

Aus dem Institut für Toxikologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

# Analyse neurotoxischer Effekte von Cisplatin und deren Modulation durch potenzielle Kandidatensubstanzen in *C. elegans*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Lea Veronika Weides  
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

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. *Experimental Neurology*, p. 113705 [1].

# Zusammenfassung

Platinhaltige Chemotherapeutika werden seit vielen Jahrzehnten erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt. Sie können jedoch schwere Nebenwirkungen verursachen, die die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken. Eine häufige und oft therapielimitierende Nebenwirkung von Cisplatin ist die Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathie (CIPN), deren Pathomechanismus nicht vollständig aufgeklärt ist. Im Gegensatz zu anderen Nebenwirkungen einer Chemotherapie sind für die CIPN zurzeit weder eine Prophylaxe noch eine effektive Therapie verfügbar.

In dieser Arbeit soll zum einen der Mechanismus der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität untersucht und zum anderen potenziell protektive Substanzen anhand des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) identifiziert werden. *C. elegans* ist ein seit Langem etablierter Modellorganismus, der viele Vorteile wie ein vollständig beschriebenes Konnektom und viele Homologe zu humanen Genen aufweist. Zudem gibt es für *C. elegans* als 3R-konformer Modellorganismus keine Einschränkungen durch ethische Bedenken.

Die Gabe von Cisplatin verursacht in *C. elegans* eine deutliche Neurotoxizität, die durch die Verringerung der pharyngealen Pumprate als Surrogatmarker messbar ist und in den verwendeten Cisplatin-Konzentrationen nicht durch eine Muskeltoxizität oder vorzeitige Alterung beeinflusst wird. Durch einen RNA-Interferenz-vermittelten *Knockdown* der Glutamat-Cystein-Ligase-Aktivität konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Funktion des Glutathion-Systems die Entstehung einer Cisplatin-induzierten Neurotoxizität begünstigt. Bei der Identifikation potenziell protektiver Substanzen zeigte eine Post-Inkubation mit N-Acetylcystein (NAC), Amifostin (aktiver Metabolit WR 1065) und Acetylsalicylsäure (ASS) eine Verringerung der neurotoxischen Wirkung von Cisplatin. Ein Effekt auf die Elimination von Cisplatin durch diese Kandidatensubstanzen konnte nicht festgestellt werden. Auch die Apoptoseinduktion durch Cisplatin in den mitotisch aktiven Gonaden von *C. elegans* wird durch eine Post-Inkubation mit den Kandidatensubstanzen nicht beeinflusst.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans* mitunter abhängig von der Cisplatin-bedingten GSH-Depletion ist. Substanzen, die diese Depletion wahrscheinlich verhindern (NAC und WR 1065), haben in *C. elegans* einen neuroprotektiven Effekt. Die anhand dieses CIPN-Modells gewonnenen Erkenntnisse könnten hilfreich für die weitere Untersuchung des Pathomechanismus und potenzieller Therapiemöglichkeiten sein.

# Summary

Platinum-based chemotherapeutic agents have been used successfully in anticancer therapy for decades. However, they can cause severe side effects that significantly reduce the patients' quality of life. A common therapy-limiting side-effect of cisplatin is chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN), but its pathomechanism is not well understood yet. In contrast to other anticancer drug-induced side effects, neither prophylaxis nor effective therapy are currently available for CIPN.

This project aims to investigate the mechanism of cisplatin-induced neurotoxicity and to identify potentially protective substances using the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). *C. elegans* is a long-established model organism that has many advantages such as a fully described connectome and many homologues to human genes. Furthermore, as a 3R-compliant model organism, *C. elegans* is not restricted by ethical concerns.

The administration of cisplatin causes significant neurotoxicity in *C. elegans*, which is measurable by the reduction of the pharyngeal pumping rate as a surrogate marker and is not disturbed by muscletoxicity or premature ageing in the cisplatin concentrations used. By an RNA interference-mediated knockdown of glutamate cysteine ligase activity, it has been shown that reduced glutathione system function promotes the development of cisplatin-induced neurotoxicity. In identifying potentially protective substances, post-incubation with N-acetylcysteine (NAC), amifostine (active metabolite WR 1065) and acetylsalicylic acid (ASA) showed a reduction in the neurotoxic effect of cisplatin. No effect on the elimination of cisplatin by these candidate substances has been observed. The apoptosis induction by cisplatin in the mitotically active gonads of *C. elegans* is also not affected by post-incubation with the candidate substances. The substances NAC, ASA and WR 1065 can therefore attenuate cisplatin-induced neurotoxicity without reducing the rate of apoptosis.

From these results, it can be concluded that cisplatin-induced neurotoxicity in *C. elegans* is, among other things, dependent on cisplatin-induced GSH depletion. Substances that probably prevent this depletion (NAC and WR 1065) have a neuroprotective effect in *C. elegans*. These findings gained from this CIPN model could be helpful for further investigation of the pathomechanism and potential therapeutic options.

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
ABTS	2,2'-azino-bis(3ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Carboplatin	Diamminplatin(II)-cyclobutan-1,1-dicarboxylat
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
CIPN	Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathie
Cisplatin, CisPt	<i>cis</i> -Diammindichloridoplatin(II)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH <sub>2</sub> O	Aqua destillata
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPG	Elektropharyngeogramm
EtOH	Ethanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
<i>gcs-1</i>	Glutamat-Cystein-Ligase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Mol
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
NAC	N-Acetylcystein
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NGM	<i>Nematode Growth Medium</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Oxaliplatin	Oxalato[(1R,2R)-cyclohexandiamin]platin(II)
p53	auch TP53: Tumorprotein 53
ppm	<i>pumps per minute</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SEM	<i>standard error of mean</i> , Standardfehler
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
STS	<i>sodium thiosulfate</i>
TAH	Thrombozytenaggregationshemmung
TBS(T)	<i>Tris-buffered saline (with Tween20)</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidative Capacity</i>
UV-C	Ultraviolettstrahlen Typ C (Wellenlänge 100 – 280 nm)
WHO	<i>World Health Organization</i>
WR 1065	<i>2-[(3-Aminopropyl)amino]ethanethiol dihydrochloride</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung .....	1
1.1 Platinverbindungen in der Krebstherapie und therapielimitierende Nebenwirkungen .....	2
1.1.1 Aufbau und Wirkmechanismus von Platinverbindungen.....	2
1.1.2 Die Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathie (CIPN) ist eine therapielimitierende Nebenwirkung der Cisplatin-Therapie .....	6
1.1.3 Die molekularen Ursachen der CIPN sind nicht vollständig aufgeklärt ....	10
1.1.4 Möglichkeiten zur Prävention oder Behandlung der CIPN fehlen .....	12
1.2 Etablierung des Nematoden <i>C. elegans</i> als Modell für die CIPN .....	15
1.2.1 Vorteile von <i>C. elegans</i> für die Verwendung als Modellorganismus .....	16
1.2.2 <i>C. elegans</i> verfügt über ein hochkomplexes Nervensystem .....	19
1.2.3 <i>C. elegans</i> als Modellorganismus zur Untersuchung von Neurotoxizität ..	23
1.3 Ziele dieser Arbeit .....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 <i>C. elegans</i> Stämme .....	26
2.1.2 Chemikalien, Lösungen und Medien .....	27
2.1.3 Geräte.....	31
2.1.4 Sonstige Materialien .....	32
2.1.5 Software und Statistik.....	32
2.2 Methoden .....	33
2.2.1 Kultivierung von <i>C. elegans</i> auf Festmedium .....	33

2.2.2	Kultivierung von <i>C. elegans</i> in Flüssigmedium .....	33
2.2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	34
2.2.4	Synchronisation .....	34
2.2.5	Bestimmung der antioxidativen Kapazität <i>in vitro</i> .....	35
2.2.6	Untersuchung der Muskelzellkerne .....	36
2.2.7	Bestimmung der Keimzellapoptose .....	37
2.2.8	Bestimmung der Alterspigmente.....	37
2.2.9	Ermittlung der pharyngealen Pumpfrequenz .....	38
2.2.10	RNA-vermittelte Interferenz über Fütterung.....	39
2.2.11	ICP-MS - Messung des Cisplatin-Gehalts .....	40
3	Ergebnisse .....	41
3.1	Cisplatin-Exposition verringert die pharyngeale Pumprate.....	41
3.2	Der <i>Knockdown</i> von <i>gcs-1</i> mittels RNAi verringert die pharyngeale Pumprate .....	43
3.3	NAC, WR 1065, Vitamin C und Koffein zeigen antioxidative Kapazität <i>in vitro</i> .....	45
3.4	Die Reduktion der pharyngealen Pumprate nach Cisplatin-Exposition kann durch eine Post-Inkubation mit bestimmten Testsubstanzen abgemildert werden .....	48
3.4.1	NAC-, WR 1065- und ASS-Post-Inkubation verringern die Cisplatin- induzierte Neurotoxizität .....	49
3.4.2	Die Post-Inkubation mit Vitamin C, Glukose und Koffein kann die Reduktion der Pumprate nach Cisplatin-Exposition nicht abmildern .....	52
3.5	Die Post-Inkubation mit NAC, WR 1065 und ASS hat keinen Einfluss auf den Cisplatin-Gehalt in den behandelten Nematoden.....	54
3.6	Die Post-Inkubation mit NAC, WR 1065 und ASS hat keinen Einfluss auf die Cisplatin-bedingt erhöhte Apoptoserate in den mitotisch aktiven Keimzellen von <i>C. elegans</i> .....	56
3.7	Die Behandlung mit Cisplatin führt in dem verwendeten Dosisbereich zu keiner Verminderung der Muskelzellkerne in <i>C. elegans</i> .....	59

3.8	Cisplatin-Exposition hat keine Auswirkung auf die Akkumulation der Alterspigmente .....	61
4	Diskussion.....	63
4.1	In den verwendeten Konzentrationen wirkt Cisplatin in <i>C. elegans</i> primär neurotoxisch.....	63
4.2	Eine verminderte Funktion des Glutathion-Systems kann eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in <i>C. elegans</i> aggravieren .....	66
4.3	Die antioxidative Kapazität der Testsubstanzen ist nicht entscheidend für die Abmilderung der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität.....	71
4.4	Die neuroprotektiven Testsubstanzen schränken die apoptotische Wirkung von Cisplatin in <i>C. elegans</i> nicht ein .....	81
4.5	Schlussfolgerung.....	84
4.6	Ausblick.....	85
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	90
6	Anhang.....	100

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformeln der drei klinisch relevantesten Platinverbindungen. ...3
Abbildung 2:	Übersicht über mögliche DNA-Addukte durch Platinverbindungen.....5
Abbildung 3:	Manifestationen der CIPN.....8
Abbildung 4:	Hauptmechanismen der Platin-induzierten Zell- und Neurotoxizität. .12
Abbildung 5:	Anatomie von <i>C. elegans</i> ..... 17
Abbildung 6:	Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> . .... 18
Abbildung 7:	Nervensystem von <i>C. elegans</i> .....21
Abbildung 8:	Intestinaltrakt von <i>C. elegans</i> mit schematischer Darstellung des Pharynx. ....22
Abbildung 9:	Die pharyngeale Pumprate wird durch Cisplatin-Exposition reduziert. ....43
Abbildung 10:	Die pharyngeale Pumprate wird durch den <i>Knockdown</i> von <i>gcs-1</i> mittels RNAi und Cisplatin-Exposition reduziert.....45
Abbildung 11:	Antioxidative Kapazität verwendeter Testsubstanzen und Platinderivate .....47
Abbildung 12:	Eine Post-Inkubation mit NAC, WR 1065 und ASS verringert die Abnahme der pharyngealen Pumprate nach Cisplatin-Exposition. ....51
Abbildung 13:	Die pharyngeale Pumprate wird durch Vitamin C-, Glukose- und Koffein-Post-Inkubation nach Cisplatin-Exposition nicht beeinflusst. .53
Abbildung 14:	NAC-, WR 1065- und ASS-Post-Inkubation verändern den Cisplatin-Gehalt nicht.....55
Abbildung 15:	NAC-, WR 1065- und ASS-Nachbehandlung haben keinen Einfluss auf die erhöhte Apoptoserate nach Cisplatin-Exposition in den mitotisch aktiven Keimzellen von <i>C. elegans</i> . ....57
Abbildung 16:	Einfluss von Cisplatin und Post-Inkubation mit Kandidatensubstanzen auf die Apoptoserate in <i>C. elegans</i> .....58
Abbildung 17:	Einfluss von Cisplatin auf die Muskelzellkerne in <i>C. elegans</i> . ....60
Abbildung 18:	Cisplatin zeigt in der verwendeten Konzentration keine Verminderung der Muskelzellkerne.....61
Abbildung 19:	Die Cisplatin-Exposition verändert die Akkumulation der Alterspigmente nicht. ....62
Abbildung 20:	Einfluss von Cisplatin auf die Akkumulation der Alterspigmente in <i>C. elegans</i> . ....62

Abbildung 21: Schematische Übersicht des Glutathion-Systems und des <i>Knockdowns</i> von <i>gcs-1</i> mittels RNAi in <i>C. elegans</i> . .....	67
Abbildung 22: NAC-, WR 1065- und ASS-Post-Inkubation verändern die Anzahl der 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen nicht. ....	103
Abbildung 23: Eine 48-stündige Puls-Behandlung mit 300 $\mu$ M Cisplatin zeigt stärker ausgeprägte Effekte als eine Puls-Behandlung mit 200 $\mu$ M Cisplatin. .....	104
Abbildung 24: Absolute Anzahl der Apoptosen aller Versuchsgruppen und Positiv- Kontrolle. ....	105
Abbildung 25: <i>Clearance-Assay</i> . ....	107
Abbildung 26: Morphologie des Nervensystems nach Cisplatin-Behandlung des Reporterstamms STR198. ....	109

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Wichtige Nebenwirkungen verschiedener Platinverbindungen. ....	7
Tabelle 2:	Auflistung der verwendeten <i>C. elegans</i> Stämme. ....	26
Tabelle 3:	Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien. ....	27
Tabelle 4:	Auflistung der verwendeten Geräte. ....	31
Tabelle 5:	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien. ....	32
Tabelle 6:	Auflistung der verwendeten Software. ....	33
Tabelle 7:	Inkubationsschema zur Ermittlung der pharyngealen Pumprate. ....	38
Tabelle 8:	Antioxidative Kapazität verwendeter Testsubstanzen und platinierender Substanzen im Vergleich zu Trolox. ....	46
Tabelle 9:	Auflistung der verwendeten Antikörper. ....	102

# 1 Einleitung

Krebserkrankungen waren laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahr 2011 mit ungefähr 8 Millionen Todesfällen die häufigste Todesursache weltweit [2]. Nach Schätzungen der WHO sind allein im Jahr 2012 ca. 14 Millionen Menschen neu erkrankt [2]. Ein weiterer Anstieg, der auf einen demographischen Wandel hin zu einer wachsenden und alternden Gesellschaft sowie auf eine erhöhte Prävalenz von Adipositas zurückgeführt wird, wird für die kommenden Jahre prognostiziert. Trotz verbesserter Diagnostik, besonders in frühen Stadien einer Krebserkrankung, soll sich die absolute Zahl der Sterbefälle von ca. 8 Millionen Menschen im Jahr 2011 auf bis zu 13 Millionen Menschen im Jahr 2030 erhöhen [2].

Neben der frühen Diagnostik spielt vor allem die effektive Therapie der verschiedenen Krebsarten eine wichtige Rolle. Neben lokalen Maßnahmen wie einer Operation oder einer Bestrahlung ist die systemische Therapie besonders in fortgeschrittenen Tumorstadien entscheidend. Zu diesen systemischen Therapien zählt die klassische Chemotherapie. Hier werden zytostatische, also das Wachstum oder die Teilung der Zelle hemmende, Medikamente eingesetzt. Diese haben das Ziel insbesondere schnell proliferierende Zellen abzutöten. Aber auch andere Körperzellen können auf diese Weise durch Zytostatika geschädigt und zerstört werden. Bei einer Chemotherapie ist daher das richtige Management der oftmals therapielimitierenden Nebenwirkungen maßgeblich am Therapieerfolg beteiligt.

Eine wichtige Gruppe von Chemotherapeutika stellen Platinverbindungen dar. Neben der Nephrotoxizität ist vor allem die Neurotoxizität eine häufige Nebenwirkung der Platinderivate. Insbesondere die sogenannte Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathie (CIPN) ist häufig dosis- und damit therapielimitierend und schränkt auch langfristig die Lebensqualität betroffener Patienten stark ein [3].

Auch wenn verschiedene Hypothesen über die Entstehung der CIPN bestehen, ist der Pathomechanismus nicht vollständig verstanden [1]. Für die Entstehung der Neurotoxizität durch Platinverbindungen ist beispielsweise der Weg über die Schädigung der nukleären DNA aber auch die Schädigung der mitochondrialen DNA relevant [3]. Daher soll der Pathomechanismus, hier im Speziellen der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität, anhand des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) genauer untersucht werden.

## 1.1 Platinverbindungen in der Krebstherapie und therapielimitierende Nebenwirkungen

Platinverbindungen werden seit fast 50 Jahren als Chemotherapeutika bei malignen Erkrankungen verwendet. Trotz der langjährigen Erfahrung im Einsatz dieser Medikamente führen ihre Nebenwirkungen weiterhin häufig zu einer Einschränkung der Therapie. Hier ist vor allem die neurotoxische Wirkung platinierender Chemotherapeutika zu nennen, da sie die Patienten auch nach Therapieende in ihrer Lebensqualität stark beeinträchtigen kann [3]. Besonders deutlich wird die Relevanz dieser Nebenwirkung, wenn man das vielfältige Einsatzgebiet platinhaltiger Chemotherapeutika in der Antitumor-Therapie genauer betrachtet.

Die für die Antitumor-Therapie heute bedeutendsten Platinderivate sind Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin [4]. Sie sind bei vielen Tumorarten Teil des Standard-Therapieschemas und werden zumeist in Kombination mit anderen Zytostatika-Gruppen eingesetzt, um die Antitumor-Effektivität durch den Einsatz verschiedener Wirkmechanismen zu erhöhen. Zu den Hauptanwendungsgebieten zählen das Bronchialkarzinom (Cis- und Carboplatin) und das Kolonkarzinom (Oxaliplatin) [5], zwei der häufigsten Tumorentitäten weltweit [2].

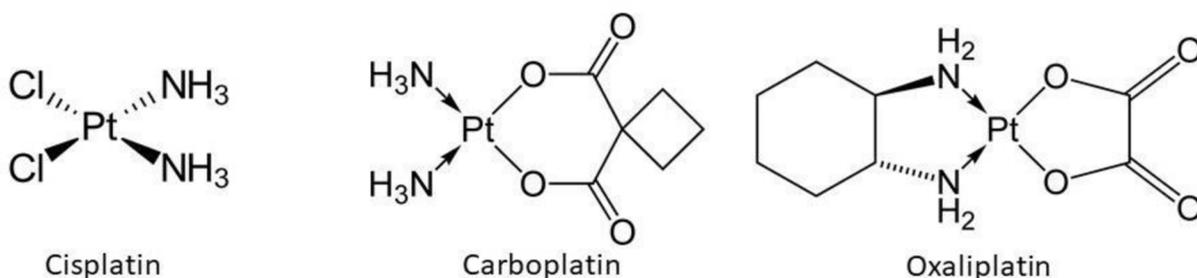
Auch viele Patienten mit gynäkologischen und urologischen Neoplasien erhalten eine platinhaltige Chemotherapie [5]. Häufig ist eine jüngere Patientengruppe von diesen Malignomen und damit einer entsprechenden Therapie und deren Nebenwirkungen betroffen. Ein Karzinom, das typischerweise bereits im jungen Erwachsenenalter auftritt, ist das Hodenkarzinom. Das Standardprotokoll „PEB“ besteht aus einer platinhaltigen Dreifachkombination: Cis-Platin, Etoposid und Bleomycin [5].

### 1.1.1 Aufbau und Wirkmechanismus von Platinverbindungen

Die zellteilungshemmende Wirkung von Platinverbindungen wurde von Barnett Rosenberg in den 1960er Jahren durch Zufall an dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) entdeckt [6]. Seit ihrer offiziellen Einführung im Jahr 1978 durch die *Food and Drug Administration* (FDA, USA) wurden Platinderivate stetig weiterentwickelt und können daher in mehrere Generationen unterteilt werden. Die drei Platinanaloga, die für den klinischen Gebrauch am relevantesten sind, sollen hier vorgestellt werden. Die Einteilung ist praxisrelevant, da die Verbindungen unterschiedliche chemische

Eigenschaften besitzen und beispielsweise jüngere Derivate bei manchen Tumorentitäten auf Grund eines günstigeren Nebenwirkungsprofils bei vergleichbarer Antitumor-Wirkung bevorzugt werden [7]. In dieser Arbeit soll insbesondere der Wirkmechanismus und das Nebenwirkungsprofil von Cisplatin betrachtet werden, welches die erste Generation von Platinanaloga darstellt.

