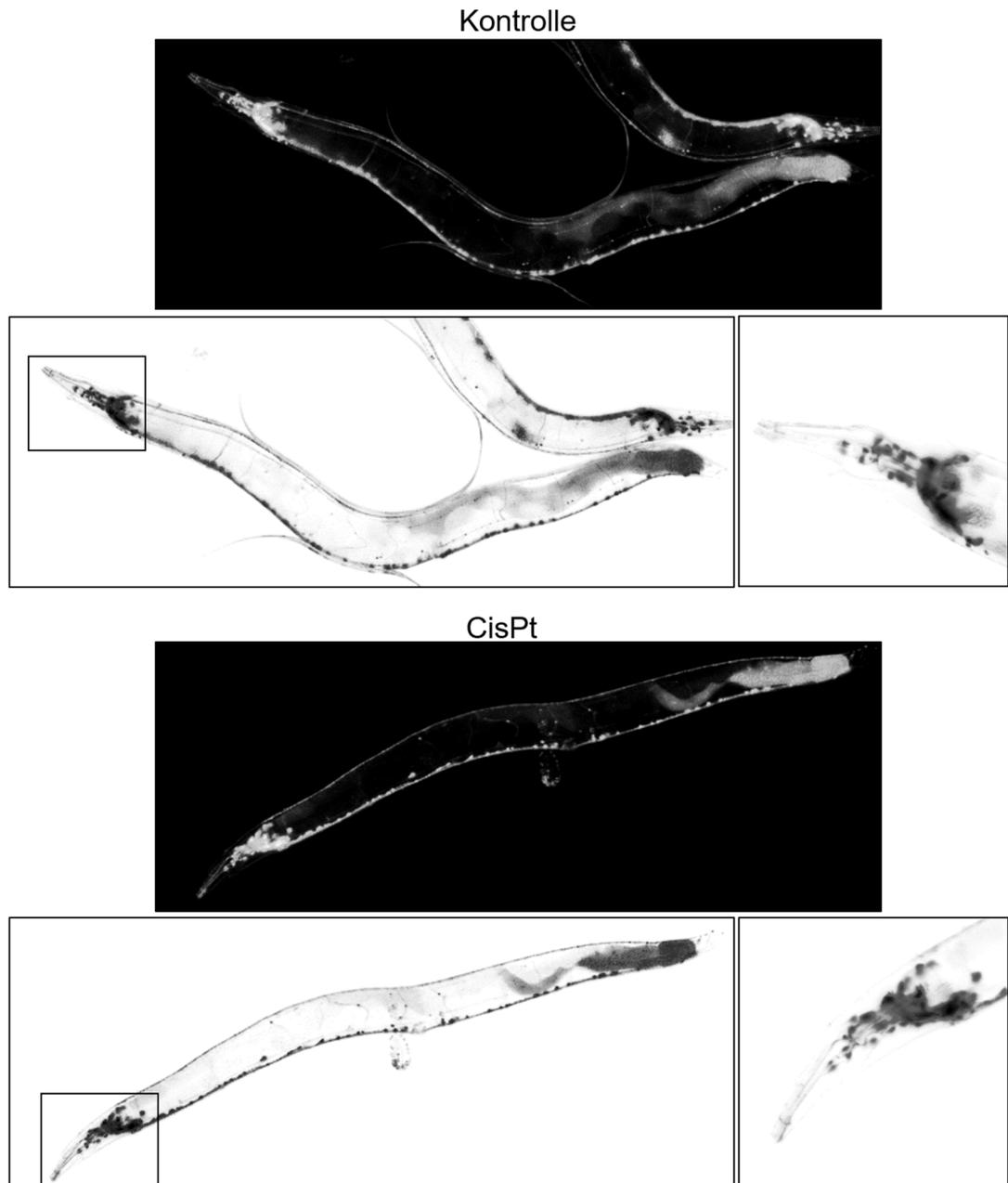


Abb. 36: *unc-17* Expression in cholinergen Neuronen.

Visualisierung cholinergischer Neurone durch Nutzung des transgenen Stammes LX929 *vs/s48* [*unc-17::GFP*]. *unc-17* kodiert für den vesikulären ACh Transporter. Der Pharynx ist vergrößert dargestellt (rechtes Quadrat). 96 h Behandlung mit 0 und 100 μ M CisPt. Dargestellt sind repräsentative Originalbilder (schwarz) und invertierte Bilder (weiß) aus $n=4$ unabhängigen Experimenten mit insgesamt $N \geq 80$ /Gruppe.