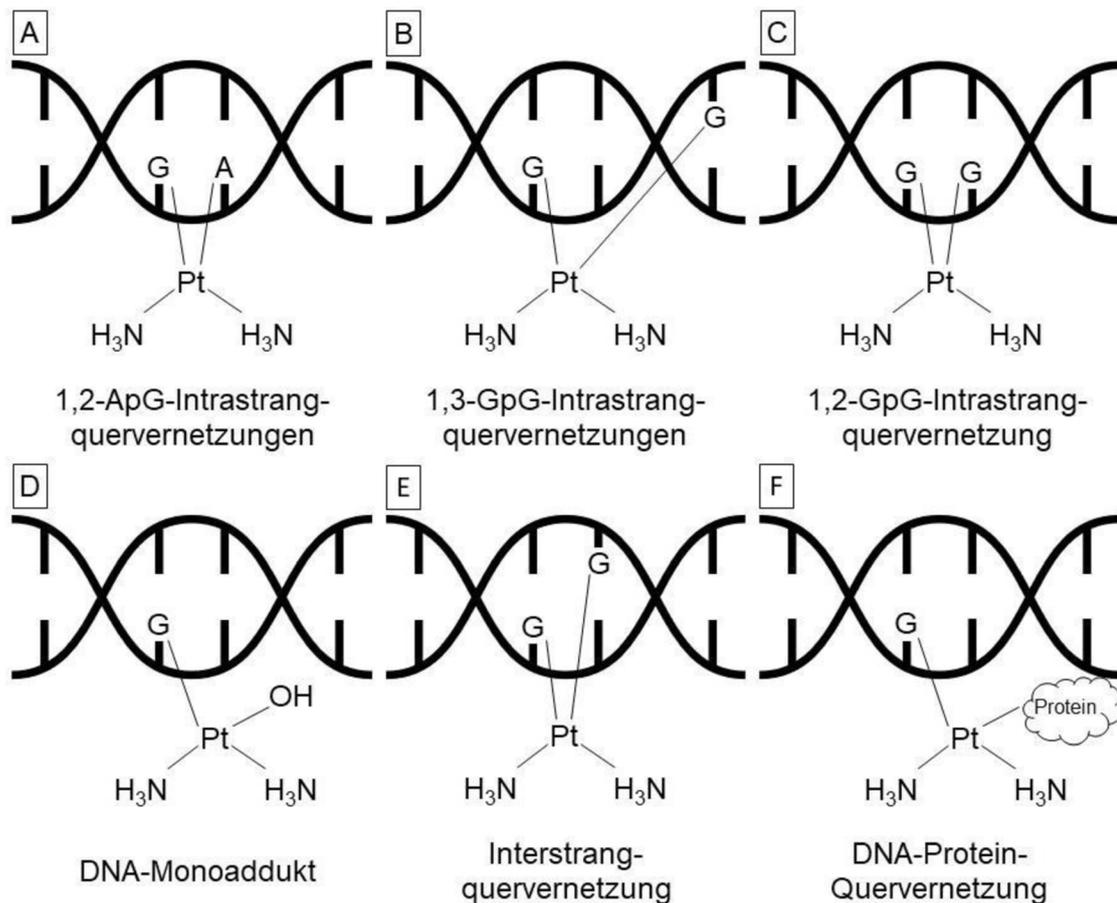
Einleitend lässt sich festhalten, dass die zytostatische Wirkung durch die Schädigung der Erbinformation, im Speziellen über die Bildung von Intrastrangquervernetzungen innerhalb der Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) entsteht. Dadurch werden weitere biologische Prozesse wie die Transkription und Replikation gehemmt, sodass schließlich der programmierte Zelltod, die Apoptose, eintritt. Die drei in der onkologischen Therapie am häufigsten eingesetzten Platinverbindungen unterscheiden sich in ihrer Struktur und dadurch auch in ihrer genauen Wirkung [5, 8]. Cisplatin, vollständig *cis*-Diammindichloridoplatin(II), besitzt zwei Chloridliganden, die in einer *cis*-Formation um das Platin-Zentralatom angeordnet sind. Bei Carboplatin, vollständig Diamminplatin(II)-cyclobutan-1,1-dicarboxylat, sind diese Chloridliganden hingegen durch eine Cyclobutan-1,1-dicarboxylat-Verbindung ersetzt [9] (Abbildung 1). Dies bedingt eine geringere Reaktivität von Carboplatin im Vergleich zu Cisplatin [10]. Insgesamt ist Carboplatin weniger potent als Cisplatin und daher sind höhere Dosierungen notwendig, um eine vergleichbare DNA-Schädigung zu erreichen [11]. Oxalato[(1R,2R)-cyclohexandiamin]platin(II), vereinfacht Oxaliplatin, gehört zur dritten Generation der Platinverbindungen und zeichnet sich durch einen Oxalatliganden und den sogenannten DACH-Liganden (1,2-Diaminocyclohexyl) aus. Neben dem genauen Wirkmechanismus zur DNA-Adduktbildung unterscheidet sich Oxaliplatin vor allem durch seine fehlende Kreuzresistenz mit Cis- und Carboplatin [12].



**Abbildung 1: Strukturformeln der drei klinisch relevantesten Platinverbindungen.**

Dargestellt sind die Strukturformeln der drei Platinverbindungen, die regelhaft als Zytostatika eingesetzt werden in chronologischer Reihenfolge nach ihrer Generation. Cisplatin zählt zu der ersten Generation, Carboplatin gehört der zweiten Generation an und Oxaliplatin ist ein Platinderivat der dritten Generation. Die Abgangsgruppe bei Cisplatin sind die Chloridliganden, bei Carbo- und Oxaliplatin die Carboxylgruppe [8].

Die Aktivierung der Platinverbindungen gibt Aufschluss über den Wirkmechanismus. Neben passiver Diffusion [13, 14] scheinen unter anderem auch Transporter für die Aufnahme von entscheidender Bedeutung zu sein. So werden Platinverbindungen zum Beispiel über den Kupfertransporter CTR1 [15] oder den Kationentransporter OCT1 oder OCT2 befördert, der auch relevant für die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Platinverbindungen sein kann [14]. Ebenso können Platinderivate durch Endozytose aufgenommen werden [16]. Die Transformation der Platinderivate in die reaktive Form findet erst mit Eintritt in die Zelle durch die intrazellulären Elektrolytverhältnisse statt. Bei Cisplatin findet auf Grund der intrazellulär niedrigeren Chloridkonzentration ein Austausch seiner beiden Chloridionen gegen zwei Wasserstoffmoleküle statt, sodass ein positiv geladenes, reaktives Molekül entsteht. Carboplatin verhält sich hier insgesamt ähnlich [17]. Oxaliplatin wird hingegen bereits im Blutplasma biotransferiert. Zuerst wird das Oxalat abgespalten und es entstehen Dichloroplatinkomplexe. Die Abspaltung des Chlorids erfolgt dann ebenso nach Eintritt in die Zelle, wodurch die reaktiven Mono- und Diaquakomplexe gebildet werden. Diese positiv geladenen Komplexe gehen innerhalb der Zelle bevorzugt Verbindungen mit nukleophilen Strukturen wie der DNA und RNA (Ribonukleinsäure) sowie mit Proteinen ein. Auf Grund der hohen Nukleophilie des Imidazolrings der Purinbasen erfolgt die Bindung insbesondere an dessen N7-Atom, sodass zunächst DNA-Monoaddukte entstehen. Fichtinger-Schepman et al. konnten zeigen, dass Guanosin dabei gegenüber Adenosin bevorzugt wird [18]. Diese Monoaddukte gehen anschließend eine weitere Bindung ein, sodass die typischen DNA-Quervernetzungen entstehen. Diese können sich dabei innerhalb eines DNA-Strangs (Intrastrangquervernetzungen), zwischen zwei Strängen (Interstrangquervernetzungen) oder zwischen einem DNA-Strang und einem Protein (DNA-Protein Addukt) bilden (Abbildung 2). Auf Grund dieser Präferenz sind die häufigsten Vernetzungen die 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzung mit einem Anteil von bis zu 65 %, gefolgt von bis zu 30 % 1,2-ApG-Intrastrangquervernetzungen. Weniger oft entstehen 1,3-GpG-Intrastrangquervernetzungen, 1,2-GpG-Interstrangquervernetzungen oder DNA-Proteinverbindungen [19].



**Abbildung 2: Übersicht über mögliche DNA-Addukte durch Platinverbindungen.**

Platinderivate können verschiedene DNA-Addukte erzeugen, am häufigsten sind mit über 90 % die Intrastrangquervernetzungen (A-C). Diese unterteilen sich in 1,2-ApG-Intrastrangquervernetzungen (A), 1,3-GpG-Intrastrangquervernetzungen (B) und 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzung (C). Außerdem kann auch ein reines Monoaddukt (D), eine Vernetzung zwischen zwei DNA-Strängen (Interstrangquervernetzung, E) oder eine Quervernetzung zwischen einem DNA-Strang und einem Protein entstehen (F). A = Adenosin, G = Guanosin.

Insbesondere die 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen sind für die Zytotoxizität von Cisplatin verantwortlich, unter anderem durch eine Formveränderung der DNA-Doppelhelix [20, 21]. Oxaliplatin zeigt dagegen andere Eigenschaften, die durch die Größe seiner Addukte und die Hydrophobie bedingt sind [22]. Deshalb neigt es die Form der Helix noch stärker als die beiden anderen Platinverbindungen [23]. So hat Oxaliplatin unter anderem durch die effizientere Inhibition der DNA-Synthese eine höhere zytotoxische Potenz [24, 25].

Diese DNA-Schädigungen können durch körpereigene Reparaturmechanismen, wie die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), beseitigt werden. Obwohl alle drei Arten von Intrastrangquervernetzungen durch die NER erkannt werden, werden die 1,2-Quervernetzungen weniger effizient repariert als die 1,3-Quervernetzungen, weshalb ihnen die zytotoxische Hauptwirkung zugesprochen wird [17, 26]. Als Konsequenz der

DNA-Schädigung und Deformierung der DNA-Doppelhelix durch Intrastrangquervernetzungen wird die DNA-Replikation und damit die DNA-Synthese blockiert [27]. Wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen für das Ausmaß der Schädigung nicht mehr ausreichend sind, leitet die Zelle die Apoptose ein: die DNA-Schädigung hat eine Aktivierung von p53 zur Folge, wodurch der Zellzyklusarrest gefördert und an der Apoptose beteiligte Faktoren aktiviert werden [28].

Ein weiterer die Apoptose begünstigender Stimulus ist die Entstehung von oxidativem Stress durch die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*). Unter physiologischen Bedingungen ist die Redox-Homöostase durch bestimmte Eliminationssysteme, wie beispielsweise das Glutathion-System, gut ausbalanciert [29]. Cisplatin fördert jedoch die Entstehung von oxidativem Stress, weshalb dieser Mechanismus mitverantwortlich für die allgemeine Toxizität von Cisplatin ist [30].

### 1.1.2 Die Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathie (CIPN) ist eine therapielimitierende Nebenwirkung der Cisplatin-Therapie

So vielfältig die Anwendungsbereiche von Platinverbindungen in der Therapie maligner Neoplasien sind, so verschieden sind auch die Organsysteme, in denen sie Nebenwirkungen verursachen können. Dabei zeigen sich vier Hauptnebenwirkungen (Tabelle 1). Die unerwünschten Wirkungen sind je nach eingesetztem Platinderivat, Kombination mit anderen Zytostatika und kumulativer Dosis unterschiedlich stark ausgeprägt. Neben einer Schädigung der Nieren ist auch eine Schädigung des Innenohres und eine Myelosuppression häufig. Vor allem aber weisen Platinverbindungen, insbesondere Cisplatin, eine neurotoxische Wirkung auf und können zu einer CIPN führen. Im Gegensatz zu allgemeinen Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen, die sich zumeist gut durch symptomorientierte Begleitmedikation wie beispielsweise Granisetron oder Aprepitant reduzieren lassen [31, 32], kann die CIPN kaum behandelt werden und schließlich so einschränkend sein, dass sie eine Dosisreduktion oder den Abbruch der Chemotherapie erfordert [33]. Verschiedene Studien legen nahe, dass die Problematik der Ototoxizität in unterschiedlichem Ausmaß nahezu alle Patienten nach Cisplatin-Gabe betrifft [34]. Besonders häufig leiden Kinder darunter [17]. Die Schädigung des Hörvermögens ist direkt von der kumulativen Dosis abhängig und kann irreversibel sein [32]. Das

Auftreten dieser Nebenwirkung variiert zwischen Platinderivaten verschiedener Generationen; Oxaliplatin zeigt im Gegensatz zu Cisplatin keine Ototoxizität [22], Carboplatin nur sehr selten. Carboplatin hat jedoch eine typische Nebenwirkung, die sonst kaum auftritt: insbesondere durch hohe Dosen kann ein myelotoxischer Effekt ausgelöst werden. Auswirkungen der Myelosuppression sind ein Mangel an verschiedenen Blutzellen, hier vor allem eine schwere Thrombozytopenie und teilweise auch eine Leukopenie [35].

Die Ausscheidung von Platinanaloga erfolgt hauptsächlich über die Nieren. Cisplatin wird glomerulär filtriert und zum Teil auch tubulär sekretiert [36]. Insbesondere bei hohen Dosen akkumuliert Cisplatin in den Nierenepithelzellen und wirkt dort toxisch [37]. Um dies zu verhindern ist eine adäquate Wässerung, beispielsweise mit 500 ml isotoner Kochsalzlösung intravenös [5], vor und nach der Cisplatin-Therapie essentiell [38]. Außerdem kann besonders bei hohen Dosen zusätzlich eine osmotische Diurese in Betracht gezogen werden, zum Beispiel mit Mannitol [38, 39].

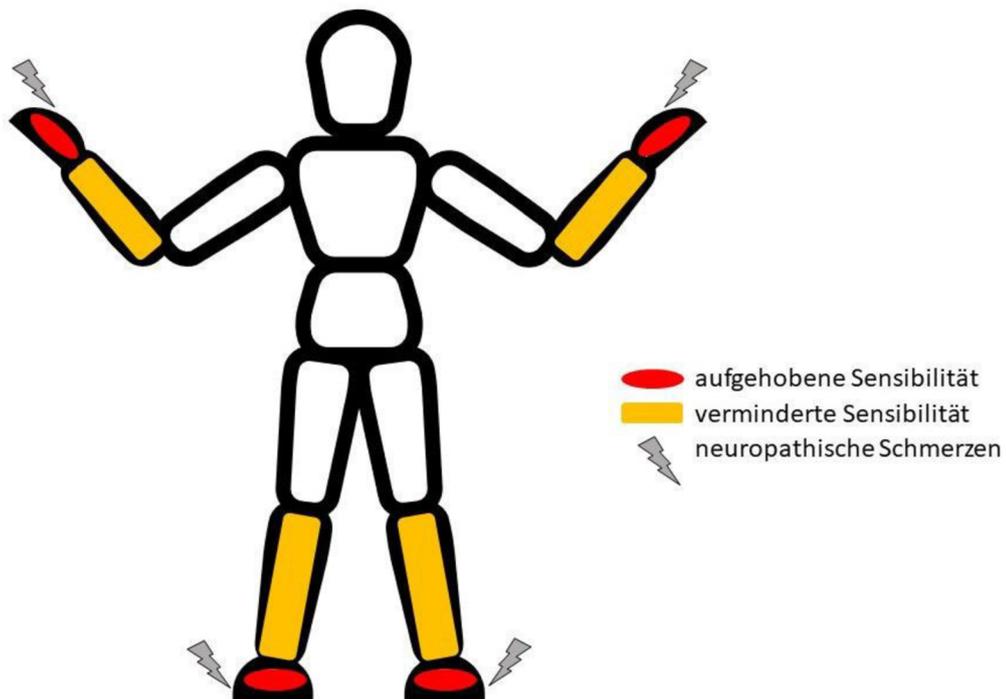
**Tabelle 1: Wichtige Nebenwirkungen verschiedener Platinverbindungen.**

Modifiziert nach Rabik und Dolan [17].

<b>Toxizität</b>	<b>Cisplatin</b>	<b>Carboplatin</b>	<b>Oxaliplatin</b>
<b>Ototoxizität</b>	Erwachsene: 23 – 50 % Kinder: > 50 %	≈ 1 %	selten
<b>Periphere Neuropathie</b>	Erwachsene: 30 – 86 % Kinder: ≈ 10 %	konventionelle Dosis: 6 % Hochdosis: 25 %	akut: 95 % kumulativ: 15 %
<b>Nephrotoxizität</b>	≈ 20 – 41 %	Patienten mit irregulärer Nierenfunktion	selten
<b>Myelo-suppression</b>	< 5 %	konventionelle Dosis: 20 – 40 % Hochdosis: > 90 %	selten

Im Gegensatz zu den vielfältigen Möglichkeiten, um die oben genannten Nebenwirkungen zu verringern, gibt es bisher nur wenige wirksame Ansatzpunkte, um die durch Platinverbindungen erzeugte Neurotoxizität zu verhindern. Damit ist die CIPN ein klinisch relevanter dosislimitierender Faktor [1, 40] und gewinnt an Bedeutung, da die Anzahl der Überlebenden nach einer Chemotherapie wächst. Dadurch treten insbesondere die Langzeit-Auswirkungen der CIPN in den Vordergrund und damit die Problematik, dass viele Patienten über Jahre mit diesen Einschränkungen leben müssen [41]. Bei bis zu 50 % der Patienten bleibt die Neuropathie auch nach Beendigung der Medikamentengabe weiter bestehen und

chronifiziert [42]. Die Hauptsymptome der CIPN sind Sensibilitätsstörungen im Sinne eines Taubheitsgefühls oder Missempfindungen, bis hin zu neuropathischen Schmerzen, insbesondere nach Cisplatin-Therapie [41]. Die Parästhesien sind vor allem symmetrisch distal betont und folgen häufig einem handschuh- oder strumpfförmigen Muster [43] (Abbildung 3). Der Verlust des Vibrations- und Tastempfindens sowie der Propriozeption kann zu einer sensorischen Ataxie mit Gangunsicherheit und subjektiver Ungeschicklichkeit führen [41].



**Abbildung 3: Manifestationen der CIPN.**

Die CIPN zeigt ein strumpf- oder handschuhförmiges Muster und geht mit einer distal beginnenden Störung bis Aufhebung der Sensibilität, des Vibrations- und Temperaturempfindens einher. Auch eine neuropathische Schmerzempfindung, die sich als Brennen oder Stechen äußern kann, ist möglich [41].

Die genauen Mechanismen der Entstehung der CIPN sind bisher nicht aufgeklärt. Vor allem ist das periphere Nervensystem betroffen, bei der Behandlung mit Cisplatin insbesondere die sensorischen Anteile. Bei einer durch Taxane oder Vinca-Alkaloid ausgelösten CIPN können hingegen auch motorische und autonome Funktionen betroffen sein [44]. Schon früh konnte gezeigt werden, dass sich die motorische Nervenleitgeschwindigkeit und die Aktionspotenziale der motorischen Einheiten nach Cisplatin-Therapie nur wenig ändern, während die distalen sensorischen Latenzen deutlich verlängert waren [45]. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden auch Nervenbiopsien entnommen, die bereits eine axonale Degeneration sowie einen Verlust insbesondere der Nervenfasern mit großem Durchmesser zeigten [45]. Über

eine Beeinträchtigung des autonomen Nervensystems nach Cisplatin-Gabe gibt es einige Fallberichte, jedoch kann kein regelhaftes Auftreten verzeichnet werden [46-48]. Die Barrierefunktion der Blut-Hirn Schranke schützt das zentrale Nervensystem (ZNS) vor neurotoxischen Effekten der Platinanaloga [49]. Durch sehr hohe systemische Dosen oder gar die intrathekale Gabe kann die Blut-Hirn Schranke überwunden werden und so eine ZNS-Toxizität auftreten [49]. Der primäre Ort der Schädigung durch Cisplatin ist das periphere Nervensystem, insbesondere die Spinalganglien des Rückenmarks, auch DRG abgekürzt (engl. *dorsal root ganglion*) [17, 50]. Für Cisplatin wird außerdem angenommen, dass es die Funktion eines Calciumkanalblockers haben kann, wodurch sich die intrazelluläre Calcium-Homöostase ändert und Neurone wie die DRGs die Apoptose einleiten [4].

Mehrere Faktoren können das Auftreten und die Intensität der CIPN beeinflussen. Ein entscheidender Faktor ist dabei die Höhe der Einzeldosis. Glendenning et al. sahen für Cisplatin eine CIPN bereits in Patientengruppen mit einer Cisplatin-Dosis  $> 200 \text{ mg/m}^2$  [51], die aktuelle S3-Leitlinie definiert den Grenzwert bei  $>300 \text{ mg/m}^2$  [52]. Außerdem sind neben der Höhe der Einzeldosis auch die kumulative Dosis sowie die Dauer der Therapie entscheidend [40]. Auch persönliche Voraussetzungen wie das Alter oder vorbestehende Schädigungen, wie beispielsweise durch einen Diabetes mellitus oder Alkoholabusus, können die Ausprägung der CIPN beeinflussen [53] und in klinischen Studien als Confounder wirken [51]. Je nach kumulativer Dosis kann die CIPN nach Absetzen der Zytostatika vollständig reversibel sein [53]. Im Gegensatz dazu können die Symptome sich aber auch nach Abschluss der Therapie verstärken. Dieser Effekt wird als "*Coasting*" bezeichnet [54].

Die klassische CIPN, wie sie bisher beschrieben wurde, ist hauptsächlich eine Folge von Cisplatin. Carboplatin ist hingegen weniger neurotoxisch und zeigt diese Nebenwirkung vor allem bei der Gabe hoher Dosen [9]. Oxaliplatin kann im Gegensatz zu Cis- und Carboplatin neben einer chronischen auch eine akute sensorische periphere Neuropathie auslösen [17, 55]. In einer Studie von Argyriou et al. trat diese akute Neuropathie bei ca. 86 % der Patienten auf. [56]. Diese Form ist zumeist innerhalb weniger Stunden bis Tage reversibel. Außerdem zeigten sich bei der Verwendung von Oxaliplatin auch Kälte-induzierte Dysästhesien, allerdings nicht nur an den Händen sondern auch im Gesicht, Mund und Rachen [41]. Bei dieser akuten Form der Neuropathie ist der Mechanismus im Gegensatz zur CIPN weitestgehend bekannt. Durch die Chelatbildung des Oxalats mit Calcium- und Magnesiumionen wird

die Kinetik der spannungsabhängigen Natriumkanäle so verändert, dass der Natriumfluss sinkt und es zu einer axonalen Übererregbarkeit kommt [56-58].

Die CIPN kann auch durch andere klassische Chemotherapeutika erzeugt werden, die häufig sogar in Kombination mit Platinderivaten verabreicht werden [42]. Zu dieser Gruppe der CIPN-Auslöser zählen unter anderem das Taxan Paclitaxel [59] sowie das Vinca-Alkaloid Vincristine [60]. Bisher ist unklar, ob die CIPN bei einer Kombinationstherapie gehäuft auftritt und ob die Wirkung dann synergistisch oder additiv ist [44]. Aber auch Substanzen der neuen, sogenannten „zielgerichteten“ Krebstherapien (engl. *targeted therapy*) können eine periphere Neuropathie auslösen [1, 61]. So ist diese Nebenwirkung beispielsweise für den Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Handelsname *Velcade®*), der zur Behandlung des Multiplen Myeloms verwendet wird, typisch und geht oft mit starken neuropathischen Schmerzen einher [61]. Auch monoklonale Antikörper wie beispielsweise Brentuximab-Vedotin, das bei verschiedenen Lymphomen eingesetzt wird, zeigen vereinzelte neurotoxische Effekte [61].

### 1.1.3 Die molekularen Ursachen der CIPN sind nicht vollständig aufgeklärt

Durch die regelhafte und häufig alternativlose Verwendung von Platinverbindungen seit mehreren Jahrzehnten ist das klinische Bild der CIPN hinreichend bekannt. Der genaue Pathomechanismus ist bisher jedoch nicht aufgeklärt. Auch wenn in der Vergangenheit viele Experimente und Studien zu diesem Thema durchgeführt worden sind, besteht weiterhin Forschungsbedarf [62]. Denn das detaillierte molekulare Verständnis der Pathogenese ist vor allem für die Entwicklung einer effektiven Behandlung oder Prophylaxe der CIPN essenziell [1]. Bisher mangelt es an Möglichkeiten, das Auftreten dieser Nebenwirkung effektiv zu verringern, sodass sie häufig zum Therapieabbruch führt.

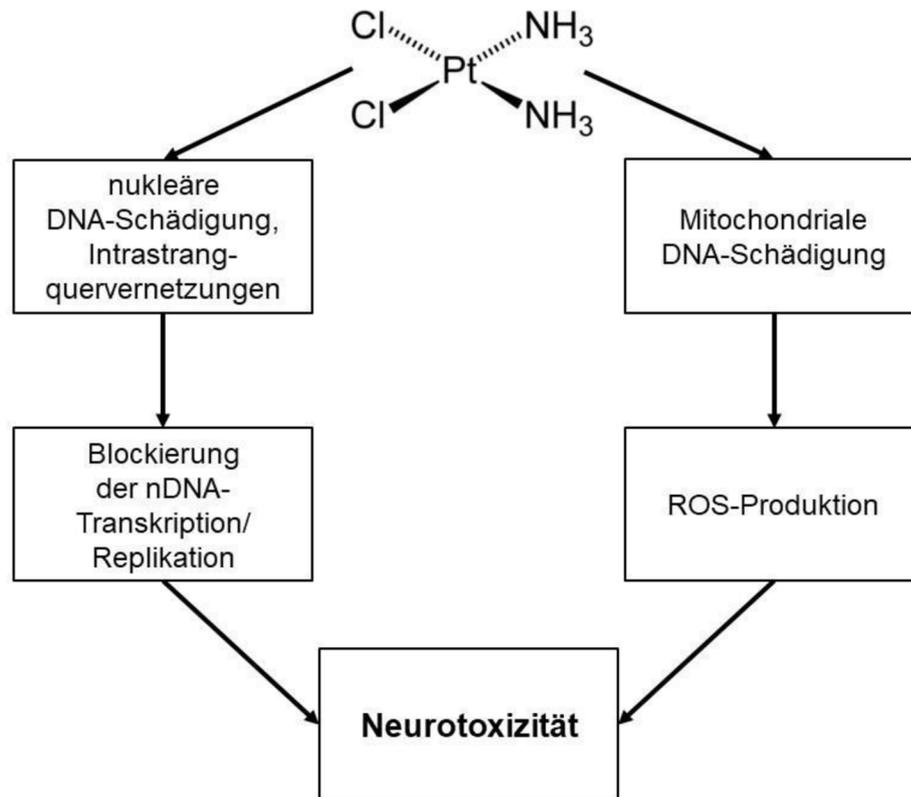
Periphere Nerven werden stark durch Platinverbindungen beeinträchtigt, weil diese Substanzen in der Lage sind, in die Spinalganglien des Rückenmarks (DRG) einzutreten und dort ihre volle Wirkung zu entfalten [63]. Auf Grund der fehlenden Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke kann Cisplatin in den DRGs akkumulieren, weshalb sich hier deutlich höhere Konzentrationen als im ZNS finden [63, 64]. Nach Aufnahme in die Nervenzellen bilden Platinverbindungen DNA-Addukte aus [65]. McDonald et al. konnten nachweisen, dass Cisplatin sogar vermehrt an die DNA

neuronaler Zellen bindet. Die Quantifizierung der Addukte erfolgte mittels ICP-MS (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*), einer massenspektrometrischen Methode. Die Adduktbildung führt im Wesentlichen zur Apoptose der DRGs [65]. Es ist anzunehmen, dass die Anzahl der durch Platin verursachten DNA-Addukte für das Ausmaß der Neurotoxizität entscheidend ist. So zeigt Oxaliplatin, ein weniger neurotoxisches Platinderivat, im Gegensatz zu Cisplatin deutlich weniger DNA-Addukte in den DRGs [66].

Ein weiterer Grund für die besondere Sensitivität von Nervenzellen gegenüber Platinderivaten könnte die ineffizientere DNA-Reparatur sein. Es konnte gezeigt werden, dass durch UV-Bestrahlung ausgelöste DNA-Doppelstrangbrüche in differenzierten neuronalen Zellen nur langsam repariert werden können [67]. Zudem ist bekannt, dass Platin-induzierte DNA-Schäden und die Kapazität der DNA-Reparatur (NER) auch das Ausmaß ototoxischer [68] und neurotoxischer Effekte [69] von platinierenden Substanzen bestimmen. Des Weiteren konnte bereits in den 1970er Jahren gezeigt werden, dass Zellen der Neuroretina während ihrer Differenzierung die Fähigkeit zur Nukleotidexzisionsreparatur (NER) verlieren [70]. Die NER, die für die Reparatur von Platin-induzierten DNA-Schäden entscheidend ist, gilt in differenzierten neuronalen Zellen als abgeschwächt [71].

Neben der Schädigung der nukleären DNA ist auch der durch Platin verursachte mitochondriale Schaden wichtig, um die Entstehung der CIPN vollständig zu beleuchten [72]. Eine mitochondriale Dysfunktion und damit ein beeinträchtigter Energiestatus der Neurone gilt laut Treacarichi und Flatters inzwischen als ein Hauptfaktor für die Entstehung aber vor allem auch Aufrechterhaltung der CIPN [73]. Cisplatin schädigt die mitochondriale DNA (mtDNA) direkt, wodurch die Funktion der Atmungskette beeinträchtigt wird [74]. Dies führt zu einem chronischen Energiedefizit, das mit einer Degeneration in sensorischen, primär afferenten Neuronen einher geht und damit schließlich zu einer chronischen peripheren Neuropathie führt [75, 76]. Die Schädigung der mtDNA ist außerdem eng mit der Erhöhung der ROS-Level verknüpft [1, 72]; erhöhte ROS-Level können wiederum zu einer neuronalen Schädigung führen [77]. Die mitochondriale Schädigung wird insbesondere im Zusammenhang mit dem „*Coasting*“-Phänomen, dem Andauern oder Aggravieren neuropathischer Schmerzen nach Therapiebeendigung, diskutiert [78].

Für die Schäden, die Platinverbindungen in den Nervenzellen verursachen, sind also zwei Haupt-Hypothesen vorherrschend. Zum einen wird der Einfluss auf die nukleäre, zum anderen auf die mitochondriale DNA diskutiert [1, 73, 77] (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Hauptmechanismen der Platin-induzierten Zell- und Neurotoxizität.**

Platinderivate schädigen nicht nur die nukleäre DNA und führen über diesen Weg zur Apoptose. Auch die mitochondriale DNA wird durch Cisplatin geschädigt, was zu einer Erhöhung der ROS-Level führen kann. Diese Mechanismen sind auch für die Entstehung einer Neurotoxizität bedeutend [77].

### 1.1.4 Möglichkeiten zur Prävention oder Behandlung der CIPN fehlen

Auch wenn bisher keine Prävention oder Therapie der CIPN etabliert ist, gibt es verschiedene Therapieansätze, die auf den oben genannten Hypothesen basieren. So lässt der vermutete Beitrag von oxidativem Stress zur Entstehung der CIPN die Überlegung zu, dass Antioxidantien einen (neuro-)protektiven Effekt haben könnten. Eine protektive Wirkung kann hierbei neben der Wirkung als Radikalfänger auch durch die Bindung und damit Entgiftung der toxischen Substanz gegeben sein.

Bei der Entgiftung von ROS spielt unter anderem das Glutathion-System eine wichtige Rolle. Das körpereigene Tripeptid Glutathion (GSH), welches aus den drei

Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin besteht, ist das mengenmäßig am meisten vorhandene Antioxidans in menschlichen Zellen und somit maßgeblich an der ROS-Homöostase beteiligt. Zu Glutathion gab es bereits Mitte der neunziger Jahre einige Studien, die Hinweise auf eine Neuroprotektion nach Gabe von Cisplatin lieferten, ohne die Antitumor-Wirkung der Chemotherapie durch die GSH-Gabe einzuschränken [79-81]. Es konnte gezeigt werden, dass die Platin-Konzentration in den DRGs bei GSH-Gabe geringer ist [82]. Neben Glutathion sind auch Metallothioneine über die Thiol-Gruppe ihres Cystein-Anteils in der Lage, Schwermetalle zu binden [83]. Auch eine Vorstufe von Glutathion, N-Acetylcystein (NAC) wurde hinsichtlich seines neuroprotektiven Potenzials untersucht. Es konnte eine Reduktion der durch Oxaliplatin-induzierten Neuropathie bei Patienten mit Kolorektalkarzinom gezeigt werden [84]. Neben einer neuroprotektiven Wirkung ist auch eine potenzielle Nephroprotektion für NAC beschrieben worden [85].

Auch weitere Substanzen mit antioxidativen Eigenschaften wurden bereits untersucht. So konnte durch Vitamin E, das zusätzlich zur Therapie mit Cisplatin verabreicht wurde, eine geringere Ausprägung der Neuropathie erreicht werden [86]. Für Amifostin wurde *in vitro* gezeigt, dass es einen durch Cisplatin verursachten neuronalen Schaden bei einer Post-Inkubation verringern konnte [87]. Der Einsatz von Amifostin für die Prophylaxe einer CIPN ist jedoch leitliniengerecht nur eingeschränkt empfohlen (Empfehlungsgrad B, „sollte“-Empfehlung) [52].

Es gibt Hinweise dafür, dass antioxidative Substanzen neuroprotektiv wirken können und so die durch Platinderivate verursachte CIPN abschwächen oder möglicherweise sogar verhindern können. Insgesamt ist die Evidenz bisher jedoch gering, da die Studien häufig nur kleine Patientengruppen einschließen und die Messung der Neuropathie uneinheitlich ist. Eine ausführliche Übersicht der Studien zu diesem Thema liefert die Metaanalyse von Albers et al. aus der *Cochrane Library* sowie die deutsche S3-Leitlinie Onkologie „Supportive Therapie bei onkologischen PatientInnen“ [52, 88]. Einen Blick auf die chronologische Entwicklung liefert das Review von Avan et al. [54]. Auch wenn es sich bei den vorgestellten Daten häufig um randomisierte, kontrollierte Studien (engl. *randomized controlled trial*, RCT) handelt, kann bisher auf Grund der oben genannten Limitationen keine Empfehlung für die Verwendung der getesteten Substanzen ausgesprochen werden [52]. Für die Prophylaxe von radiogenen Schäden hingegen gibt es eine eingeschränkte Empfehlung für Amifostin (Empfehlungsgrad 0; Empfehlung offen; „kann“-Empfehlung), zum Beispiel für die Prophylaxe einer Diarrhö im Rahmen einer

radiogenen Enteritis oder für die radiogene Proktitis, nicht jedoch für die radiogene Mukositis [52]. Aus diesem Grund gibt es einen Bedarf an weiteren Untersuchungen in diesem Bereich, insbesondere im Hinblick auf die Balance zwischen Neuroprotektion und Erhaltung der Antitumor-Wirkung [40, 62]

Durch das „Leitlinienprogramm Onkologie“ der „Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.“ (AWMF), der „Deutschen Krebsgesellschaft e.V.“ (DKG) und der „Deutschen Krebshilfe“ (DKH) gibt es daher bisher lediglich Empfehlungen für die mögliche symptomatische Therapie einer bereits chronifizierten CIPN [52, 89]. Hierzu werden in der klinischen Praxis häufig Medikamente aus den Gruppen der Antidepressiva (zum Beispiel Duloxetin oder Venlafaxin) oder Antikonvulsiva (zum Beispiel Gabapentin oder Pregabalin) eingesetzt, die zuvor eine Wirkung bei neuropathischen Schmerzen von Patienten mit Diabetes mellitus gezeigt haben. Bisher konnte jedoch keine eindeutige Besserung der CIPN durch die Therapie mit diesen Medikamenten in Studien gezeigt werden, sodass auch dieser Ansatzpunkt diskussionswürdig bleibt und die Leitlinie hier aktuell lediglich eine „Erwägung“ empfiehlt [40, 52, 62]. Sogar für eine rein symptomatische Therapie vor allem der neuropathischen Schmerzen im Rahmen der CIPN besteht nur eine eingeschränkte Empfehlung nach einer gründlichen Nutzen-Risiko Abwägung. Da häufig sedierende Effekte durch die zur Verfügung stehenden Medikamente auftreten, soll deren Einsatz lediglich erwogen werden [52]. Beispielsweise besteht für Antidepressiva wie Duloxetin der Empfehlungsgrad B („sollte“-Empfehlung) [52]. Die Anwendung von Duloxetin in der Schmerztherapie der CIPN ist laut der S3-Leitlinie „Supportive Therapie bei onkologischen PatientInnen“ als *off label* Therapie zu verstehen, weil Duloxetin nur bei der Schmerztherapie einer diabetischen Neuropathie zugelassen ist [52]. Ebenso ist der Empfehlungsgrad eingeschränkt für die Antikonvulsiva Gabapentin (Empfehlungsgrad 0, „kann“-Empfehlung) und Pregabalin (Expertenkonsens) [52]. Die bisher einzige konsensbasierte Empfehlung der aktuellen S3-Leitlinie bei manifester CIPN gilt für die Bewegungstherapie zur Verbesserung der Funktionalität. Diese umfasst beispielsweise Balanceübungen, sensomotorisches Training und Koordinationstraining [52].

Um aussagekräftige präklinische Untersuchungen zu ermöglichen und damit die Entwicklung neuer Therapieansätze in diesem Bereich voranzutreiben, bedarf es geeigneter experimenteller Analyse-Modelle. Zwar gibt es diverse *in vivo* Säugetiermodelle, die die Modellierung der CIPN ermöglichen [90], jedoch sind diese häufig arbeits- und kostenintensiv und werden teilweise durch ethische Bedenken

eingeschränkt. In diesen Punkten können alternative Modellsysteme den klassischen Säugetiermodellen überlegen sein. Um insbesondere die molekularen Ursachen der neurotoxischen Wirkung von Cisplatin genauer untersuchen zu können, würde sich ein Modellorganismus anbieten bei welchem das komplette Konnektom bekannt ist. Ein Modellorganismus, der diese Vorteile vereint, ist *C. elegans*. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Modellorganismus *C. elegans* gewählt, welcher sich auf Grund seines vollständig beschriebenen Nervensystems insbesondere für die Analyse neurotoxikologischer Fragestellungen eignet [1, 91]. Mit Hilfe des Nematoden soll der Pathomechanismus der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität genauer beleuchtet, vor allem aber eine Neuroprotektion durch ausgewählte Kandidatensubstanzen in *C. elegans* modelliert werden. Auf diese Weise soll untersucht werden, ob sich dieses Modell auch für Screenings potenziell protektiver Substanzen eignet und *C. elegans* im Sinne des 3R-Konzepts (engl. *reduce, replace, refine*, dt. reduzieren, ersetzen, weiterentwickeln) ressourcenschonend eingesetzt werden [1].

## 1.2 Etablierung des Nematoden *C. elegans* als Modell für die CIPN

Bereits vor über fünfzig Jahren erkannte der Molekularbiologe und spätere Nobelpreisträger Sydney Brenner den wissenschaftlichen Nutzen des ca. 1 mm großen Fadenwurms und etablierte *C. elegans* als Modellorganismus [92]. Der Nematode ist seitdem für die Forschung auf Grund seiner vielen Vorteile höchst attraktiv und ein anerkanntes Modellsystem für die Untersuchung verschiedener biologischer, chemischer und medizinischer Fragestellungen [1, 93]. Die Besonderheit von *C. elegans* als Modellorganismus macht eine Mischung aus „Einfachheit und Komplexität“ aus [94].

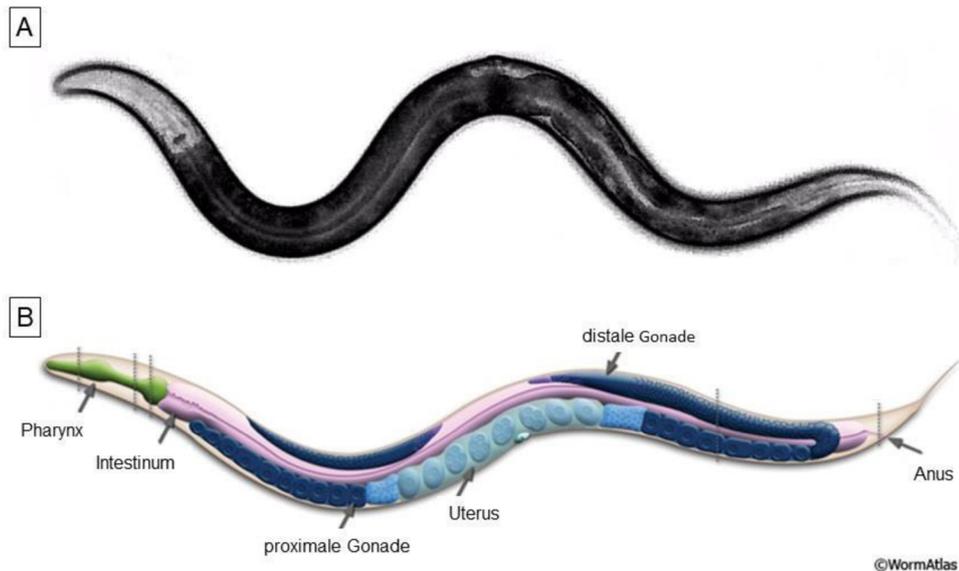
Natürlicherweise lebt der Nematode *C. elegans*, ein nicht parasitärer Vertreter seiner Art, frei im Erdboden. Dort bildet der Fadenwurm einen wichtigen Bestandteil der Nahrungskette [95, 96]. In seiner natürlichen Umgebung ernährt sich *C. elegans* von Bakterien und von kleinen Eukaryoten, die vermutlich essenziell für die Aufnahme von Cholesterin sind [97]. Dies ist für den Nematoden lebensnotwendig, da er Cholesterin-auxotroph ist. Unter experimentellen Bedingungen wird *C. elegans* auf Agar-Platten oder in Flüssigmedium kultiviert und mit einem *E. coli*-Stamm gefüttert.

## 1.2.1 Vorteile von *C. elegans* für die Verwendung als Modellorganismus

Auf der Suche nach einem geeigneten multizellulären Modellorganismus fand Sydney Brenner viele der geforderten Eigenschaften in dem Nematoden *C. elegans* [92]. So ist der Nematode über den kompletten Lebenszyklus transparent, mit 1 mm sehr klein und mit bis zu 300 Nachkommen schnell und kostengünstig zu vermehren [92, 98]. Als Konsektivzwitter ist *C. elegans* zur Selbstbefruchtung fähig. Es kommen aber auch Männchen vor, wodurch Kreuzungsexperimente möglich sind [92].

*C. elegans* ist ein vollständiger Organismus, der über verschiedene differenzierte Zelltypen und Organe verfügt [94]. Dabei ist die Zellzahl in jedem Individuum aber exakt gleich, was als Eutelie bezeichnet wird [99]. Während der Embryogenese entstehen 671 Zellen, bis zum Erwachsenenalter sind es insgesamt 1090 Zellen, von denen 131 durch Apoptose während der Entwicklung wieder entfernt werden [100]. Der adulte Nematode besitzt somit 959 somatische Zellkerne mit je fünf Autosomen und ein X-Chromosom in diploidem Satz. Insgesamt sind davon 95 Muskelzellen der Körperwand, die zur Fortbewegung dienen und 302 Neurone [101].

*C. elegans* verfügt über verschiedene Organe (Abbildung 5). Für die Nahrungsaufnahme besitzt der Nematode einen neuromuskulären Schlund, den Pharynx. Mit diesem nimmt der Fadenwurm die Bakterien durch Pumpbewegungen auf [102]. Außerdem verfügt der Nematode über einen Darm, der sich an den Pharynx anschließt. Er zieht sich durch den gesamten Körper und hat die Aufgabe der Nahrungsverdauung und anschließenden Ausscheidung. Auch das System für die Fortpflanzung ist komplex und besteht aus mehreren Anteilen. *C. elegans* besitzt zwei U-förmige Gonaden und eine Vulva, über die die Embryonen nach der Befruchtung abgelegt werden [103].



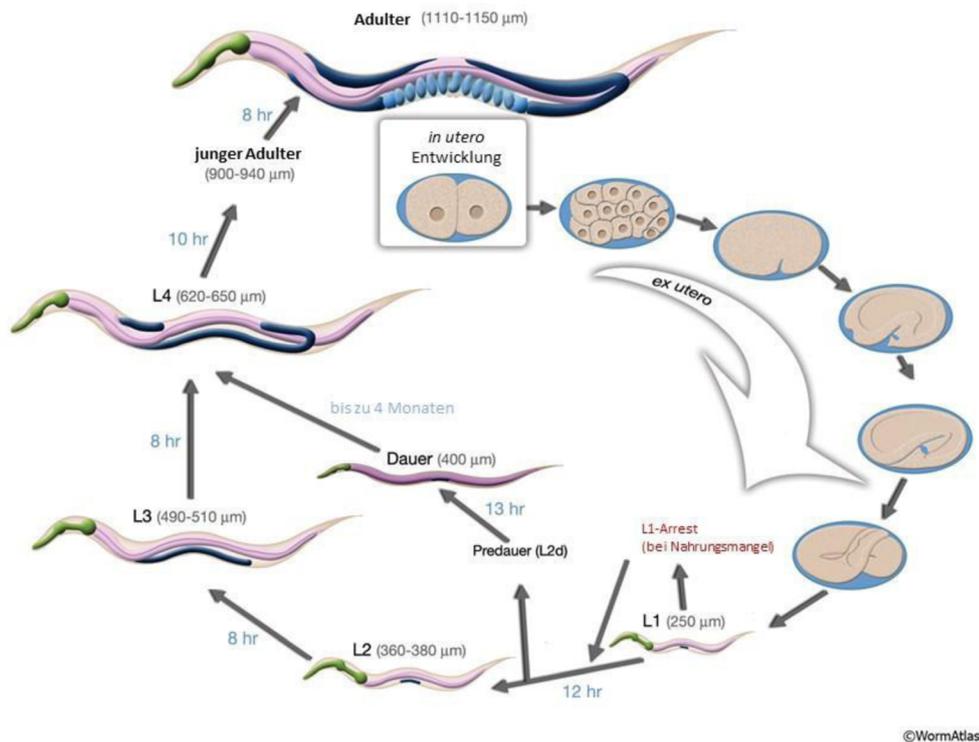
**Abbildung 5: Anatomie von *C. elegans*.**

Mikroskopische Aufnahme von *C. elegans* (BFX 43 Olympus, Abbildung A).

Schematische Darstellung von *C. elegans* von anterior (links im Bild) nach posterior (rechts im Bild, Abbildung B). Der Nematode nimmt seine Nahrung über den Pharynx, der in der Kopfregion gelegen ist, auf. Die Verdauung erfolgt über den sich anschließenden Darm, der makroskopisch meist einen der zwei Gonadenarme bedeckt. Die Ausscheidung erfolgt schließlich über den Anus in der Posterior-Region. Abbildung B modifiziert nach Altun und Hall, *Introduction*, aus ©WormAtlas, 2009 [103].

Ein weiterer Vorteil von *C. elegans* ist der gut beschriebene Lebenszyklus und seine kurze Generationszeit. Vor Erreichen des adulten Stadiums durchläuft der heranwachsende Nematode vier Larvenstadien (L1-L4, Abbildung 6). Zwischen jedem Stadium erfolgt eine Häutung. Die Unterscheidung dieser Larvenstadien erfolgt vor allem auf Grund ihrer Größe und dem Entwicklungsstand der Gonaden. Die Entwicklung vom Embryo bis zum fertilen, adulten Hermaphroditen dauert bei einer Temperatur von 20 C° ca. drei Tage [95]. Die Reproduktion von *C. elegans* funktioniert über den Mechanismus der Selbstbefruchtung: der Nematode ist in aller Regel ein sogenannter Hermaphrodit (XX). Als Konsektivzwitter folgt auf die Spermatogenese im L3-Stadium die Produktion von Oozyten im L4-Stadium, die bis über das adulte Stadium anhält [106]. Unter Nahrungsmangelbedingungen kann die Entwicklung im L1-Stadium verweilen und es entsteht eine sogenannte L1-Arrestlarve. Eine alternative, sich an die Arrestlarve anschließende Überlebensform ist die Dauerlarve. Diese bildet sich bei schlechten Bedingungen wie dauerhaftem Nahrungsmangel, Überbevölkerung oder unpassender Temperatur und zeichnet sich durch eine besonders dicke und resistente Kutikula aus [95]. Diese entsteht aus dem L1-Stadium über die Entwicklung einer L2d-Form („Prädauer“) und kann in dieser Form bis zu vier

Monate ohne Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme überleben [104]. Die Gesamtlebensdauer des Nematoden beträgt bei optimalen Bedingungen hingegen nur bis zu drei Wochen (ca. 20 Tage). Durch die hohe Nachkommenschaft, bei einem adulten Fadenwurm ca. 300, können außerdem schnell Populationen gezüchtet werden [103]. So ist *C. elegans* ein geeigneter Modellorganismus, um Hochdurchsatz-Screenings zu ermöglichen [105, 106], ohne dabei hohe Kosten zu erzeugen [94].