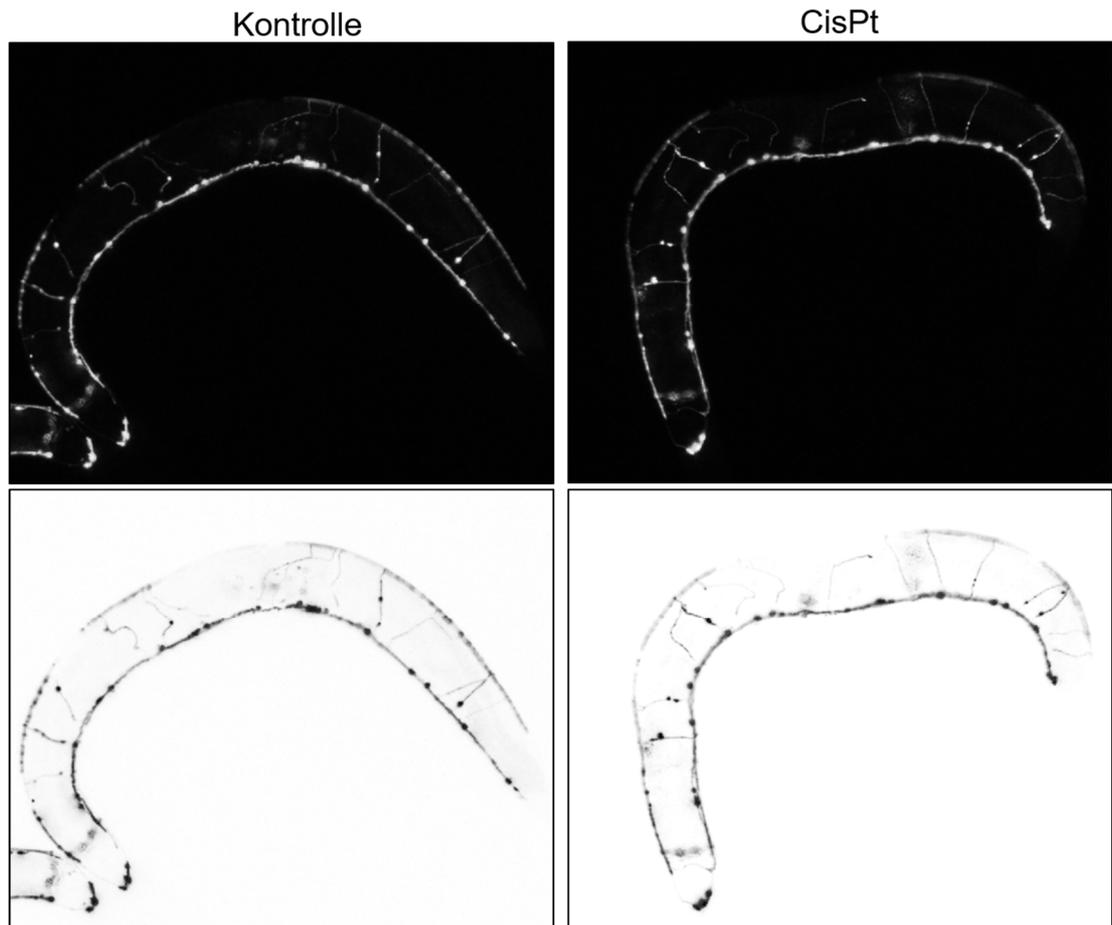


Abb. 37: *unc-25* Expression in GABAergen Neuronen.

Visualisierung GABAerger Neurone durch Nutzung des transgenen Stamms CZ1632 *juls76* [*unc-25p::GFP + lin-15(+)*] II. *unc-25* kodiert für das GABA-Biosynthese Enzym Glutamat Decarboxylase. 96 h Behandlung mit 0 und 100 µM CisPt. Dargestellt sind repräsentative Originalbilder (schwarz) und invertierte Bilder (weiß) aus n=3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt N≥60/Gruppe.