**Abbildung 6: Lebenszyklus von *C. elegans*.**

Schematisch dargestellt ist der Lebenszyklus von *C. elegans* bei einer Temperatur von 20 °C. Während seiner Entwicklung durchläuft der Nematode vier embryonale Stadien, bevor er schlüpft. Anschließend folgen weitere vier, durch Häutungen getrennte Larvenstadien, bis der Nematode nach ca. drei Tagen zu einem adulten, fertilen Hermaphroditen herangereift ist. Ist der Fadenwurm schlechten Bedingungen ausgesetzt, kann es zur Entwicklung einer Dauerlarve kommen, die besonders resistent ist und über Monate überleben kann. Bei Besserung der Bedingungen wird der Lebenszyklus direkt mit der L4-Form fortgesetzt. Abbildung modifiziert nach Altun und Hall, *Introduction*, aus © *WormAtlas*, 2009 [103].

Initial war *C. elegans* besonders als Modellorganismus für genetische Fragestellungen bedeutsam und auch aktuell ist der Nematode ein wichtiges alternatives Modell im Bereich der genetischen Toxikologie [107]. Neben Hermaphroditen kann auch ein männliches Geschlecht auftreten (X0). Dies geschieht durch die Nichttrennung („*Non-disjunction*“) des X-Chromosoms, ca. im Verhältnis 1:500 [108]. Die männlichen Nematoden bieten die Möglichkeit der genetischen Rekombination von homozygoten Stämmen [103]. Aber auch in freier Wildbahn besteht eine genetische Diversität und es gibt lokale Unterschiede, die für die Genetik bedeutungsvoll sind [109].

Die vollständige Sequenzierung des gesamten Genoms von *C. elegans* erfolgte bereits im Jahr 1998, was die Bedeutung von *C. elegans* als Modellorganismus weiter steigerte [110]. Es war die erste gelungene vollständige Sequenzierung eines multizellulären Organismus [111, 112]. Auch eine genetische Manipulation ist in *C. elegans* möglich; eine wichtige Methode ist RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) [113]. Ziel dieser Methode ist es, über das Füttern manipulierter Bakterien doppelsträngige RNA (dsRNA) in den Organismus einzubringen [114]. Auf diese Weise werden Gene auf mRNA-Ebene herunterreguliert, was für nahezu jedes Gen in *C. elegans* möglich ist. Durch die hohe Homologie für menschliche Gene von ca. 60-80 % [115] sind die Ergebnisse, die durch den Modellorganismus *C. elegans* gewonnen werden, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für höhere Lebewesen relevant [116].

Die Forschung an *C. elegans* wurde bereits in verschiedenen Fachgebieten mit dem Nobelpreis gewürdigt, was die Bedeutung und Vielseitigkeit von *C. elegans* als Modellorganismus unterstreicht. So wurde Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston 2002 der Nobelpreis für Physiologie/ Medizin „für ihre Entdeckungen bezüglich der genetischen Regulation der Organentwicklung und des programmierten Zelltods“ verliehen. Außerdem wurde im Jahr 2006 die „Entdeckung der RNA-Interferenz - Stummschaltung von Genen durch doppelsträngige RNA“ mit der Vergabe eines Nobelpreises für Physiologie/ Medizin an Andrew Z. Fire und Craig C. Mello gewürdigt. Ebenso erhielten die Wissenschaftler Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien 2008 einen Nobelpreis in Chemie „für die Entdeckung und Entwicklung des grün fluoreszierenden Proteins, GFP“ [117].

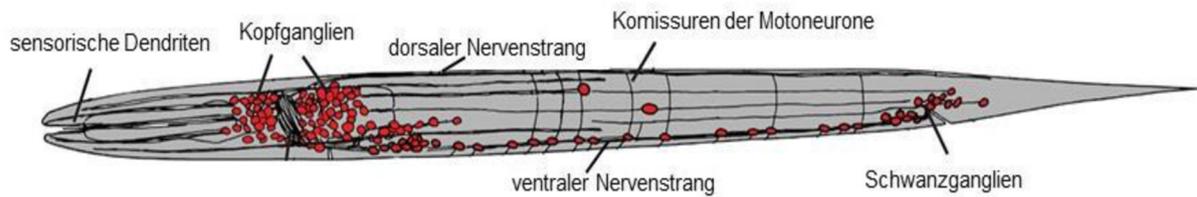
### 1.2.2 *C. elegans* verfügt über ein hochkomplexes Nervensystem

*C. elegans* gilt durch sein komplexes Nervensystem und dessen einfache Zugänglichkeit als geeignetes Modell für die Untersuchung neurotoxischer Substanzen [118]. Außerdem bietet es sich auch aus ethischen und finanziellen Gründen als präklinisches Modell für Screening-Verfahren für Untersuchungen im Bereich des Nervensystems an [1].

Zu den Aufgaben des Nervensystems von *C. elegans* zählen neben der Steuerung der Fortbewegung, der Nahrungsaufnahme, der Ausscheidung und der Reproduktion auch die sensorische Wahrnehmung der Umwelt [91]. In seiner Gesamtheit besteht

das Nervensystem aus 302 Neuronen, wovon 282 Neurone zum größeren, somatischen Nervensystem gehören. Das autonome, pharyngeale Nervensystem wird aus 20 Neuronen gebildet [1, 119]. Hervorzuheben ist dabei die große Diversität der verschiedenen Klassen an Nervenzellen, die ganz unterschiedliche Funktionen aufweisen [101]. Neben rein sensorischen Neuronen gibt es auch motorische Neurone (Motoneurone), sowie viele polymodale Neurone und Interneurone, die mehrere Funktionen übernehmen bzw. eine Verbindung schaffen können; unterstützt wird das somatische Nervensystem außerdem durch 56 neuronale Helferzellen [119]. Die neuronale Kommunikation erfolgt neben 6400 chemischen Synapsen auch über 900 elektrische Synapsen (engl. *gap junctions*) und 1500 neuromuskuläre Synapsen [1, 119]. Ein besonderer Vorteil von *C. elegans* für die Verwendung zur Modellierung neuronaler Prozesse ist die frühe und vollständige Beschreibung des gesamten Konnektoms, der Gesamtheit aller Verbindungen im Nervensystem [1, 120, 121]. Eine erste detaillierte Beschreibung des vollständigen Nervensystems von *C. elegans* wurde mit „*The Mind of a Worm*“ bereits im Jahr 1986 von White et al. veröffentlicht [91, 101]. Hier wurde unter anderem die genaue Anordnung sowie die verschiedenen neuronalen Verbindungen beschrieben.

Die Nervenzellen, insbesondere ihre Zellkörper sind größtenteils in Ganglien angeordnet. Diese liegen bei *C. elegans* vor allem im anterioren Bereich (Kopf-Ganglien) oder im posterioren Bereich (Schwanz-Ganglien) [119]. Die Kopfneurone werden auch als das „Gehirn“ des Nematoden beschrieben [95]. Außerdem verfügt *C. elegans* über einen ventralen und einen dorsalen Nervenstrang, der jeweils aus Axonbündeln der Interneurone, die in den Kopf- oder Schwanzganglien gelegen sind, gebildet werden. Im Ventralstrang sind die Motoneurone lokalisiert, die über laterale Fortsätze den Dorsalstrang bilden (Abbildung 7). Diese Motoneurone auf der Ventralseite innervieren die Körpermuskeln [95].



**Abbildung 7: Nervensystem von *C. elegans*.**

Das Nervensystem von *C. elegans* besteht aus den Kopf-Ganglien, den Schwanz-Ganglien und dem ventralen und dorsalen Nervenstrang. O. Hobert gibt durch die Markierung der Neurone in rot einen schematischen Überblick über das gesamte Nervensystem des Nematoden.

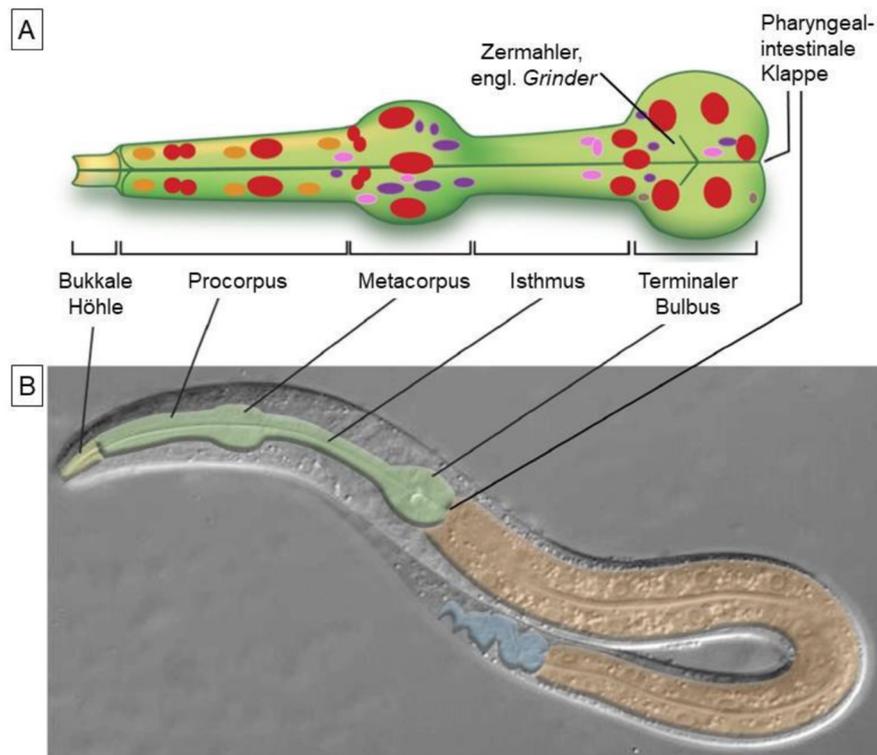
Abbildung modifiziert nach O. Hobert, *Specification of the nervous system*, aus *WormBook*, 2005 [118].

Die sensorischen Rezeptoren und Neurone sind vor allem im Kopfbereich lokalisiert [101]. Hier gibt es verschiedene Qualitäten, wie die chemosensorische Wahrnehmung, das Empfinden von Temperatur und die Wahrnehmung von Gerüchen oder Nahrung (olfaktorische Neurone) [91]. Für diese einzelnen Qualitäten gibt es spezialisierte Neurone. So sind manche Neurone beispielsweise sensibler für Natrium (Neuron ASEL) und manche für Chlorid und Kalium (Neuron ASER) [122].

Die Wahrnehmung dieser Sinneseindrücke kann das Verhalten des Nematoden stark beeinflussen. So wird zum Beispiel die Entwicklung zur Dauerlarve durch ungünstige Temperaturbedingungen oder Nahrungsmangel favorisiert; eine Besserung dieser Faktoren führt hingegen zum Wiedereintritt in den Lebenszyklus [123]. Wenn die Neurone für den Geruchssinn (beispielsweise das Neuron AWC) beschädigt werden, verändert sich auch das chemotaktische Verhalten des Nematoden [124]. Auch für die Fortbewegung sind sensorische Eindrücke wichtig. Die hierfür zuständigen Mechanosensoren und Propriozeptoren sind zumeist in der Körperwand lokalisiert [119]. Hier sind unter anderem die zwei sensorischen PVD-Neurone zu nennen, die symmetrisch links und rechts angeordnet sind und viele dendritische Verzweigungen abgeben [125]. Auch der Sauerstoffgehalt und die Osmolarität der Umgebung können detektiert werden [119].

Zuletzt ist zu erwähnen, dass die Haupt-Neurotransmitter von *C. elegans* denen von Vertebraten chemisch entsprechen, sodass die meisten relevanten Transmitter vorhanden sind [1]. Es finden sich cholinerge, GABA-erge ( $\gamma$ -Aminobuttersäure), glutamaterge, dopaminerge und serotoninerge Neurotransmittersysteme [105]. Medikamente, die beim Menschen in diese Systeme eingreifen, haben somit auch erwartbare Wirkungen im Nervensystem von *C. elegans*.

Das pharyngeale Nervensystem besteht aus 20 Neuronen. Der Pharynx selbst ist eine ca. 100 µm große neuromuskuläre Pumpe, die im Kopfbereich des Nematoden gelegen und für die Nahrungsaufnahme, Zerkleinerung und damit Beginn der Verdauung zuständig ist [102]. Makroskopisch gliedert er sich in mehrere Anteile. Auf die Mundhöhle folgen der Procorpus, der Metacorus, der Isthmus und der hintere Bulbus [126] (Abbildung 8). Den Übergang zum Darm bildet die Pharynx-Darmklappe [127].



**Abbildung 8: Intestinaltrakt von *C. elegans* mit schematischer Darstellung des Pharynx.**

Dargestellt ist der Pharynx von *C. elegans* als Schemazeichnung (Abbildung A) sowie der gesamte, nachkolorierte Verdauungstrakt (B). Innerhalb des Pharynx gibt es verschiedene Arten von Zellkernen (A). Rot markiert sind die Muskelzellkerne, Neurone sind lila dargestellt, Epithelzellen sind orange und Drüsengewebe braun markiert. Der hier grün dargestellte Pharynx gliedert sich in mehrere Anteile: in gelb dargestellt ist die Mundhöhle, darauf folgen der Procorpus, der Metacorus, der Isthmus und der hintere Bulbus (A). Den Übergang zu dem hier orange markierten Darm bildet die Pharynx-Darmklappe (B). Abbildung modifiziert nach S. E. Mango, *The C. elegans pharynx: a model for organogenesis*, aus *WormBook*, 2007 [126].

Histologisch zeigt sich das Fehlen einer trennenden Basalmembran zwischen den pharyngealen Motoneuronen und ihren Effektororganen, den pharyngealen Muskeln [128]. Dies unterscheidet sie von den Motoneuronen außerhalb des pharyngealen Nervensystems und steht für die besondere Funktion des Pharynx als neuromuskuläre Einheit.

Insgesamt besteht dieses kleinere Nervensystem aus zwanzig Nervenzellen, unter anderem aus Motoneuronen, abgekürzt mit „M“ (M1-M5) und Interneuronen, abgekürzt

mit „I“ (I1-I6). Außerdem sind neurosekretorisch-motorische Neurone („NSM“), Moto-Interneurone („MI“) und Marginalzellneurone („MC“) vorhanden [127]. Es gibt sieben Motoneuronen M1-M5, denn M2 und M3 sind paarig angelegt; ihre Aufgabe liegt in der Pharynxmuskulinnervation. Ebenso paarig sind die MC-Neurone, deren Aufgabe die Steuerung der Pumpfrequenz ist [102]. Gemeinsam mit dem Motoneuron M3 wird die hauptsächliche Regulierung, also Beginn und Ende der Kontraktion, übernommen [129]. Das unpaarige Motoneuron M4 hingegen ist für die Peristaltik des Isthmus verantwortlich [130]. Die NSM-Neurone sind neben einer neurosekretorischen Funktion auch für die Wahrnehmung von Nahrung zuständig [102]. Es besteht eine Verbindung mit dem somatischen Nervensystem, wodurch die Aktivität des Pharynx beeinflusst werden kann. So vermindert eine leichte Berührung beispielsweise die Pumprate [131].

### 1.2.3 *C. elegans* als Modellorganismus zur Untersuchung von Neurotoxizität

Durch sein vollständig beschriebenes Nervensystem bietet *C. elegans* die Möglichkeit zur Auswertung anatomischer und funktioneller Endpunkte. Da die Komplexität seines Nervensystems außerdem eine differenzierte Untersuchung der Neurone ermöglicht, wurde *C. elegans* in dieser Arbeit explizit als Modell für das tierische Nervensystem ausgewählt. Mit Hilfe des Nematoden konnten bereits viele neurologische Erkrankungen modelliert werden. So ist zum Beispiel die Untersuchung neurodegenerativer Prozesse, wie sie für Morbus Parkinson relevant sind, in dem Modellorganismus möglich. Wichtige an der Pathogenese des Morbus Parkinson beteiligte Proteine und Gene konnten in *C. elegans* identifiziert [132] und ein Modell für die Schädigung dopaminerger Neurone etabliert werden [133]. Hervorzuheben ist dabei der Vorteil, dass sich dopaminerge Neurone durch eine GFP-Markierung gut *in vivo* untersuchen lassen [134]. Auch Mechanismen der Alzheimer-Krankheit wurden an *C. elegans* in der Vergangenheit untersucht. Nicht nur die Akkumulation eines ursächlichen Proteins, dem  $\beta$ -Amyloid, konnte in *C. elegans* modelliert werden. Auch die Funktion von Presenilin wurde maßgeblich durch *C. elegans* verstanden, indem das passende Homolog in dem Nematoden untersucht wurde [134].

Als Modellorganismus für die Beurteilung des Nervensystems und neurologischer Erkrankungen kann in *C. elegans* auch eine Neurotoxizität induziert und analysiert werden. In verschiedenen Arbeitsgruppen ist der Nematode als Modell für die Analyse

neurotoxischer Effekte, ausgelöst zum Beispiel durch Quecksilber, etabliert [135, 136]. *C. elegans* kann insbesondere für die Beurteilung der neuronalen Schädigung durch Platin-basierte Chemotherapeutika verwendet werden [1]. Dabei ist ein Endpunkt für die Beurteilung der Integrität des Nervensystems die Messung der pharyngealen Pumprate [1, 135, 137-139]. Da der Pharynx über ein eigenes Nervensystem verfügt, welches mit dem somatischen Nervensystem kommunizieren und auch durch neurotoxische Substanzen beeinflusst werden kann, eignet sich die Messung der pharyngealen Pumprate als funktioneller Endpunkt für die Bestimmung von Neurotoxizität [1, 135, 137-139]. Konkret beschreibt diese Methode das Auszählen der Pumpvorgänge pro Minute (engl. *pumps per minute*, ppm).

Insgesamt ist die Pumpbewegung des neuromuskulären Schlauches ein Zyklus aus Kontraktion und Relaxation der Muskeln. Diese Pumpbewegung findet minimal zeitversetzt in den beteiligten Regionen, dem Corpus, der vorderen Hälfte des Isthmus und dem hinteren Bulbus statt. Das Einsaugen der Bakterien in den Pharynx erfolgt durch eine erste Kontraktion von Corpus und vorderem Isthmus bei gleichzeitigem Verschluss des hinteren Isthmus, sodass das Lumen geöffnet wird und Bakterien eingesaugt werden können. Der im hinteren Bulbus befindliche Zermahler (engl. *grinder*) spaltet die Bakterien bei Kontraktion im Anschluss auf und es erfolgt die Weiterleitung in den Darm. Durch die anschließende Relaxation wird der Zermahler wieder in seine Ruheposition zurückgeführt und das Lumen geschlossen. Die Bewegung des Zermahlers wird beim Messen der Pumprate ausgezählt, da eine Auslenkung und Rückführung des Zermahlers eine Pumpbewegung darstellt [129, 140]. *C. elegans* und insbesondere die Messung des Pharynxpumpens kann für die Untersuchung von Erkrankungen durch Metalle und deren (Neuro-)Toxizität verwendet werden. So wurden beispielsweise Aluminium (Al), Arsen (As), Barium (Ba), Cadmium (Cd), Kupfer (Cu), Blei (Pb), Quecksilber (Hg), Uran (U), und Zink (Zn) an dem Nematoden, häufig mittels Hochdurchsatzscreenings, getestet [105]. Viele dieser Metalle führen nachgewiesenermaßen zu einer Neurodegeneration. Da *C. elegans* viele Homologe für die Gene besitzt, die für den Transport und die Homöostase dieser Metalle relevant sind, eignet sich der Nematode hier gut als Modellorganismus für vergleichbare neurotoxische Wirkungen [136].

## 1.3 Ziele dieser Arbeit

Auf Grund seiner Eignung zur Untersuchung von neurotoxikologischen Fragestellungen sollte in dieser Arbeit der Nematode *C. elegans* als 3R-konformes Modell für die Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathie (CIPN) genutzt werden [1]. Da diese Nebenwirkung von beispielsweise Cisplatin-basierten Chemotherapien weiterhin nicht suffizient behandelt werden kann, bedarf es weiterer Untersuchungen hinsichtlich des Pathomechanismus und einem Screening auf potenziell protektiven Substanzen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere Details der Entstehung einer CIPN zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere die Bedeutung des Glutathion-Systems für die Entstehung einer Platin-induzierten Neurotoxizität untersucht werden und dazu der *Knockdown* eines für die Synthese von Glutathion relevanten Gens erfolgen. Im Fokus der Untersuchung stand Cisplatin und wurde hier für die Induktion einer Neurotoxizität verwendet. Als Surrogatmarker für die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität diente die Verringerung der pharyngealen Pumprate von *C. elegans* [1, 135, 137-139]. Nach der Cisplatin-Behandlung sollte in *C. elegans* eine Post-Inkubation mit verschiedenen Substanzen durchgeführt werden, welche möglicherweise eine neuroprotektive Wirkung aufweisen und die Cisplatin-induzierte Schädigung des Nervensystems abmildern können. Diese Kandidatensubstanzen wurden unter anderem nach ihrem antioxidativen Potential sowie der bisherigen Verwendung in Studien zur Verringerung der CIPN ausgewählt. Sofern die Kandidatensubstanzen positive (also neuroprotektive) Effekte hatten, sollte auch überprüft werden, ob sie weitere Parameter wie den Platin-Gesamtgehalt in *C. elegans* verändern. Insbesondere stellte sich die Frage, ob die Kandidatensubstanzen die Wirksamkeit von Cisplatin als Apoptose-Induktor verändern. Außerdem sollte überprüft werden, ob die verwendete Cisplatin-Konzentration eine Muskeltoxizität in *C. elegans* bewirkt und die Akkumulation des Alterspigments verändert.

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob eine Modulation der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität in *C. elegans* durch eine Post-Inkubation mit Kandidatensubstanzen möglich ist und dieses CIPN-Modell für Screenings potenziell neuroprotektiver Substanzen eingesetzt werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 *C. elegans* Stämme

**Tabelle 2:** Auflistung der verwendeten *C. elegans* Stämme.

Modifiziert nach Wellenberg et al. [1].

Stamm	Genotyp	Verwendung/ Versuch	Bezug/ Hersteller
N2	Wildtyp (wt)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ermittlung der pharyngealen Pumpfrequenz</li> <li>- ICP-MS</li> <li>- Bestimmung der Alterspigmente</li> <li>- Southwestern-Blot Analyse</li> </ul>	Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota (USA), Jonathan Hodgkin
MD701	bcls39 [lim-7p::ced-1::GFP + lin-15(+)]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bestimmung der Keimzellapoptose</li> </ul>	Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota (USA)
PD4251	ccls4251 [(pSAK2) myo-3p::GFP::LacZ::NLS + (pSAK4) myo-3p::mitochondrial GFP + dpy-20(+)] I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Untersuchung der Muskelzellkerne</li> </ul>	Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota (USA), Steve Kostas
TU3311	uls60 [unc-119p::YFP + unc-119p::sid-1]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RNA-vermittelte Interferenz über Fütterung</li> </ul>	Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota (USA)

## 2.1.2 Chemikalien, Lösungen und Medien

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien.**

In Teilen modifiziert nach Wellenberg et al. [1].

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung/ Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
ABTS	Stocklösung [14 mM], gelöst in dH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ampicillin	Stocklösung [100 mg/ml], gelöst in dH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
APS	Stocklösung [4,9 mM], gelöst in dH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
ASS	Stocklösung [10 mM], gelöst in S-Basal	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Bacto-Agar	-	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Bradford-Reagenz	Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Hercules (USA)
BSA	-	PAN-Biotech, Aidenbach
BSA/Streptomycin	5 g BSA 250 ml [100 mg/ml] Streptomycin ad 50 ml S-Medium	-
CaCl <sub>2</sub>	-	Merck, Darmstadt
Carboplatin	Stocklösung [26,9 mM], gelöst in dH <sub>2</sub> O	Accord, München
Cisplatin	Stocklösung [3,33 mM], gelöst in dH <sub>2</sub> O	Accord, München
EDTA	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glukose	D-(+)-Glukose	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	-	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
IPTG	Stocklösung [0,5 M], gelöst in dH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	Merck, Darmstadt
Kaliumcitrat	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	Merck, Darmstadt
Koffein	Stocklösung [100 mM], gelöst in S-Basal	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
KPO <sub>4</sub> Puffer	pH 6, [1 M] 108,3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 35,6 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O	-
LB-Medium	10 g Bacto-Peptide 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O -autoklavieren-	-

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung/ Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Levamisol	[0,25 M], gelöst in M9 Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Lösung mit Spurenelementen	1,86 g Disodium EDTA 0,69 g FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,2 g MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 0,29 g ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,025 g CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O -autoklavieren-	-
M9-Puffer	3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 g NaCl 1 ml MgSO <sub>4</sub> [1 M] ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O -autoklavieren-	-
Methylenblau	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Methylenblaulösung	4,1015 g NaAc 0,04 g Methylenblau ad 100 ml mit dH <sub>2</sub> O	-
MgSO <sub>4</sub>	-	Merck, Darmstadt
Milchpulver	-	Merck, Darmstadt
Milchpulverlösung (5 %)	2,5 g Milchpulver ad 50 ml mit TBST	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
NaAc	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
NAC	N-Acetyl-L-Cysteine Stocklösung [5 mM], gelöst in S-Basal	ICN Biomedicals inc., Costa Mesa (USA)
NaCl	-	VWR, Radnor (USA)
NaOH	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumazid	Stocklösung [50 mM], gelöst in M9-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung/ Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
NGM-Agar	20 g Bacto-Agar 3 g NaCl 2,5 g Soja-Peptide ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O -autoklavieren-  25 ml KPO <sub>4</sub> Puffer [1 M], pH6 500 µl CaCl <sub>2</sub> [1 M] 1 ml MgSO <sub>4</sub> [1 M]  1 ml Cholesterol [5 mg/ml] in EtOH absolut  Zusätze für RNAi-Platten:  1 ml Ampicillin [100 mg/ml] 2 ml IPTG [0,5 M]	-
Oxaliplatin	Stocklösung [12,6 mM], gelöst in dH <sub>2</sub> O	Accord, München
S-Basal	5,85 g NaCl 1 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 ml Cholesterol [5 mg/ml] in EtOH ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O -autoklavieren-	-
S-Medium	10 ml Kaliumcitrat [1 M], pH 6 10 ml Lösung mit Spurenelementen 3 ml CaCl <sub>2</sub> [1 M] 3 ml MgSO <sub>4</sub> [1 M] ad 1 l mit S-Basal -autoklavieren-	-
Soja-Peptide	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
SSC (10 x)	NaCl [1,5 M] Natriumcitrat [150 mM] pH 7,0, gelöst in dH <sub>2</sub> O	-
Streptomycin	Stocklösung [100 mg/ml], gelöst in S-Basal	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Synchronisationslösung	300 µl 13 % NaOCl 200 µl NaOH [4 M] 1000 µl M9-Puffer	-
TBS (10 x)	Tris [100 mM] NaCl [1,5 M] gelöst in dH <sub>2</sub> O	-
TBST	1 x TBS 0,1 % Tween 20 pH 7,4 -autoklavieren-	-

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung/ Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
TE-Puffer	1 % Tris-HCl [1 M] 0,2 % EDTA [500 M]	-
Tetracyclin	Stocklösung [12,5 mg/ml], gelöst in 70 % EtOH	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tris	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trolox	Stocklösung [2,5 mM], gelöst in 80 % EtOH	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tween®20	-	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Vitamin C	L-Ascorbic Acid, Stocklösung [100 mM], gelöst in S-Basal	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
WR 1065	Stocklösung [100 mM], gelöst in S-Basal	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

## 2.1.3 Geräte

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte.**

<b>Gerät</b>	<b>Typ-Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Autoklav	VX-95	Systec, Linden
Binokular	Stemi 2000	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Binokular-Lampe	KL 300 LED	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Chemilumineszenzsystem	ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad, Hercules (USA)
Feinwaage	ABS	Kern, Balingen
Fluoreszenzmikroskop	BFX 43	Olympus, Tokio (Japan)
Fluoreszenzmikroskop-Kamera	XM-10	Olympus, Tokio (Japan)
Fluoreszenzmikroskop- Lichtquelle	U-RFL-T Burner	Olympus, Tokio (Japan)
Heizblock	HX-1	VWR Peqlab, Radnor (USA)
Inkubationsschüttler	KS 4000 I control	IKA, Staufen
Inkubatoren	Inkubator 1000	Heidolph, Schwabach
	KB 400	Binder, Tuttlingen
	KT 115	Binder, Tuttlingen
Magnetrührer/ Heizplatte	SU 1150	Sunlab, Mannheim
Photometer	Lambda 12 UV/Vis	PerkinElmer, Waltham (USA)
	NanoVue Plus	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (Großbritannien)
	Sunrise™	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Pipetten	Pipetman	Gilson, Middleton (USA)
	Eppendorf Research® plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierroboter	QIACube	Qiagen GmbH, Venlo (Niederlande)
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Slot-Blot-Apparatur	-	Scie Plas, Cambridge (Großbritannien)
Ultraschallgerät	Sonicator Q120Amr	Active Motif, Carlsbad (USA)
UV-Crosslinker	Bio-Link®	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vakuum-Pumpe	Mini-Vac	Axon Lab AG, Reichenbach
Waage	1219 MP	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Microfuge 20	Beckmann Coulter, Brea (USA)
	Universal 320	Hettich, Tuttlingen
	Mini Fuge Plus	Starlab, Hamburg

## 2.1.4 Sonstige Materialien

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.**

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung/ Größe</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	24 x 32 mm	Engelbrecht, Edermünde
DNA-Präparationskit	Dneasy® Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Venlo (Niederlande)
ECL-Chemilumineszenzkit	BM Chemilumineszenzsubstrat	Roche, Basel (Schweiz)
Filterpapier	Whatman™ 3MM Chr Chromatography Paper	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (Großbritannien)
Nitrozellulosemembran	Amersham™ Protran™ NC Nitrocellulose-Membran, Porengröße 0,2 µm	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (Großbritannien)
Objektträger	76 x 26 mm	Engelbrecht, Edermünde
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	2 ml	
Röhrchen	Cellstar®, 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
	Cellstar®, 50 ml	
	Cryo.s™, 2 ml	
Wasseraufbereitungssystem	Millipore Milli-Q® Advantage A10	Merck, Darmstadt
Zellkulturschalen	6-Loch	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
	12-Loch	
	24-Loch	
	35 x 10 mm	
	60 x 15 mm	
	100 x 20 mm	
Zellsiebe (steril)	Porengröße 70 µm	Corning™, Corning (USA)

## 2.1.5 Software und Statistik

Für die Erfassung und die Auswertung der Daten wurde *Microsoft Excel 2016* verwendet. Die Durchführung aller statistischer Tests sowie die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 9.0.0*. Die Normalverteilung der erhobenen Daten wurde mittels Shapiro-Wilk Test überprüft, für die Signifikanztestung wurde der Student-T-Test (zwei zu vergleichende Gruppe) oder eine One-Way-Anova (ab drei zu vergleichenden Gruppen) durchgeführt. Eine statistische Beratung erfolgte durch das statistische Beratungsbüro des Instituts für systemische Neurowissenschaften des Universitätsklinikum Düsseldorf.

Für die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde die Software *ImageJ* 1.51 verwendet. Die Analyse der Bandenintensität des Southern-Blots erfolgte mit der Software *Image Lab* 4.0.

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software.**

Software	Hersteller
<i>GraphPad Prism 9</i>	GraphPad Software, San Diego (USA)
<i>Image Lab™ 4.0</i>	Bio-Rad, Hercules (USA)
<i>ImageJ 1.51</i>	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
<i>Microsoft Office 2016</i>	Microsoft, Redmond (USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von *C. elegans* auf Festmedium

Die Kultivierung von *C. elegans* erfolgte unter Standardbedingungen bei einer Temperatur von 20 °C auf NGM-Agarplatten (engl. *Nematode Growth Medium*) wie bei Wellenberg et al. beschrieben [1]. Als Nahrungsquelle dienten *E. coli* Bakterien. Der verwendete *E. coli* Stamm OP50<sup>-1</sup> ist resistent gegen Streptomycin und Uracil-auxotroph, weshalb sein Wachstum auf NGM-Agar begrenzt ist [92]. Die Stammpropagation erfolgte montags und freitags durch Umsetzen von jeweils ca. 15 Nematoden mittels Platindrahts auf frische NGM-Agarplatten.

Zur Herstellung der NGM-Agarplatten wurden große Zellkulturschalen (100 x 20 mm) mit 20 ml NGM-Agar befüllt und nach Aushärtung mit 35 µl OP50<sup>-1</sup> Bakteriensuspension beimpft (siehe 2.2.3). Damit der Bakterienrasen gleichmäßig anwachsen konnte, wurden die Bakterien mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C für maximal 4 Wochen.

### 2.2.2 Kultivierung von *C. elegans* in Flüssigmedium

Die Flüssigkultur wurde für alle Experimente mit Testsubstanzen verwendet. Für die Kultivierung von *C. elegans* in Flüssigmedium wurde S-Medium<sub>K</sub> (S-Medium komplett) hergestellt. Hierzu wurde S-Medium mit BSA (1 %) und Streptomycin [50 µg/ml] sowie mit hitzeinaktivierten OP50<sup>-1</sup> Bakterien versetzt, wie es bei Wellenberg et al.

beschrieben ist [1]. Die Inaktivierung der Bakterien erfolgte durch 15-minütiges Erhitzen bei 65 °C. Um das Absinken der Bakterien auf den Boden der Zellkulturschalen zu verhindern, wurden diese zur optimalen Durchmischung des Mediums zwischen den einzelnen Untersuchungen bei 50 rpm auf einem Schüttler gelagert. Für die Flüssigkultur wurden je nach Anzahl der Versuchstiere 6- oder 12-Loch Zellkulturschalen verwendet.

### 2.2.3 Kultivierung von *E. coli*

Das Ansetzen einer *E. coli* OP50<sup>-1</sup> Bakterienkultur erfolgte neben der offenen Gasflamme, um Kontaminationen zu vermeiden. Ein Erlenmeyerkolben wurde mit 200 ml LB-Medium und mit 100 µl Streptomycin [100 mg/ml] befüllt. Mit einer Pipettenspitze wurde eine Einzelkolonie der OP50<sup>-1</sup> Bakterien von der NGM-Agarplatte in das Medium überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und kontinuierlichem Schütteln (175 rpm).

Am Folgetag wurde die Bakterienkultur bei 4400 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Verwendung von OP50<sup>-1</sup> auf Festmedium wurde das Bakterien-Pellet in 10 ml S-Medium gelöst, für die Verwendung in Flüssigkultur wurde ein Volumen von 2 ml S-Medium gewählt. Für die Kultivierung von *C. elegans* in Flüssigmedium muss eine konstante *E. coli* Bakterienkonzentration gewährleistet sein, weshalb die optische Dichte (OD) der Bakterienkultur mittels Photometer bestimmt und die Absorption bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) gemessen wurde. Als Zielkonzentration wurde die Anzahl von 2 x 10<sup>9</sup> Zellen/ml gewählt und eingestellt.

$$\frac{2,5}{x_{OD600}} = y \text{ µl/ml (x Absorption, y Zellkonzentration)}$$

### 2.2.4 Synchronisation

Ziel der Synchronisation mittels Bleichelösung war es, eine alterssynchrone *C. elegans* Population zu erhalten, da ein einheitlicher Entwicklungsstand Voraussetzung für die Untersuchungen war. Durch die Bleichelösung können Embryonen aus graviden adulten Nematoden herausgelöst werden.

Zu diesem Zweck wurde eine dicht besiedelte Agarplatte mit 2,5 ml M9-Pufferlösung abgespült. 1,2 ml dieser Lösung mit möglichst vielen graviden Adulten wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und bei 5000 rpm für zwei Minuten bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Die adulten Tiere konnten so auf den Boden des Reaktionsgefäßes absinken und der Überstand verworfen werden. Auf das Pellet wurden 500 µl der frisch angesetzten Bleiche-Synchronisationslösung gegeben und mit M9-Puffer auf 1,5 ml aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für ca. vier Minuten unter gelegentlichem Verwirbeln, es folgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in 1 ml M9-Puffer resuspendiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Um eine Anzahl von ca. 300 Embryonen pro Agarplatte zu erhalten, wurden 50 µl des Gemischs mittels Binokulars auf einer Platte ausgezählt und anschließend die entsprechend benötigte Menge des Gemischs auf die Agarplatte gegeben. Die Inkubationszeit bis zum L4-Stadium betrug etwa drei Tage bei 20 °C.

### 2.2.5 Bestimmung der antioxidativen Kapazität *in vitro*

Um die antioxidative Kapazität verschiedener Substanzen beurteilen zu können, wurde ein *Trolox Equivalent Antioxidative Capacity*-Test (*TEAC*-Test) durchgeführt, wie ihn Buchter et al. beschrieben haben [141]. Hierbei handelt es sich um eine zellfreie Messmethode, bei der die Testsubstanzen mit der antioxidativen Kapazität des synthetischen wasserlöslichen Vitamin-E-Derivats Trolox verglichen werden. Dabei wird die Entfärbung eines blau-grünen Radikals durch ein Antioxidans mittels Photometrie quantifiziert [141].

Die Vorbereitung und Messung der Proben erfolgten so, wie durch Wellenberg et al. beschrieben [1]. Um die ABTS/APS-Stocklösung herzustellen, wurde ABTS [14 mM] und APS [4,9 mM] 24 h vor Versuchsbeginn im Verhältnis 1:1 gemischt. Die bläuliche Lösung wurde über Nacht lichtgeschützt gelagert. Kurz vor Versuchsbeginn wurde diese so mit 80-prozentigem Ethanol verdünnt, dass die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 734 nm ca. 1,4 betrug. Die Testsubstanzen und Trolox selbst wurden in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0 µM und 25 µM gemessen. Hierzu wurde die jeweilige Stocklösung so mit Ethanol (80 %) verdünnt, dass sich ein Gesamtvolumen von 500 µl sowie die folgende Konzentrationsreihe ergab: 0 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM; 15 µM; 20 µM; 25 µM. Für die Messung der antioxidativen Kapazität wurden jeweils 500 µl der ABTS/APS-Stocklösung zu der jeweiligen Testsubstanz pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von einem Milliliter pro Küvette entstand. Nach zwei Minuten Reaktionszeit unter Resuspension wurde die optische Dichte der Lösung gemessen. Nach drei unabhängigen Experimenten wurde ein

Mittelwert gebildet und der *TEAC*-Wert berechnet. Um den *TEAC*-Wert zu errechnen, wurde die optische Dichte gegen die Konzentration aufgetragen und die Steigung der Regressionsgeraden der Testsubstanz ( $m_{\text{Testsubstanz}}$ ) durch die Steigung der Regressionsgeraden von Trolox ( $m_{\text{Trolox}}$ ) geteilt [142]. Ein *TEAC*-Wert von eins bedeutet somit, dass die getestete Substanz die gleiche antioxidative Kapazität wie Trolox hat. Je niedriger der *TEAC*-Wert ist, desto geringer ist die antioxidative Kapazität.

$$\text{TEAC-Wert} = \frac{m_{\text{Testsubstanz}}}{m_{\text{Trolox}}}$$

## 2.2.6 Untersuchung der Muskelzellkerne

Um die Wirkung von Cisplatin auf die Funktion der Muskelzellen von *C. elegans* beurteilen zu können, wurde die Anzahl der Muskelzellkerne nach Platin-Gabe untersucht. Dieser Parameter sollte als Maß für die mögliche Muskelttoxizität von Platinderivaten verwendet werden, da bekannt ist, dass die Anzahl der Muskelzellkerne in Muskeln mit einer Funktionsstörung reduziert ist [143].

Hierfür wurde der Reporterstamm *PD4251 myo-3p::GFP* verwendet, der GFP sowohl nukleär als auch mitochondrial in den Körperwand- und Vulvamuskeln exprimiert [144]. Der Versuchsaufbau erfolgte wie bei Wellenberg et al. beschrieben [1]. Pro Versuchsgruppe wurden jeweils mindestens 90 Nematoden ab dem L4-Larven-Stadium für insgesamt 168 h bei 20 °C in Cisplatinhaltigem Flüssigmedium inkubiert, sodass pro Messzeitpunkt mindestens 30 Nematoden ausgezählt werden konnten. Als Kontrollmedium diente S-Medium<sub>K</sub>. Die Überführung der Versuchstiere in frisches Medium erfolgte erstmalig nach 48 h sowie nach weiteren 48 h (bei insgesamt 96 h) mittels Glasangel. Durch den Transfer der Versuchstiere in frisches Medium konnte eine ausreichende Bakteriendichte gewährleistet und die Vermischung der alterssynchronen Tiere mit der Nachkommenschaft verhindert werden. Die quantitative Auswertung erfolgte nach 48 h, 96 h und 168 h mittels Fluoreszenzmikroskop. Hierzu wurden die Nematoden mit einem Tropfen Natriumazid [15 mM], welches eine Immobilisierung der Tiere bewirkt, auf ein Agarose-Pad gegeben und mindestens 30 Nematoden pro Gruppe mit dem FITC-Filter bei 100 ms und 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Auszählung der Muskelzellkerne erfolgte anschließend automatisiert mittels *ImageJ*-Software. Das Experiment wurde jeweils dreimal wiederholt.

## 2.2.7 Bestimmung der Keimzellapoptose

Die Apoptoseinduktion kann als Maß für die Toxizität verschiedener Testsubstanzen verwendet werden. Um die Apoptoserate zu bestimmen, wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen in den mitotisch aktiven Keimzellen des Reporterstammes *MD701* ausgezählt, die durch die Lokalisation von CED1::GFP sichtbar sind. Dieser phagozytotische Rezeptor CED-1 wird in den Nachbarzellen der apoptotischen Zellen exprimiert, sodass das Fusionsprotein CED-1::GFP die apoptotischen Zellen durch die Bildung einer Art Lichthof (engl. *halo*) um diese herum hervorhebt [145].

Das Procedere entsprach dem durch Wellenberg et al. beschriebenen Vorgehen [1]. Pro Versuchsgruppe wurden mindestens 20 Nematoden im L4-Stadium für insgesamt 24 h in Flüssigkultur inkubiert; hierbei wurden verschiedene Kombinationen aus Cisplatin und Testsubstanzen in der Kombination 4 h plus 20 h untersucht. Als Negativkontrolle diente S-Medium<sub>K</sub>, als Positivkontrolle wurden die Nematoden auf Agarplatten mit 800 J/m<sup>2</sup> UV-C bestrahlt. Nach weiteren 24 h Regenerationszeit aller Versuchsgruppen auf Agarplatten erfolgte die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 10-facher Vergrößerung und 250 ms im FITC-Filter. Dazu wurden die Nematoden mit einem Tropfen Natriumazid [15 mM] auf einem Agarose-Pad immobilisiert und jeweils eine Gonade pro Nematode ausgezählt (vgl. [145, 146]). Das Experiment wurde jeweils dreimal wiederholt.

## 2.2.8 Bestimmung der Alterspigmente

Um den Alterungsprozess in *C. elegans* bewerten zu können, wurde die Akkumulation des autofluoreszenten Alterspigments im Darm des Wildtyps (Stamm N2) analysiert [147]. Das Alterspigment besteht biochemisch aus oxidierten und vernetzten Proteinen und Lipiden, welche nicht mehr abgebaut werden können [148].

Pro Versuchsgruppe wurden mindestens 20 Nematoden im L4-Stadium für zwölf Tage bei 20 °C in Flüssigmedium inkubiert. S-Medium<sub>K</sub> diente als Kontrollsubstanz, Cisplatin war die zu testende Substanz. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Am Tag zwölf wurde die Akkumulation des Alterspigments fluoreszenzmikroskopisch mittels DAPI-Filter ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität des Alterspigments im Darm wurde mittels *ImageJ*-Software quantifiziert. Das Experiment wurde jeweils dreimal wiederholt.

## 2.2.9 Ermittlung der pharyngealen Pumpfrequenz

Die pharyngeale Pumpfrequenz kann als Indikator für die neurotoxische Wirkung verschiedener Kandidatensubstanzen genutzt werden [1, 135, 137-139].

Die Vorbereitung der Versuchsgruppen und die Messung der pharyngealen Pumprate wurden so durchgeführt, wie durch Wellenberg et al. beschrieben [1]. Pro Versuchsgruppe wurden jeweils 30 junge adulte wildtypische Nematoden verwendet und bei 20 °C für insgesamt 168 h in Flüssigmedium inkubiert, welches auch als Kontrollsubstanz diente. Ein erster Medienwechsel erfolgte nach 48 h, ein zweiter weitere 48 h später (bei insgesamt 96 h). Entweder erfolgte eine über 168 h gleichbleibende Behandlung oder eine 48-stündige Exposition (im Sinne einer Prä-Inkubation) mit anschließender Post-Inkubation für 120 h in verschiedenen Kandidatensubstanzen. Die Messung der pharyngealen Pumprate erfolgte nach 48 h, nach 96 h und nach 168 h. Für die Auszählung wurden die benötigten Versuchstiere aus der Flüssigkultur auf eine mit OP50<sup>-1</sup> bewachsene Agarplatte transferiert. Die Messung erfolgte nach einer Akklimatisierungszeit von 45 Minuten mittels Binokulars bei 80-facher Vergrößerung. Pro Versuchsgruppe wurde die pharyngeale Pumprate von jeweils mindestens 10 Nematoden ausgezählt. Dabei wurde das Pumpen jedes einzelnen Nematoden mindestens zweifach für jeweils 30 Sekunden gezählt und auf diese Weise die durchschnittliche Anzahl der Pumpvorgängen pro Minute (engl. *pumps per minute*, ppm) kalkuliert. Die Nematoden wurden nach der Messung nicht wieder in Kultur genommen, sodass keine Messwiederholungen zu den weiteren Zeitpunkten stattgefunden haben. Das Experiment wurde jeweils dreimal wiederholt.