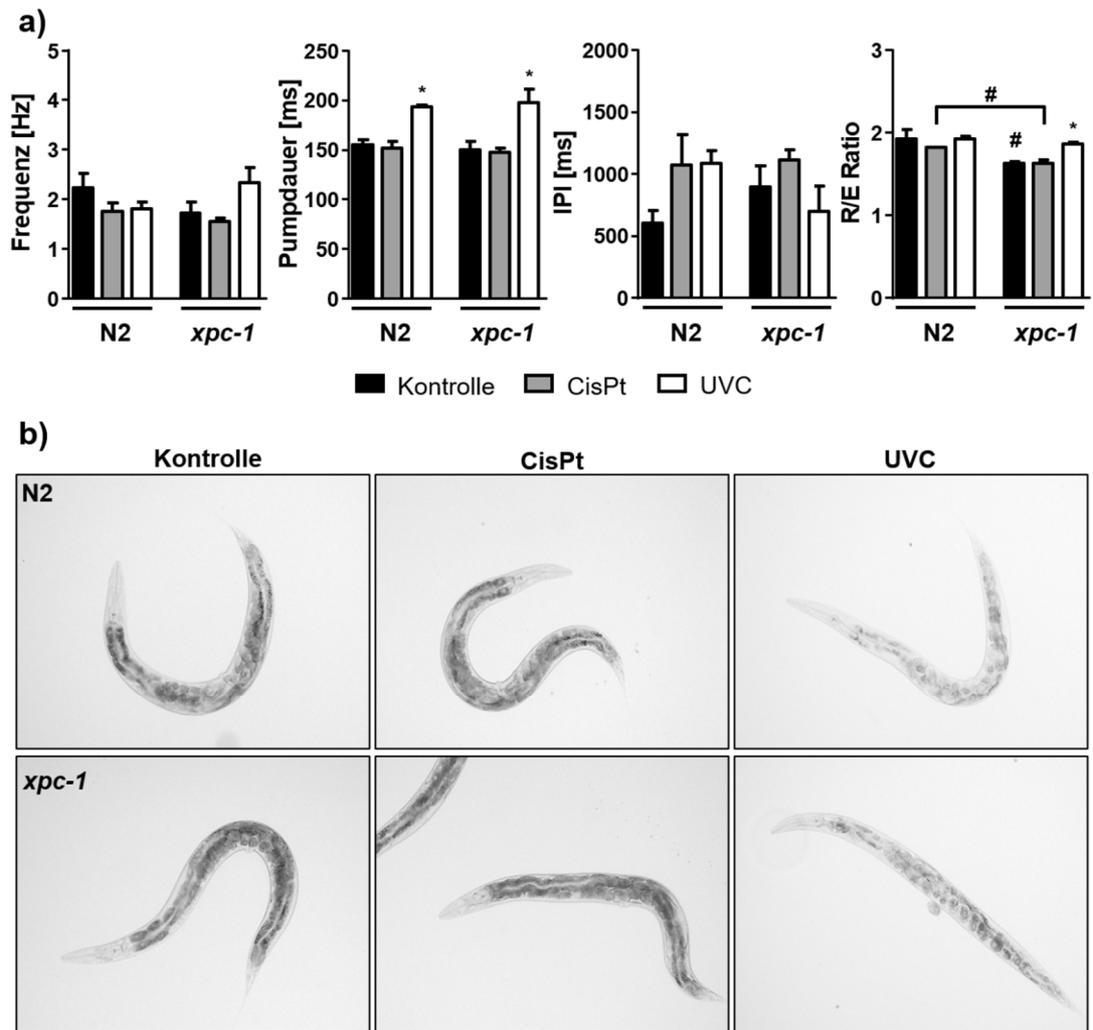


Abb. 38: Elektrophysiologische Messung mit einer DNA-Reparaturmutante.