**Tabelle 7: Inkubationsschema zur Ermittlung der pharyngealen Pumprate.**

<b>Stunden (h)</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>144</b>	<b>168</b>
gleichbleibende Inkubation	X	X	X	X	X	X	X	X
Prä-Inkubation	X	X	X					
Post-Inkubation			X	X	X	X	X	X
Transfer			X		X			
Messung			X		X			X

## 2.2.10 RNA-vermittelte Interferenz über Fütterung

Um Gene gezielt herunterregulieren zu können, wird das Verfahren der RNA-vermittelten Interferenz (RNAi) genutzt. Das Einbringen der dafür nötigen doppelsträngigen RNA (dsRNA) kann auf verschiedene Weise erfolgen. Neben der direkten Injektion in die Nematoden oder der Inkubation in einer Lösung besteht die Möglichkeit der Einbringung von dsRNA über Fütterung eines spezifischen *E. coli* Stamms („RNAi feeding“). Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit praktiziert, wie es durch Kamath und Ahringer beschrieben wurde [149]. Die zu fütternden RNAi-Klone wurden über die Ahringer RNAi Library (Geneservice Limited, UK) bezogen und durch Sequenzierung verifiziert. Die Vorbereitung der Versuchsgruppen und die Messung der pharyngealen Pumprate entsprechen der Beschreibung durch Wellenberg et al. [1].

Verwendet wurde der *E. coli* Stamm HT115(DE3), der resistent gegen Tetracyclin und RNase-III-defizient ist. Zusätzlich wurde der Bakterienstamm mit einem Plasmid transformiert, auf dem sich eine Ampicillin Resistenz und die Zielsequenz des zu untersuchenden Gens befand. Die Expression der dsRNA wird durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) [1 mM] kontrolliert. Durch Fütterung von *C. elegans* mit diesen Bakterien wird die dsRNA aufgenommen und in *small interfering RNA* (siRNA) geschnitten, die sich im gesamten Organismus verteilt. Auf diese Weise wird die sequenzhomologe mRNA abgebaut und dadurch die Aktivität des betroffenen Gens reduziert.

Zur Herstellung einer Kultur des jeweiligen Bakterienklons wurde eine Einzelkolonie in LB-Medium gegeben und mit Ampicillin und Tetracyclin (1:1000) versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C unter stetigem Schütteln (175 rpm). Am nächsten Tag wurde die OD<sub>600</sub> photometrisch bestimmt und auf den Zielwert von 0,9 mit LB-Medium verdünnt. Für die Herstellung von RNAi-feeding Platten wurde der NGM-Agar zusätzlich mit Ampicillin [100  $\mu$ g/ml] und IPTG [1 mM] versetzt und mit jeweils 150  $\mu$ l der auf eine OD<sub>600</sub> von 0,9 eingestellten Kultur beimpft. Die Lagerung über Nacht erfolgte bei Raumtemperatur, anschließend bis zu drei Wochen bei 4 °C. Für die RNAi-Experimente wurde der *C. elegans* Stamm TU3311 eingesetzt, da er für feeding-RNAi neuronal hypersensitiv ist. Pro Versuchsgruppe wurden jeweils mindestens 30 Tiere ab dem L4-Stadium verwendet. Die Nematoden wurden nach der Synchronisation auf den RNAi-Platten kultiviert, für die Inkubation mit Cisplatin jedoch bei Erreichen des L4-Stadiums in Flüssigkultur transferiert. Auch hier diente die zuvor

hergestellte RNAi-Bakterienkultur als Nahrungsquelle. Als Kontrollgruppe wurden HT115(DE3) Bakterien mit dem Leervektor L4440 genutzt. Der Medienwechsel und die Auszählung der pharyngealen Pumprate erfolgte wie unter 2.2.9 beschrieben. Die Inkubation erfolgte hingegen dauerhaft mit der gleichen Substanz und es wurde keine Post-Inkubation vorgenommen.

### 2.2.11 ICP-MS - Messung des Cisplatin-Gehalts

Um den Platin-Gesamtgehalt und somit die Aufnahme von Cisplatin in den verschiedenen Versuchsgruppen quantifizieren zu können, wurde eine massenspektrometrische Methode, die ICP-MS (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*) angewendet. Nach Vorbereitung der Proben am Institut für Toxikologie in Düsseldorf erfolgte die Messung am Institut für anorganische und analytische Chemie in Münster durch die AG Karst. Hier wurde die ICP-MS durch Barbara Crone etabliert und erfolgte wie zuvor beschrieben [150].

Die Herstellung der Proben erfolgte wie bei Wellenberg et al. beschrieben [1]: zuerst wurden die Tiere für 48 h mit Cisplatin inkubiert und anschließend für weitere 48 h mit verschiedenen Testsubstanzen nachbehandelt. Als Kontrolle diente S-Medium<sub>K</sub>. Pro Gruppe wurden 1200-1500 Nematoden im L4-Stadium verwendet. Für die Probenaufbereitung erfolgte die Waschung der Tiere in einer NaCl-Lösung [85 mM], die mit 0,01 % Tween versetzt wurde. Im Anschluss wurde die Probe bei 1600 rpm für zwei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgenommen. Dieser Waschschrift wurde mindestens dreimal wiederholt, um ein falsches Signal durch eine reine Anhaftung von Cisplatin zu vermeiden. Im Anschluss wurde der Überstand mit 400 µl der reinen NaCl-Lösung [85 mM] auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Um die Proben zu lysieren, wurden sie dreimal für je 20 Sekunden bei einer Amplitude von 100 % auf Eis sonifiziert.

Um den Transport der Proben zu ermöglichen, wurden sie bei 60 °C über Nacht im Hitzeschränk getrocknet. Das Auflösen der Proben in 500 µl HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Verhältnis 1:1 sowie die anschließende Messung erfolgte in Münster [150].

## 3 Ergebnisse

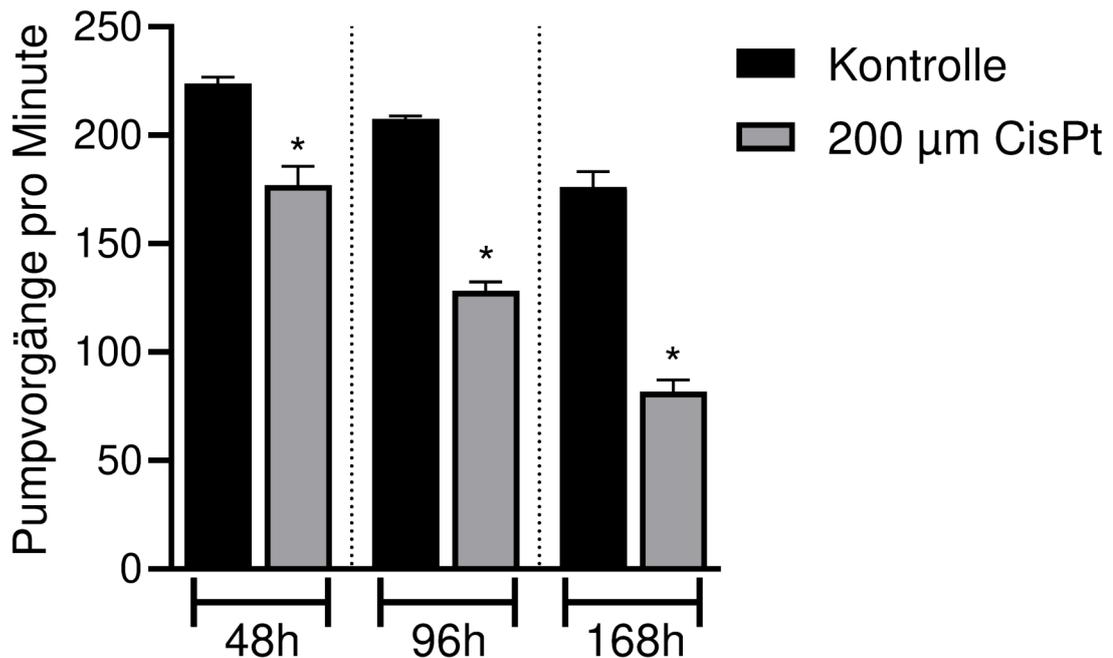
### 3.1 Cisplatin-Exposition verringert die pharyngeale Pumprate

Die Ermittlung der pharyngealen Pumprate ist eine in *C. elegans* etablierte Methode, welche als Indikator für Neurotoxizität verwendet wird [1, 135, 137-139]. Das bei der Untersuchung der pharyngealen Pumprate gemessene hochfrequente Pumpen ist vor allem abhängig von der neuronalen Übertragung [151]; die Pumpfrequenz kann durch die pharyngealen Neurone, wie in den folgenden Versuchen beispielsweise auf Grund der Gegenwart von Nahrung, stimuliert werden [152]. Bekannt neurotoxische Substanzen reduzieren die pharyngeale Pumprate [1, 135, 137-139], weshalb dieser Surrogatmarker gewählt wurde, um die neurotoxischen Effekte von Cisplatin zu quantifizieren. Von den drei zuvor eingeführten Platinderivaten weist Cisplatin nicht nur klinisch die stärkste Neurotoxizität auf [17, 153], sondern zeigte auch in den Untersuchungen von Wellenberg et al. die stärkste Reduktion der pharyngealen Pumprate [1].

Um den neurotoxischen Effekt von Cisplatin in *C. elegans* darzustellen, wird zu Beginn die pharyngeale Pumprate einer Cisplatin-Gruppe mit der Pumprate einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Die gewünschte neurotoxische Wirkung von Cisplatin besteht in *C. elegans* nur in einem engen Dosisbereich [1]. Hohe Konzentrationen können eine rasche Letalität verursachen [154]. Cisplatin zeigte in Untersuchungen von Wellenberg et al. eine dosisabhängige Reduktion der Pumprate; eine 96-stündige Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin beispielsweise reduzierte die Pumprate um ca. 50 % [1]. In dieser Arbeit wurde in Hinblick auf die kürzere, lediglich 48-stündige Puls-Behandlung in den späteren Post-Inkubations-Versuchen daher eine mit 200  $\mu\text{M}$  doppelt so hohe Cisplatin-Konzentration ausgewählt. Für diese erste Versuchsreihe wurde die Cisplatin-Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum von 168 h mit 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde über diese Zeit in dem regulären Nährmedium (S-Medium<sub>K</sub>) inkubiert. Der Medienwechsel und die Auswertung erfolgten jeweils nach dem Standardschema (Tabelle 7).

Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen ist bei der Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin zu jedem Messzeitpunkt eine signifikante Verringerung der Pumprate gegenüber der unbehandelten Kontrolle feststellbar (Abbildung 9). Nach einer 48-stündigen Inkubation in Medium, welches Cisplatin enthält, ist die Pumprate mit einem Mittelwert von 177 Pumpvorgängen pro Minute (ppm, engl. *pumps per minute*) und einem Standardfehler (SEM, engl. *standard error of mean*) von 9 um ca. 21 % gegenüber der Kontrollgruppe mit  $224 \pm 3$  ppm gesunken. Nach 96 h beträgt die Reduktion bereits mehr als 38 % (von  $208 \pm 1$  ppm auf  $128 \pm 4$  ppm). Nach 168 h ist der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ( $176 \pm 7$  ppm) und der Cisplatin-Gruppe ( $82 \pm 5$  ppm) mit einer Reduktion um mehr als 50 % am stärksten ausgeprägt (Abbildung 9). Die Verringerung der pharyngealen Pumprate als Surrogatmarker für Neurotoxizität spricht somit für eine Cisplatin-induzierte neuronale Schädigung in *C. elegans*.

Es ist bekannt, dass die pharyngeale Pumprate mit dem Alter abnimmt [1, 138]. Ein Vergleich der Kontrollgruppen zu den Zeitpunkten 48 h, 96 h und 168 h zeigt auch hier, dass die Pumprate der unbehandelten Nematoden mit dem Alter geringer wird. Dabei entspricht die Verringerung des Pharynxpumpens der Kontrollgruppe um 21 % (von initial  $224 \pm 3$  ppm nach 48 h auf  $176 \pm 7$  ppm nach 168 h) allein durch die Alterung ungefähr der Verringerung, die Cisplatin bereits nach 48 h verursacht (um ebenso ca. 21 % auf  $177 \pm 9$  ppm, Abbildung 9).



**Abbildung 9: Die pharyngeale Pumprate wird durch Cisplatin-Exposition reduziert.**

Dargestellt ist die Anzahl der Pumpvorgänge des Pharynx pro Minute (ppm, engl. *pumps per minute*) mit und ohne Gabe von Cisplatin. Es wurden mindestens 30 wildtypische Nematoden im L4-Stadium verwendet. Die Pumpvorgänge pro Minute wurden immer für mindestens 10 Nematoden pro Versuchsgruppe und Messzeitpunkt mindestens zweimalig gezählt und anschließend wurde ein Mittelwert kalkuliert. Die Versuchsgruppe wurde über 168 h mit Cisplatin [200 µM] behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub>. Die Messung des Pharynxpumpens erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 h, 96 h und 168 h bei 20 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der ppm aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3) mit jeweils mindestens 10 Individuen pro Versuchsgruppe (N ≥ 10). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle erfolgte für jeden Messzeitpunkt mit Hilfe des Student-T-Tests (\*p ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle).

### 3.2 Der *Knockdown* von *gcs-1* mittels RNAi verringert die pharyngeale Pumprate

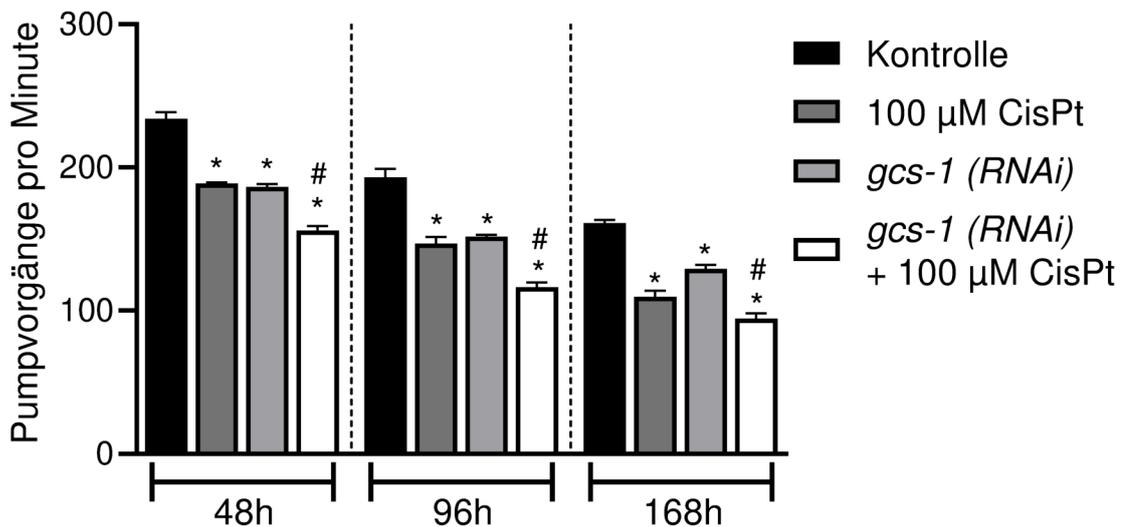
Das Tripeptid Glutathion, welches aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin besteht, hat eine wichtige Funktion im Rahmen der Detoxifikation von Schwermetallen [155, 156]. Außerdem kann Glutathion in seiner reduzierten Form (GSH) über seine Thiolgruppe (-SH) mit ROS reagieren und damit oxidativen Stress reduzieren [29]. Da oxidativer Stress neben der DNA-Schädigung einer der Schlüsselfaktoren in der Entstehung der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität ist [77], kann angenommen werden, dass eine veränderte Funktion des Glutathion-Systems auch Auswirkungen auf die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität haben könnte.

Um zu untersuchen, welche Bedeutung das Glutathion-System bei der Entstehung einer Cisplatin-induzierten Neurotoxizität hat, wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA des Gens der Glutamat-Cystein-Ligase (*gcs-1* in *C. elegans*) mittels RNA-vermittelter Interferenz (RNAi) gestört [1]. Die *gcs-1* ist an der Synthese von GSH beteiligt, indem sie Glutaminsäure mit Cystein verbindet. Das führt zu der Annahme, dass durch den *Knockdown* von *gcs-1* weniger GSH zur Verfügung steht. Erneut wurde der Surrogatmarker „pharyngeale Pumprate“ als Endpunkt für die neuronale Schädigung gewählt und nach Cisplatin-Behandlung, nach dem *Knockdown* von *gcs-1* und nach einer Kombination aus beidem gemessen. Verwendet wurde ein transgener Stamm, dessen Neurone für die RNA-Interferenz sensitiv sind. Der Medienwechsel und die Auswertung erfolgten nach dem Standardschema und wie durch Wellenberg et al. beschrieben [1] (Tabelle 7).

Zu jedem untersuchten Zeitpunkt lässt sich eine Verringerung der pharyngealen Pumprate aller drei Versuchsgruppen gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle feststellen. Zu den Messzeitpunkten 48 h, 96 h und 168 h ist sowohl die Pumprate der Gruppe mit einer reinen Cisplatin-Behandlung als auch die Pumprate der Gruppe mit einer *gcs-1* (RNAi) sowie die Pumprate der Gruppe, in der diese beiden Bedingungen kombiniert wurden, signifikant gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppe vermindert (\* in Abbildung 10). Werden diese Versuchsgruppen untereinander verglichen, kann festgestellt werden, dass das Pharynxpumpen zu den Messzeitpunkten 48 h und 96 h in der *gcs-1* (RNAi)-Gruppe in gleichem Ausmaß verringert ist, wie durch eine alleinige Cisplatin-Gabe von 100 µM. Nach 48 h sinkt die Pumprate von  $234 \pm 5$  ppm um jeweils ca. 20 % auf  $189 \pm 1$  ppm (100 µM Cisplatin) bzw. auf  $186 \pm 2$  ppm (*gcs-1* (RNAi)). Nach 96 h sinkt die Pumprate von  $193 \pm 6$  ppm sogar um mehr als 20 % auf  $147 \pm 5$  ppm durch eine Behandlung mit Cisplatin bzw. auf  $152 \pm 1$  ppm durch die *gcs-1* (RNAi) (Mittelwert  $\pm$  SEM, Abbildung 10). Die RNAi-Behandlung allein führt somit bereits zu einer signifikanten Verringerung der pharyngealen Pumprate. Diese Verringerung ist vergleichbar mit der, die durch die Gabe von Cisplatin bewirkt wird [1].

Die deutlichste Verringerung der pharyngealen Pumprate zeigt die Kombination aus *Knockdown* von *gcs-1* mittels RNAi und Cisplatin-Gabe. Diese ist nicht nur gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert (um ca. 33 % nach 48 h und um ca. 40 % nach 96 h und 168 h, \* in Abbildung 10), sondern auch gegenüber der Monobehandlung mit Cisplatin. Nach 48 h und 96 h ist die Pumprate der Kombinationsgruppe um ca. 20 % und nach 168 h um ca. 14 % gegenüber der reinen

Cisplatin-Gruppe reduziert (# in Abbildung 10). Auch gegenüber der Pumprate der reinen *gcs-1 (RNAi)*-Gruppe ist die Pumprate der Kombinationsgruppe zu jeder Zeit signifikant reduziert (ebenso # in Abbildung 10). In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass der RNAi-vermittelte *Knockdown* von *gcs-1* und die Cisplatin-Exposition additiv wirken. Die Depletion von Glutathion sensitiviert *C. elegans* gegenüber Cisplatin und kann dessen neurotoxische Wirkung verstärken [1].



**Abbildung 10: Die pharyngeale Pumprate wird durch den *Knockdown* von *gcs-1* mittels RNAi und Cisplatin-Exposition reduziert.**

Dargestellt ist Anzahl der Pumpvorgänge des Pharynx pro Minute (ppm) nach dem *Knockdown* von *gcs-1* (Glutamat-Cystein-Ligase) mittels RNAi. Neben der *gcs-1*-Versuchsgruppe und der Leervektor-Kontrollgruppe wurde die Auswirkung einer alleinigen und einer zusätzlichen Cisplatin-Gabe [100 µM] über den gesamten Zeitraum untersucht. Verwendet wurden Nematoden im L4-Stadium des Stamms TU3311. Die Cisplatin-Versuchsgruppe wurde über 168 h mit Cisplatin [100 µM] behandelt. Die Kontrollgruppe (Leervektor) erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub>. Die *gcs-1 Knockdown*-Gruppen wurden ebenfalls für 168 h in S-Medium<sub>K</sub> bzw. zusätzlich mit Cisplatin [100 µM] inkubiert. Die Messung der Frequenz des Pharynxpumpens erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 h, 96 h und 168 h bei 20 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der ppm aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3) mit jeweils mindestens 10 Individuen pro Versuchsgruppe (N ≥ 10). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte für jeden Messzeitpunkt mit Hilfe der One-Way ANOVA (\*p ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle, #p ≤ 0,05 Cisplatin-Gabe vs. *gcs-1 (RNAi)* + Cisplatin bzw. *gcs-1 (RNAi)* vs. *gcs-1 (RNAi)* + Cisplatin) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni [1].

### 3.3 NAC, WR 1065, Vitamin C und Koffein zeigen antioxidative Kapazität *in vitro*

Neben der Bildung von DNA-Addukten fördert Cisplatin auch die Entstehung von oxidativen Bedingungen, was als einer der verschiedenen möglichen

Schlüsselfaktoren für die Entstehung einer CIPN gilt [77]. Da antioxidativ wirksame Substanzen oxidativen Stress reduzieren können, besteht die Hypothese, dass sie eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität abmildern könnten. Aus diesem Grund wurden mögliche Kandidatensubstanzen auf ihr antioxidatives Potenzial hin untersucht. Um die antioxidative Kapazität der Kandidatensubstanzen zu bestimmen, wurde ein *Trolox Equivalent Antioxidative Capacity*-Test, kurz *TEAC*-Test, durchgeführt. Dabei wurde die antioxidative Wirkung mit der von Trolox, einem synthetischen wasserlöslichen potent antioxidativ wirksamen Vitamin-E-Derivat, mittels Absorptionsmessung verglichen und so der *TEAC*-Wert bestimmt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen gemessen und als Absorptionskurve aufgetragen. Über den Quotienten aus der Steigung der Regressionsgeraden der Testsubstanz ( $m_{\text{Testsubstanz}}$ ) und der Steigung der Regressionsgeraden von Trolox ( $m_{\text{Trolox}}$ ) wurde der *TEAC*-Wert errechnet (Tabelle 8) [1, 142]. Je höher dieser *TEAC*-Wert ist, desto höher ist auch die antioxidative Kapazität der getesteten Substanz. Ein *TEAC*-Wert von 1 entspricht somit der antioxidativen Kapazität von Trolox (Tabelle 8).