N2 und *xpc-1* Tiere wurden 48 h in 0 oder 25 μM CisPt inkubiert. Die genutzte CisPt Konzentration begründet sich durch die Ergebnisse der CisPt Dosisabhängigkeit (vgl. Anhang Abb. 26). Ab 50 μM CisPt konnten keine weiteren Effekte auf das Pumpverhalten beobachtet werden, deshalb wurden 25 μM CisPt eingesetzt. Als Positivkontrolle diente eine Bestrahlung mit 50 mJ/m^2 [291]. a) Ergebnisse der Messungen im ScreenChip™ System in Gegenwart von *E. coli* OP50⁻¹ ($\text{OD}_{600}=0,9$). Dargestellte Parameter sind Frequenz, Pumpdauer, IPI und R/E Ratio. Aufgetragen ist der Mittelwert + SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten und insgesamt $N \geq 44/\text{Gruppe}$. (* $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrolle und # $p \leq 0,05$ vs. N2 Kontrolle mit One-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test). b) Darstellung von repräsentativen Bildern nach Behandlungen mit 25 μM CisPt und 50 mJ/m^2 UVC. Zwischen den unterschiedlichen Stämmen (N2 und *xpc-1*) sowie Kontrolle und CisPt sind keine morphologischen Unterschiede zu beobachten. Die als Positivkontrolle eingesetzte UVC Bestrahlung führte zu einer veränderten Morphologie von N2 und *xpc-1* Tieren.

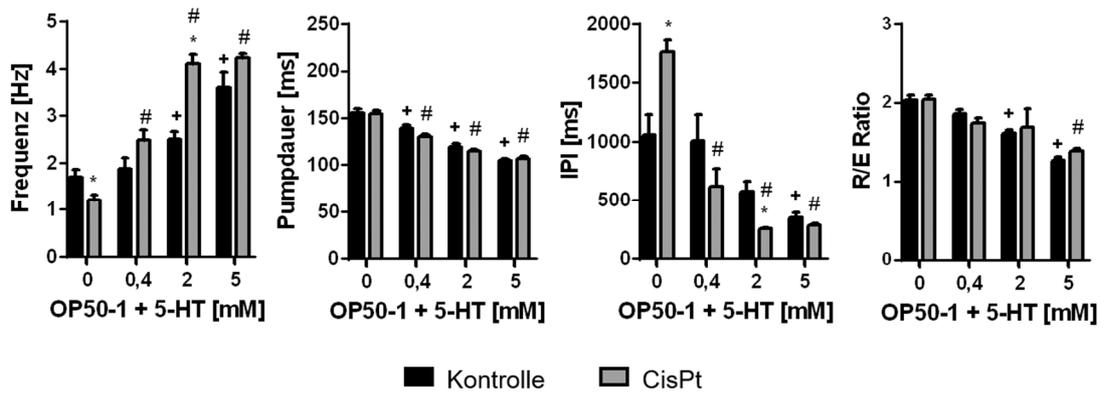


Abb. 39: Elektrophysiologische Messung mit Bakterien und Serotonin.

Die elektrophysiologische Messung wurde in Anlehnung an den Eiablage Versuch (vgl. Abb. 23a) in Anwesenheit von *E. coli* OP50⁻¹ und steigenden 5-HT Konzentrationen (0,4-5 mM) gemessen. Dazu wurden N2 Tiere 48 h mit 100 μ M CisPt inkubiert. Dargestellt sind die Parameter Frequenz, Pumpdauer, IPI und R/E Ratio mit Mittelwert + SEM aus $n \geq 4$ unabhängigen Versuchen und insgesamt $N \geq 47$ /Gruppe; * $p \leq 0,05$ vs. entsprechende Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. CisPt gemessen mit OP50⁻¹ + 0 mM 5-HT; + $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle gemessen mit OP50⁻¹ + 0 mM 5-HT (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

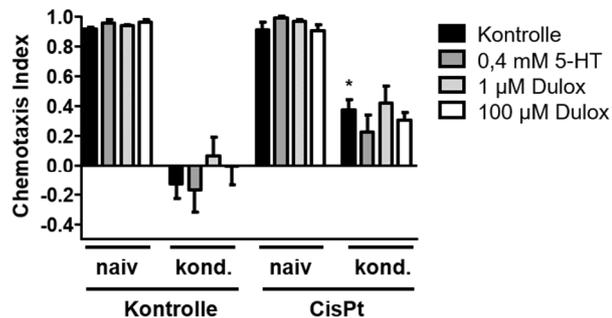


Abb. 40: Lernverhalten nach 48 h Cisplatin Behandlung.

Überprüfung des Lernverhaltens nach 48 h Co-Inkubation von N2 Tieren mit 0 und 100 μ M CisPt mit 5-HT (0,4 mM) oder Dulox (1 μ M oder 100 μ M). naiv: 1 h hungern in Abwesenheit von Nahrung; konditioniert (kond.): 1 h hungern in Anwesenheit von 100 % Benzaldehyd. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM aus $n=4$ unabhängigen Experimenten mit insgesamt $N \geq 304$ /Gruppe; * $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrolle. (One-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc test).