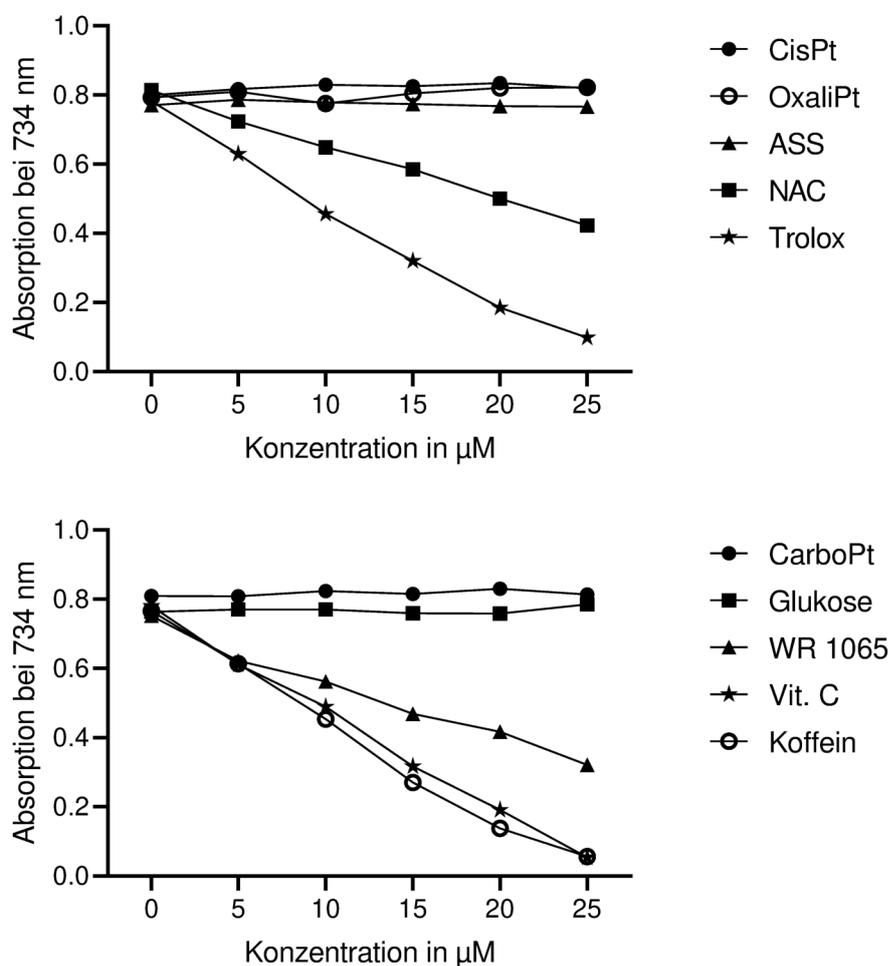
**Tabelle 8: Antioxidative Kapazität verwendeter Testsubstanzen und platinierender Substanzen im Vergleich zu Trolox.**

Ein *TEAC*-Wert = 1 entspricht der antioxidativen Kapazität von Trolox, ein *TEAC*-Wert < 1 entspricht einer geringeren, ein *TEAC*-Wert > 1 einer höheren antioxidativen Kapazität als Trolox [1].

Substanz	Regressionsgerade	$\frac{m_{\text{Testsubstanz}}}{m_{\text{Trolox}}}$	<i>TEAC</i> -Wert
Koffein	$y = -0,0295x + 0,7515$	-0,0295 / -0,0279	1,057
Vitamin C	$y = -0,0289x + 0,769$	-0,0289 / -0,0279	1,036
<b>Trolox</b>	$y = -0,0279x + 0,7612$	-0,0279 / -0,0279	<b>1,000</b>
WR 1065	$y = -0,0164x + 0,7285$	-0,0164 / -0,0279	0,588
NAC	$y = -0,0153x + 0,8076$	-0,0153 / -0,0279	0,548
ASS	$y = -0,0005x + 0,7793$	-0,0005 / -0,0279	0,018
Glukose	$y = 0,0004x + 0,7637$	0,0004 / -0,0279	-0,014
Carboplatin	$y = 0,0005x + 0,8112$	0,0005 / -0,0279	-0,018
Cisplatin	$y = 0,0009x + 0,81$	0,0009 / -0,0279	-0,032
Oxaliplatin	$y = 0,0012x + 0,7895$	0,0012 / -0,0279	-0,043

Die Regressionsgeraden mit einem größeren Steigungsbetrag entsprechen am ehesten dem Verlauf der Trolox-Vergleichsgeraden. Je flacher der Verlauf der Kurve ist, desto geringer ist die antioxidative Kapazität der jeweiligen Substanz (Abbildung

11). Erwartungsgemäß weisen die Platinderivate keine nennenswerte im *TEAC*-Assay bestimmbare antioxidative Kapazität auf. Dies gilt ebenso für Acetylsalicylsäure (ASS) und Glukose. Vitamin C und Koffein zeigen unter den getesteten Substanzen die höchste antioxidative Kapazität, welche mit einem *TEAC*-Wert von ungefähr 1 im Bereich der Vergleichssubstanz Trolox liegt. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass N-Acetylcystein (NAC) und der aktive Metabolit von Amifostin, WR 1065, mit einem *TEAC*-Wert von 0,5 – 0,6 über eine im Vergleich zu Trolox etwas geringere, aber robuste antioxidative Kapazität verfügen [1] (Tabelle 8, Abbildung 11).



**Abbildung 11: Antioxidative Kapazität verwendeter Testsubstanzen und Platinderivate.**

Dargestellt ist die antioxidative Kapazität der verwendeten Testsubstanzen NAC, WR 1065, ASS, Vitamin C, Glukose und Koffein im Vergleich zu der Kontrollsubstanz Trolox. Auch die Platinanaloge Cis-, Oxali- und Carboplatin wurden getestet. Von jeder Substanz wurden 6 Konzentrationen zwischen 0 µM und 25 µM gemessen und gegen die Absorption des ABTS/APS Radikals aufgetragen. Zur besseren Übersicht wurden lediglich die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3) in zwei getrennten Abbildungen dargestellt.

### 3.4 Die Reduktion der pharyngealen Pumprate nach Cisplatin-Exposition kann durch eine Post-Inkubation mit bestimmten Testsubstanzen abgemildert werden

In dieser Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob neben der Induktion einer Neurotoxizität durch Cisplatin auch eine Modulation bzw. sogar Protektion des Nervensystems von *C. elegans* durch eine Post-Inkubation mit verschiedenen Kandidatensubstanzen möglich ist. Eine Post-Inkubation beschreibt dabei die Behandlung der Nematoden mit verschiedenen, potenziell neuroprotektiven Kandidatensubstanzen nach vorheriger Cisplatin-Exposition. Im Gegensatz bedeutet Prä-Inkubation, dass potenzielle Kandidatensubstanzen vor der Gabe von Cisplatin appliziert werden. Bisher existieren vor allem Daten aus klinischen Studien für die vorherige Behandlung mit den verwendeten Testsubstanzen [88]. Aus diesem Grund sollten mit Hilfe des Modellorganismus *C. elegans* ergänzend Daten für eine Nachbehandlung gesammelt werden.

Die Wahl der potenziell protektiven Substanzen für die Post-Inkubations-Versuche in der vorliegenden Arbeit richtete sich zum einen nach deren Verwendung in klinischen Studien. Auch wenn es in der Metaanalyse von Albers et al. kein eindeutiges Ergebnis oder eine Empfehlung hinsichtlich der Verwendung der Substanzen gibt [88], sind für eine Prä-Inkubation mit N-Acetylcystein (NAC) und Amifostin (aktiver Thiol-Metabolit WR 1065) in mehreren klinischen Studien neuroprotektive Effekte beschrieben [88]. Aufgrund der klinischen Daten wurden NAC und WR 1065 für diesen neuartigen Versuchsaufbau verwendet. Auch Studien an Säugetiermodellen, in denen ein neuroprotektiver Effekt für ASS beschrieben wird, wurden für die Auswahl der Kandidatensubstanzen herangezogen [157, 158].

Zum anderen wurde die antioxidative Kapazität der Substanzen als Auswahlkriterium herangezogen (siehe 3.3). Auf Grund ihrer hohen antioxidativen Wirkung wurden Vitamin C und Koffein als Kandidatensubstanzen für die Post-Inkubation genutzt. Für Glukose hingegen wurde keine (protektive) Wirkung erwartet.

### 3.4.1 NAC-, WR 1065- und ASS-Post-Inkubation verringern die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität

Für die Induktion der Neurotoxizität wurde eine Puls-Behandlung mit 200  $\mu$ M Cisplatin gewählt. Dies bedeutet, dass die Versuchsgruppen Cisplatin nur über die ersten 48 h erhielten. Im Anschluss erfolgte eine Post-Inkubation für 120 h in dem regulären Nährmedium S-Medium<sub>K</sub> bzw. mit den Testsubstanzen 5 mM NAC, 100  $\mu$ M WR 1065 oder 0,5 mM ASS. Die genannten Konzentrationen wurden für alle Nachbehandlungs-Versuche verwendet. Die Kontrollgruppe wurde weder mit Cisplatin noch mit einer Kandidatensubstanz behandelt und über den gesamten Zeitraum lediglich in S-Medium<sub>K</sub> inkubiert. Um eine Veränderung der Pumprate allein durch die Gabe der Testsubstanzen auszuschließen, wurde zusätzlich immer eine Kontrollgruppe für die jeweilige Testsubstanz mitgeführt. Diese Kontrollgruppen erhielten anders als die Versuchsgruppen über die ersten 48 h keine Cisplatin-Behandlung, sondern S-Medium<sub>K</sub>. Im Anschluss erfolgte ebenfalls die Post-Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz für 120 h. Der Medienwechsel und die Auswertung erfolgten für alle Gruppen nach dem Standardschema und wie durch Wellenberg et al. beschrieben [1] (Tabelle 7).

Für alle Versuchsreihen ist die pharyngeale Pumprate der Cisplatin-Gruppe zu dem Messzeitpunkt 48 h gegenüber der unbehandelten Kontrolle verringert (\* in Abbildung 12 A-C). Dies entspricht den Ergebnissen von Kapitel 3.1. Auch nach 96 h ist die Pumprate der Cisplatin-Gruppe mit einer Post-Inkubation in dem Kontrollmedium S-Medium<sub>K</sub> in allen Versuchsreihen gegenüber der unbehandelten Kontrolle verringert (\* in Abbildung 12 A-C). Zu dem Messzeitpunkt 168 h gilt dies nur für die NAC-Versuchsreihe (\* in Abbildung 12 A). In der Versuchsreihe von WR 1065 (Abbildung 12 B) und ASS (Abbildung 12 C) ist das Pharynxpumpen der Cisplatin-Gruppe mit der Nachbehandlung in Kontrollmedium zu diesem Zeitpunkt ebenso tendenziell gegenüber der unbehandelten Kontrolle vermindert, jedoch nicht (mehr) signifikant.

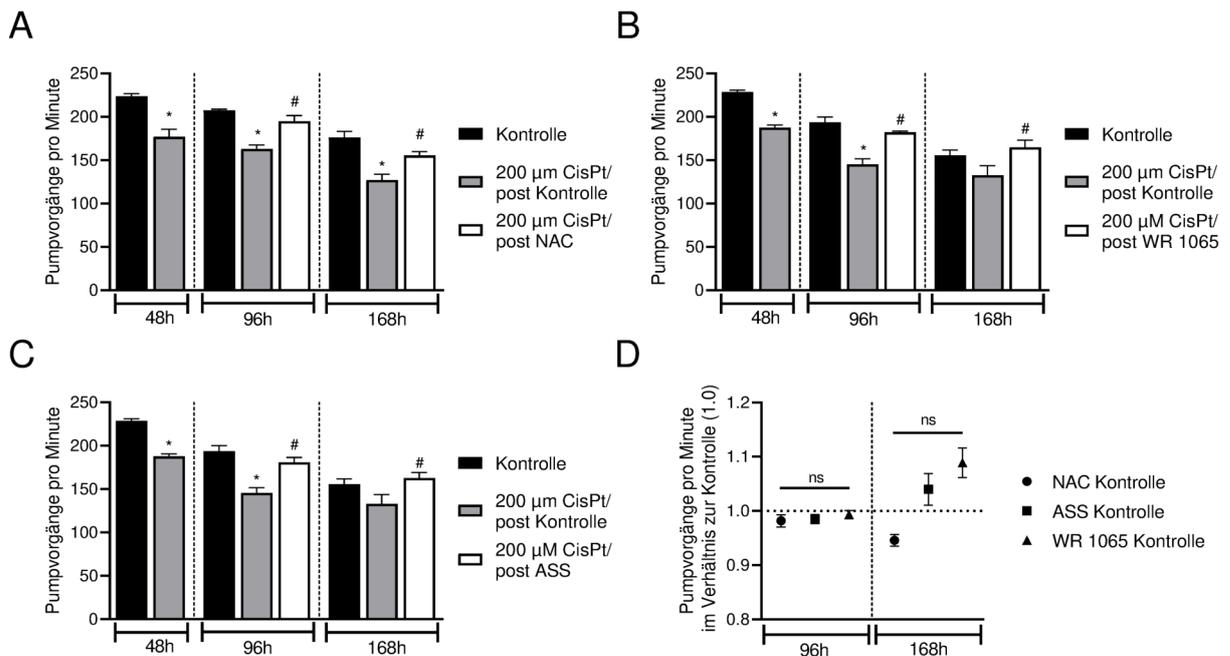
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Nachbehandlung mit den Testsubstanzen NAC und WR 1065 nach 96 h und 168 h eine deutliche Verbesserung der Pumprate gegenüber der respektiven Cisplatin-Kontrollgruppe bewirkt werden kann [1] (# in Abbildung 12 A-B). Auch eine Post-Inkubation mit ASS verbessert die Pumprate zu beiden Messzeitpunkten signifikant gegenüber der Cisplatin-Kontrollgruppe (# in Abbildung 12 C). Für NAC beträgt diese Erhöhung nach 96 h ca. 20 % (von  $163 \pm 5$  ppm auf  $195 \pm 7$  ppm, Mittelwert  $\pm$  SEM, Abbildung 12 A).

Für WR 1065 (Abbildung 12 B) und ASS (Abbildung 12 C) ergibt sich nach 96 h eine Erhöhung um ca. 25 % (von  $145 \pm 6$  ppm auf  $182 \pm 2$  ppm und von  $145 \pm 6$  ppm auf  $181 \pm 6$  ppm). Nach 168 h wird für NAC eine Erhöhung um ca. 23 % von  $127 \pm 7$  ppm auf  $156 \pm 5$  ppm, für WR 1065 um ca. 24 % von  $133 \pm 11$  ppm auf  $165 \pm 8$  ppm und für ASS um ca. 22 % von  $133 \pm 11$  ppm auf  $163 \pm 7$  ppm festgestellt. Damit ergibt sich stets eine signifikant höhere Pumprate durch die Post-Inkubation mit den drei Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS zu den Messzeitpunkten 96 h und 168 h im Vergleich zu einer Post-Inkubation in Kontrollmedium (# in Abbildung 12 A-C).

Zu allen Messzeitpunkten unterscheiden sich die Pumpraten der Cisplatin-Gruppen mit einer Nachbehandlung nicht signifikant von den Pumpraten der entsprechenden gänzlich unbehandelten Kontrollgruppen. Dies wird deutlich, wenn man den weißen Balken (Nachbehandlung mit NAC, WR 1065 und ASS) in jeder Abbildung mit dem dazugehörigen schwarzen Balken (respektive gänzlich unbehandelte Kontrollgruppe) vergleicht (Abbildung 12 A-C, nicht markiert). Damit wird der neurotoxische Effekt von Cisplatin im Sinne einer Pumpraten-Reduktion durch die Nachbehandlung mit allen drei Testsubstanzen formal revertiert. Nach 168 h steigt der absolute Wert der Pumpvorgänge pro Minute der Cisplatin-Gruppen mit einer Post-Inkubation mit WR 1065 und mit ASS sogar über den Wert der unbehandelten Kontrollgruppe an. Dieser Effekt ist wie zuvor beschrieben jedoch nicht signifikant.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt einer Pumpratenverbesserung durch die drei genannten Testsubstanzen nur nach vorheriger Cisplatin-Inkubation besteht. Die alleinige Gabe der drei Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS zeigt keinen Effekt auf die Pumprate von unbehandelten Nematoden (Abbildung 12 D).

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es durch eine Nachbehandlung mit NAC und WR 1065 möglich ist, die nach Cisplatin-Behandlung reduzierte pharyngeale Pumprate zu erhöhen und den neurotoxischen Effekt von Cisplatin damit formal zu revertieren [1]. Genauso verbessert eine Post-Inkubation mit ASS die Pumprate und verringert die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans*.



**Abbildung 12: Eine Post-Inkubation mit NAC, WR 1065 und ASS verringert die Abnahme der pharyngealen Pumprate nach Cisplatin-Exposition.**

Dargestellt ist die Anzahl der Pumpvorgänge des Pharynx pro Minute (ppm) nach Gabe von Cisplatin und einer Nachbehandlung mit den Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS. Es wurden wildtypische Nematoden im L4-Stadium verwendet. Die Versuchsgruppe wurde über 48 h mit Cisplatin [200 µM] behandelt, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub> über den gesamten Zeitraum. Im Anschluss erfolgte eine Post-Inkubation (stets als „post“ gekennzeichnet) über 120 h in S-Medium<sub>K</sub> („post Kontrolle“) bzw. eine Nachbehandlung mit 5 mM NAC (A, „post NAC“) oder mit 0,5 mM ASS (C, „post ASS“). Die Post-Inkubation mit 100 µM WR 1065 (B, „post WR 1065“) wurde über die ersten 48 h der Post-Inkubation viermalig appliziert und bestand in den letzten 72 h aus der Gabe von S-Medium<sub>K</sub>. Die Kontrollen für die Testsubstanzen zeigt die Abbildung D. Die Kontrollgruppe für die Testsubstanzen erhielt über die ersten 48 h lediglich S-Medium<sub>K</sub>, für die weiteren 120 h (A, NAC und C, ASS) bzw. 48 h + 72 h (B, WR 1065) die jeweilige Testsubstanz. Die graphische Darstellung erfolgt als Verhältnis der Pumprate dieser Versuchsgruppen zur Pumprate der gänzlich unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie in Abbildung D). Die Messung des Pharynxpumpens erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 h, 96 h und 168 h bei 20 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der ppm aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3) mit jeweils mindestens 10 Individuen pro Versuchsgruppe (N ≥ 10). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte für jeden Messzeitpunkt mit Hilfe der One-Way ANOVA (\*p ≤ 0,05 vs. respektive Kontrolle, #p ≤ 0,05 Cisplatin vs. jeweilige Post-Inkubation, ns = nicht signifikant mit p ≥ 0,05 vs. respektive Kontrolle) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni [1].

### 3.4.2 Die Post-Inkubation mit Vitamin C, Glukose und Koffein kann die Reduktion der Pumprate nach Cisplatin-Exposition nicht abmildern

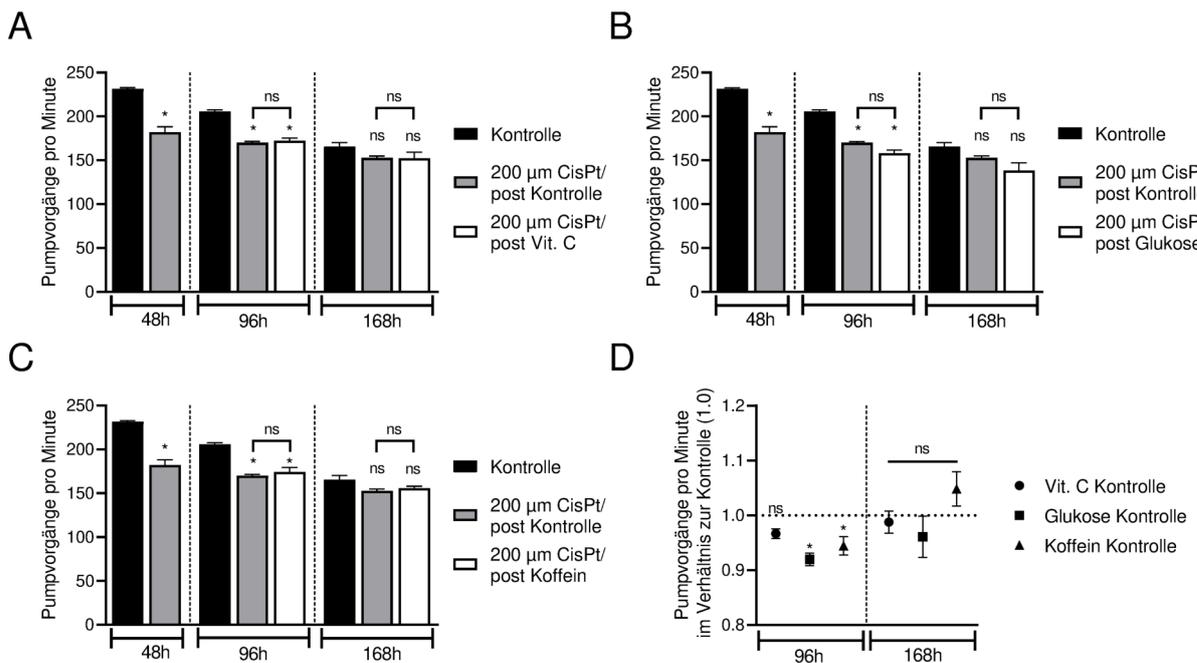
Neben NAC, WR 1065 und ASS wurde noch die Nachbehandlung mit den Kandidatensubstanzen Vitamin C, Glukose und Koffein hinsichtlich einer möglichen Verbesserung der pharyngealen Pumprate nach Cisplatin-Gabe untersucht. Die Inkubation der Nematoden in den Testsubstanzen Vitamin C [5 mM], Glukose [15 mM] und Koffein [10 mM] erfolgte wie zuvor beschrieben (siehe 2.2.9 und 3.4.1). Der Medienwechsel und die Auswertung erfolgten nach dem Standardschema (Tabelle 7). Erneut wurde auch jeweils eine Kontrollgruppe für die Testsubstanzen mitgeführt, um zu untersuchen, wie diese allein die Pumprate verändern (Abbildung 13 D).

Die pharyngeale Pumprate ist ebenso wie in den Versuchsreihen von NAC, WR 1065 und ASS auch in dieser Versuchsreihe in der Cisplatin-Gruppe zu den Messzeitpunkten 48 h und 96 h gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant verringert (\* in Abbildung 13 A-C). Diese Tendenz zeigt sich auch zu dem Messzeitpunkt 168 h in allen Cisplatin-Gruppen. Hier ist die Pumprate jedoch (ebenso wie bei der Versuchsreihe von WR 1065 und ASS) nicht (mehr) signifikant verringert (ns in Abbildung 13 A-C). Nach Cisplatin-Gabe zeigt die Post-Inkubation mit den Kandidatensubstanzen Vitamin C, Glukose und Koffein weder nach 96 h noch nach 168 h eine Verbesserung der Pumprate gegenüber der jeweiligen Cisplatin-Gruppe mit Kontroll-Nachbehandlung (ns in Abbildung 13 A-C). Somit zeigt sich weder für Vitamin C noch für Glukose oder Koffein ein (neuro-)protektiver Effekt (ns über dem Balken in Abbildung 13 A-C).

Anders als die Testsubstanzen NAC, WR 1065, ASS und Vitamin C, deren alleinige Gabe zu keinem Messzeitpunkt eine Veränderung der Pumprate gegenüber der reinen S-Medium<sub>K</sub>-Kontrolle zeigt (vgl. Abbildung 12 D), zeigt die Applikation der Substanzen Glukose und Koffein auch ohne vorherige Cisplatin-Gabe eine Veränderung der Pumprate nach 96 h (Abbildung 13 D). Die reine Nachbehandlung mit Glukose, ohne dass zuvor Cisplatin verabreicht wurde, senkt die Pumprate gegenüber der Kontrolle um ca. 8 % (in absoluten Werten von  $206 \pm 2$  ppm auf  $190 \pm 2$  ppm, Mittelwert  $\pm$  SEM). Die Post-Inkubation mit Koffein, explizit ohne vorherige Gabe von Cisplatin, senkt die Pumprate um ca. 6 % (von  $206 \pm 2$  ppm auf  $194 \pm 5$  ppm, Abbildung 13 D). Zum Messzeitpunkt 168 h ist keine Veränderung der Pumprate durch die Gabe von Glukose

oder Koffein feststellbar. Insgesamt handelt es sich mit einer prozentualen Veränderung im einstelligen Bereich um eher schwache Effekte.