7.2 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert (Publikation Nr. 1) bzw. befinden sich aktuell in *Submission* (Publikation Nr. 2).

1.) Wellenberg A., Weides L., Kurzke J., Hennecke T., Bornhorst J., Crone B., Karst U., Brinkmann V., Fritz G., Honnen S. (2021). "Use of *C. elegans* as a 3R-compliant *in vivo* model for the chemoprevention of cisplatin-induced neurotoxicity" *Exp Neurol*. 2021 Jul;341:113705.

doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113705.

Auflistung des Eigenanteils:

Verfassen des Material- und Methodenteils, Mitverfassen des Ergebnis- und Diskussionsteils, Durchführung von Versuchen (Motility CisPt (Table 1), ROS Messungen (Fig. 3d), elektrophysiologische Messungen mit dem ScreenChip™ System (Fig. 6), pharyngeales Pumpen Paraquat (Supplementary Fig. 2b), Chemotaxis Assay (Supplementary Fig. 3a), Muskelzellkerne Acrylamid und Paraquat (Supplementary Fig. 5), body bends (data not shown)), Auswertung aller publizierten Ergebnisse und Erstellung sämtlicher publizierten Abbildungen und Tabellen.

2.) Wellenberg A., Brinkmann V., Bornhorst J., Ventura N., Honnen S., Fritz G. (2021). „Cisplatin-induced neurotoxicity involves the disruption of serotonergic neurotransmission.“ *Submitted*

Auflistung des Eigenanteils (zum aktuellen Zeitpunkt der *Submission*):

Verfassen des Material- und Methodenteils, Mitverfassen der Einleitung, des Ergebnis- und Diskussionsteils, Durchführung aller Versuche (außer HPLC-MS/MS-basierte Analyse), Auswertung sämtlicher Ergebnisse und Erstellung aller Abbildungen.

7.3 Danksagung

Ich möchte den Personen danken, die maßgeblich an der Realisierung und Fertigstellung meiner Doktorarbeit involviert waren.

Prof. Dr. Fritz danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im Institut für Toxikologie durchzuführen, die Betreuung und die ganze Unterstützung während meiner Promotion sowie für die Verlängerung meines Vertrags.

Prof. Dr. Rose danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Sebastian Honnen danke ich für die Stellung des Themas und das Vertrauen in mich dieses als geeignete Kandidatin zu realisieren.

Ich danke Prof. Dr. Julia Bornhorst dafür, dass ich mich mit jeder Idee melden konnte und für deine unglaubliche Hilfsbereitschaft.

Besonders möchte ich mich bei der gesamten AG Ventura des IUF dafür bedanken, dass ich all die Jahre das ScreenChip™ System nutzen konnte und Methoden von euch lernen durfte. In diesem Zusammenhang speziellen Dank an Vanessa, die mir vor unzähligen Jahren das ScreenChip System erklärt hat und mir bei jeder kleinen Fussel, die in dem Chip war, zur Seite stand.

Danke an Caro, Dario und Lea für die Unterstützung in jeglicher Form. Andi danke ich für die aufmunternden Worte, die Co-Betreuung und einfach die Hilfsbereitschaft vor allem während der letzten Phase meiner Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich mich noch ganz herzlich bei der AG Nollen aus Groningen und der AG Schumacher aus Köln für die Zusendung der benötigten *C. elegans* Mutanten in der Corona Zeit bedanken.

Natürlich gilt mein besonderer Dank Mama und Papa. Danke für alles, aber besonders für die jahrelange Unterstützung, das unermüdliche Vertrauen in mich und das gute Zureden zu jeder Zeit.

Tobias. Danke, dass du während meiner akademischen Laufbahn immer an meiner Seite warst und auch geblieben bist. Danke, dass du all meinen Frust und meine Verzweiflung in dieser Zeit ausgehalten hast und mir immer eine Stütze warst.

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation, weder in gleicher noch in ähnlicher Form, bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe keine vorherigen erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 17.08.2021

Anna Wellenberg

Working hard is important.
But there is something that matters even more,
believing in yourself...

Harry Potter

It's LeviOsa, not LeviosA.
Hermine Granger