Zusammenfassend kann eine Post-Inkubation mit den drei Kandidatensubstanzen Vitamin C, Glukose und Koffein die Verringerung der pharyngealen Pumprate und damit den neurotoxischen Effekt von Cisplatin nicht abmildern.



**Abbildung 13: Die pharyngeale Pumprate wird durch Vitamin C-, Glukose- und Koffein-Post-Inkubation nach Cisplatin-Exposition nicht beeinflusst.**

Dargestellt ist die Anzahl der Pumpvorgänge des Pharynx pro Minute (ppm) nach Gabe von Cisplatin und einer Nachbehandlung mit den Testsubstanzen Vitamin C, Glukose und Koffein. Für das Experiment wurden wildtypische Nematoden im L4-Stadium verwendet. Die Versuchsgruppe wurde über 48 h mit Cisplatin [200 µM] behandelt, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub> über den gesamten Zeitraum. Im Anschluss erfolgte eine Post-Inkubation (als „post“ gekennzeichnet) über 120 h in S-Medium<sub>K</sub> („post Kontrolle“) und 5 mM Vitamin C (A, „post Vit. C“), 15 mM Glukose (B, „post Glukose“) oder 10 mM Koffein (C, „post Koffein“). Die Kontrollgruppe für die Testsubstanzen (D) erhielt über die ersten 48 h lediglich S-Medium<sub>K</sub>, für die weiteren 120 h die jeweilige Testsubstanz. Diese Kontrollen wurden in Bezug zur reinen S-Medium<sub>K</sub>-Kontrolle gesetzt, welche als gestrichelte Linie dargestellt ist (D). Die Messung des Pharynxpumpens erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 h, 96 h und 168 h bei 20 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der ppm aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N ≥ 10). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte für jeden Messzeitpunkt mit Hilfe der One-Way ANOVA (\*p ≤ 0,05 vs. respektive Kontrolle, ns = nicht signifikant mit p ≥ 0,05 vs. respektive Kontrolle) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni.

### 3.5 Die Post-Inkubation mit NAC, WR 1065 und ASS hat keinen Einfluss auf den Cisplatin-Gehalt in den behandelten Nematoden

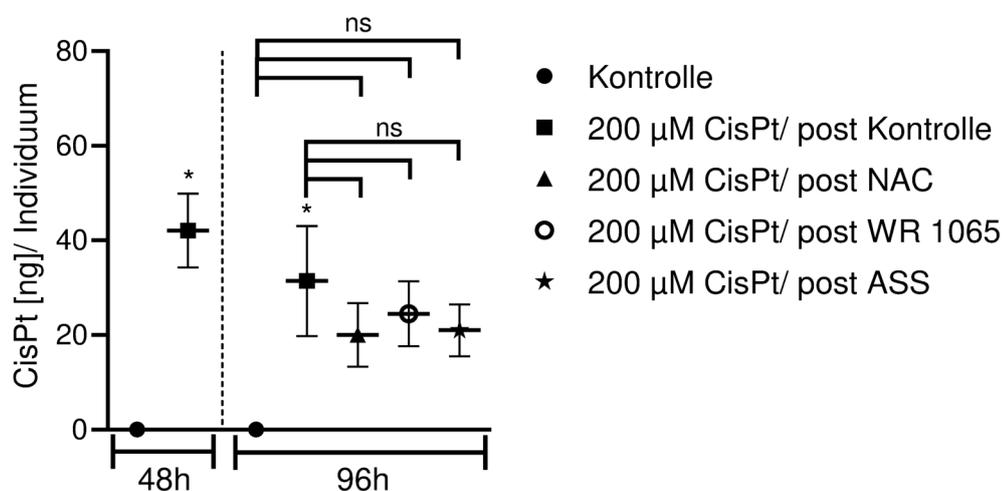
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Post-Inkubation mit den Kandidatensubstanzen NAC und WR 1065 in der Lage ist, die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität abzumildern [1]. Dies konnte ebenso für eine Nachbehandlung mit ASS gezeigt werden. Danach sollte außerdem überprüft werden, ob der Platin-Gesamtgehalt in diesen Gruppen gegenüber der Cisplatin-Gruppe mit einer Kontroll-Nachbehandlung verändert ist. So sollte untersucht werden, ob die Kandidatensubstanzen zu einer Verringerung des Platin-Gesamtgehalts führen und möglicherweise über diesen Mechanismus neuroprotektiv wirken.

Um die Aufnahme von Cisplatin und damit die intrazelluläre Gesamt-Konzentration in Nanogramm pro Nematode in den verschiedenen Versuchsgruppen zu quantifizieren, wurde die massenspektrometrische Methode ICP-MS (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*) in Kooperation mit dem Institut für anorganische und analytische Chemie in Münster verwendet. Die AG Karst führte die Probenmessung durch, da die ICP-MS dort durch Barbara Crone etabliert wurde. Crone et al. konnten über diese Methode zeigen, dass Cisplatin durch *C. elegans* aufgenommen wird und neben dem Darm besonders in der Kopfregeion akkumuliert [150], in der die höchste Anzahl an Neuronen und insbesondere die des pharyngealen Nervensystems liegen. Außerdem konnten Wellenberg et al. zeigen, dass Cisplatin in *C. elegans* dosisabhängig aufgenommen wird; je höher die externe Cisplatin-Konzentration ist, desto höher ist auch der via ICP-MS nachgewiesene Platin-Gehalt pro Nematode [1]. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für den Versuchsaufbau der ICP-MS das gleiche, oben aufgeführte Inkubationsschema wie für die Messung des Pharynxpumpens gewählt. Die Dauer des Experiments betrug insgesamt 96 h, die Messungen erfolgten nach 48 h und 96 h. Die Versuchsgruppen erhielten erneut eine Puls-Behandlung mit Cisplatin (200  $\mu\text{M}$  über 48 h) und im Anschluss für weitere 48 h eine Post-Inkubation in dem Kontrollmedium S-Medium<sub>K</sub> bzw. mit den Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS in den zuvor verwendeten Konzentrationen. Die Kontrollgruppe erhielt über 96 h keine Cisplatin-Behandlung, sondern S-Medium<sub>K</sub>.

Für beide Messzeitpunkte (48 h und 96 h) zeigt sich nach Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin ein erhöhter Cisplatin-Gehalt gegenüber der unbehandelten Kontrolle,

welche platinfrei ist. Der Platin-Gehalt beträgt nach 48 h im Mittel  $42 \pm 8$  ng pro Individuum (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* in Abbildung 14). Nach 96 h beträgt der Cisplatin-Gehalt der Cisplatin-Gruppe mit einer Post-Inkubation in Kontrollmedium  $31 \pm 12$  ng pro Individuum und ist damit weiterhin signifikant höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe (\* in Abbildung 14). Auch in den Gruppen, die einer Nachbehandlung mit den Kandidatensubstanzen unterzogen wurden, ist der Platin-Gehalt mit  $20 \pm 7$  ng für die NAC-Post-Inkubation, mit  $25 \pm 7$  ng für die WR 1065 Post-Inkubation und mit  $21 \pm 5$  ng pro Individuum für die ASS-Post-Inkubation höher als in der unbehandelten, platinfreien Kontrolle. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant (ns in Abbildung 14). Der Platin-Gehalt in den Post-Inkubationsgruppen unterscheidet sich auch nicht signifikant von dem in der Kontroll-Nachbehandlungsgruppe (ns in Abbildung 14).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Post-Inkubation mit den neuroprotektiven Kandidatensubstanzen NAC, WR 1065 und ASS die intrazelluläre Konzentration von Cisplatin nicht signifikant gegenüber der Cisplatin-Gruppe mit einer Post-Inkubation in Kontrollmedium verändert. In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Nachbehandlung mit diesen Testsubstanzen keinen signifikanten Einfluss auf die Cisplatin-Menge in den Nematoden hat [1].



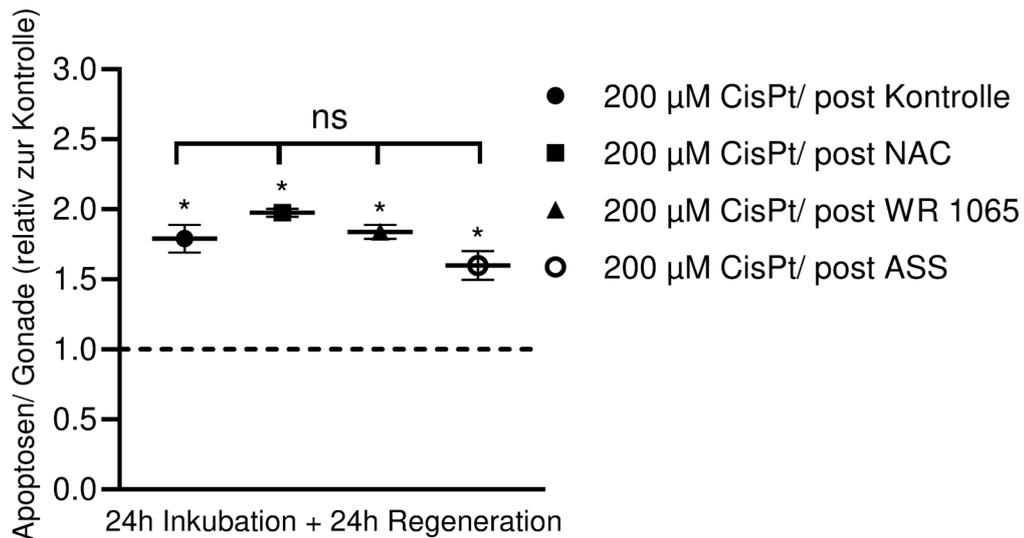
**Abbildung 14: NAC-, WR 1065- und ASS-Post-Inkubation verändern den Cisplatin-Gehalt nicht.** Dargestellt ist der Cisplatin-Gehalt in Nanogramm (ng) pro Individuum nach Gabe von Cisplatin und einer Nachbehandlung mit den Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS. Pro Versuchsgruppe wurden mindestens 1200 wildtypische Nematoden im L4-Stadium verwendet. Die Versuchsgruppen wurden über 48 h mit Cisplatin [200 µM] behandelt, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub> über den gesamten Zeitraum. Im Anschluss erfolgte eine Post-Inkubation (als „post“ gekennzeichnet) über weitere 48 h in S-Medium<sub>K</sub> und in 5 mM NAC, in 100 µM WR 1065 (4 x in 48 h) oder in 0,5 mM ASS. Die Messung des Platin-Gehalts erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 h und 96 h durch die AG Karst des Instituts für anorganische und analytische Chemie in Münster. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3 und N  $\geq$  1200 Individuen). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte für jeden Messzeitpunkt mit Hilfe der One-Way ANOVA (\*p  $\leq$  0,05 vs. respektive Kontrolle, ns nicht signifikant mit p  $\geq$  0,05 vs. respektive Kontrolle) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni [1].

### 3.6 Die Post-Inkubation mit NAC, WR 1065 und ASS hat keinen Einfluss auf die Cisplatin-bedingt erhöhte Apoptoserate in den mitotisch aktiven Keimzellen von *C. elegans*

Platinanaloga entfalten ihre Antitumor-Wirkung durch die Induktion der Apoptose. In *C. elegans* kann explizit lediglich die akut apoptotische Wirkung von Cisplatin durch die Auszählung der apoptotischen Keimbahnzellen in der Gonade ermittelt werden. Hierzu wurde ein transgener Stamm verwendet, in dem die Lokalisation von CED1::GFP sichtbar wird. Die Nachbarzellen der apoptotischen Zellen exprimieren den phagozytotischen Rezeptor CED-1, sodass das Fusionsprotein CED-1::GFP die apoptotischen Zellen durch die Bildung einer Art Lichthof (engl. *halo*) um diese herum hervorhebt [145] (Abbildung 16).

Für Cisplatin konnte durch Wellenberg et al. gezeigt werden, dass eine 24-stündige Inkubation mit 50, 100 und 150  $\mu\text{M}$  Cisplatin eine erhöhte Apoptoserate in den Keimbahnzellen von *C. elegans* bewirkt [1]. Nun sollte untersucht werden, ob die identifizierten (neuro-)protektiven Kandidatensubstanzen einen Einfluss auf die Apoptoserate nach Cisplatin-Exposition haben. So kann modelliert werden, ob neben der neurotoxischen Wirkung auch die apoptotische Wirkung von Cisplatin durch NAC-, WR 1065- und ASS-Gabe beeinträchtigt wird. Die Anzahl der apoptotischen Zellen pro Gonade wurde nach insgesamt 48 h bestimmt. Auf 24 h Inkubation in Flüssigmedium folgte für alle Gruppen eine 24-stündige behandlungsfreie Regenerationszeit auf Festmedium. Die Versuchsgruppen wurden für 4 h mit Cisplatin [200  $\mu\text{M}$ ] behandelt. Anschließend erfolgte eine 20-stündige Post-Inkubation mit den Kandidatensubstanzen NAC, WR 1065 und ASS in den zuvor verwendeten Konzentrationen. Die Kontrollgruppe erhielt entsprechend über 24 h S-Medium $\kappa$ .

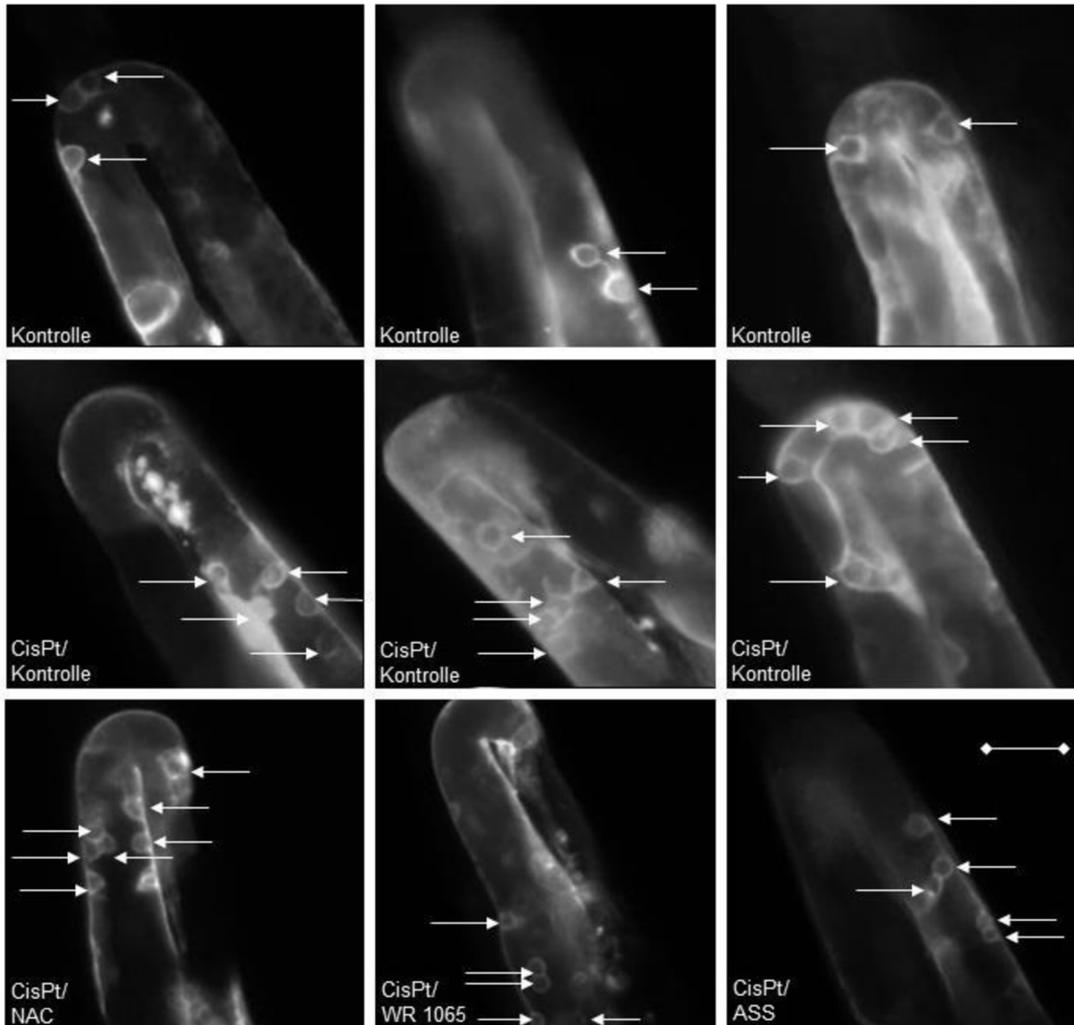
Alle mit Cisplatin behandelten Versuchsgruppen weisen nach 24 h Inkubation und 24 h Regenerationszeit eine gegenüber der unbehandelten Kontrolle ca. 1,5-fach bis 2-fach erhöhte Apoptoserate auf (Abbildung 15). Die absoluten Zahlenwerte liegen für die unbehandelte Kontrolle zwischen 2,5 und 3 Apoptosen pro Gonade, für die Monobehandlung mit Cisplatin zwischen 4,5 und 5,5 und für die Nachbehandlung mit den unterschiedlichen Substanzen zwischen 4,3 und 5,3 Apoptosen pro Gonade (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 15: NAC-, WR 1065- und ASS-Nachbehandlung haben keinen Einfluss auf die erhöhte Apoptoserate nach Cisplatin-Exposition in den mitotisch aktiven Keimzellen von *C. elegans*.**

Dargestellt ist die Anzahl der Apoptosen pro Gonade nach Gabe von Cisplatin und einer Nachbehandlung mit den Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS relativ zur Kontrolle (1.0). Für das Experiment wurden mindestens 20 Nematoden im L4-Stadium des Reporterstamms MD701 [CED-1::GFP] verwendet (eine ausgezählte Gonade pro Individuum). Die Versuchsgruppen wurden über 4 h mit Cisplatin [200 µM] behandelt, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub> über 24 h. Im Anschluss erfolgte eine Post-Inkubation (als „post“ gekennzeichnet) über weitere 20 h in S-Medium<sub>K</sub> bzw. mit 5 mM NAC, mit 100 µM WR 1065 (4 x in 20 h) oder mit 0,5 mM ASS. Die Messung der Apoptoserate erfolgte nach diesen 24 h Inkubation und weiteren 24 h Regeneration unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10-facher Vergrößerung und 250 ms Belichtung im FITC-Filter. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N ≥ 20 Individuen). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte mit Hilfe der One-Way ANOVA (\*p ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle, ns = nicht signifikant mit p ≥ 0,05 CisPt + Kontrolle vs. CisPt + Post-Inkubation mit Kandidatensubstanz) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni [1].

Damit zeigt sich zwischen der Cisplatin-Kontrollgruppe und den drei Gruppen mit einer Post-Inkubation mit den neuroprotektiven Kandidatensubstanzen kein Unterschied hinsichtlich der Apoptose-Induktion in *C. elegans* durch Cisplatin [1] (Abbildung 15). In diesem Modell ist die apoptotische Wirkung von Cisplatin somit nicht durch eine Nachbehandlung mit den Kandidatensubstanzen NAC, WR 1065 und ASS beeinträchtigt. Die Abbildung 16 zeigt repräsentative Bilder der einzelnen Versuchsdurchgänge. Im Anhang sind außerdem die absoluten Zahlenwerte aufgeführt (Abbildung 24).



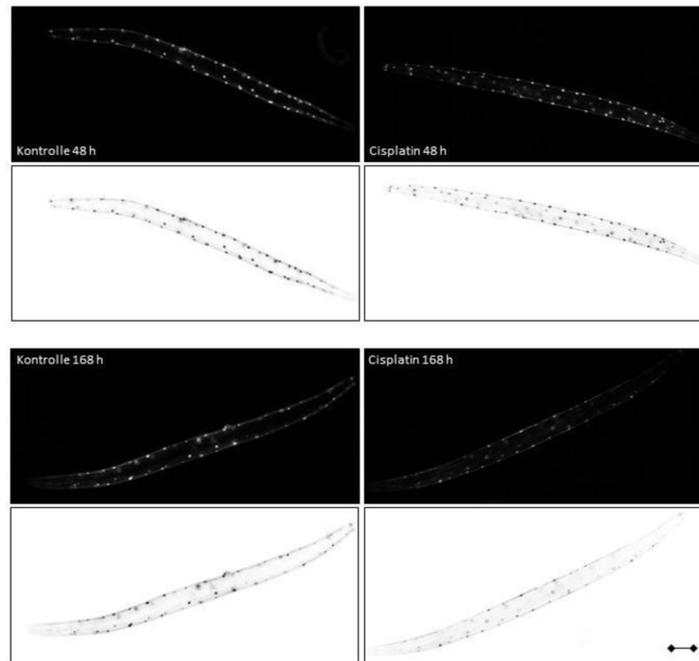
**Abbildung 16: Einfluss von Cisplatin und Post-Inkubation mit Kandidatensubstanzen auf die Apoptoserate in *C. elegans*.**

Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen jeweils einer Gonade des Reporterstamms MD701 [CED-1::GFP] für alle in Abbildung 15 gezeigten Gruppen bei 40-facher Vergrößerung. Die Pfeile (→) zeigen auf die sogenannten *halos*, die durch die Ansammlung von CED-1::GFP um die apoptotische Zelle entstehen und ausgezählt wurden. Der Maßstabbalken definiert eine Länge von 50 µm [1].

### 3.7 Die Behandlung mit Cisplatin führt in dem verwendeten Dosisbereich zu keiner Verminderung der Muskelzellkerne in *C. elegans*

Neben den Neuronen sind auch die Muskelzellen an dem pharyngealen Pumpvorgang beteiligt, da der Pharynx von *C. elegans* eine neuromuskuläre Pumpe ist. Das hochfrequente Pumpen bei der Nahrungsaufnahme, so wie es in dieser Arbeit bei der Messung des Pharynxpumpens untersucht wird, ist vor allem abhängig von der neuronalen Übertragung und nicht von der myogenen Grundaktivität [1, 151, 152]. Trotzdem sollte der Einfluss von Cisplatin auf die Muskelzellen von *C. elegans* untersucht werden, um eine mögliche Muskeltoxizität von Cisplatin zu erkennen und als potenziellen Störfaktor der pharyngealen Pumprate als Surrogatmarker für Neurotoxizität auszuschließen. Da bekannt ist, dass die Anzahl der Muskelzellkerne in Muskeln mit einer Funktionsstörung reduziert ist [143], wurde dieser Parameter als Maß für eine mögliche Muskeltoxizität von Cisplatin verwendet.

Um die Muskelzellkerne sichtbar zu machen, wurde der Reporterstamm myo-3p::GFP verwendet, der GFP sowohl nukleär als auch mitochondrial in den Körperwand- und Vulvamuskeln exprimiert [144] (Abbildung 17). Dieser Reporterstamm wird vor allem für die Analyse des altersbedingten Muskelzellabbaus in *C. elegans* verwendet [144]. Neben einer Kontrollgruppe, die über 168 h lediglich in S-Medium<sub>K</sub> inkubiert wurde, gab es eine Cisplatin-Gruppe, die über die gesamte Zeit bei 20 °C in Flüssigkultur mit 100 µM Cisplatin inkubiert wurde. Um die Bedingungen mit denen der Pumpratenmessung vergleichbar zu machen, erfolgte ein Medienwechsel nach 48 h sowie nach 96 h und die Auswertung ebenso jeweils nach 48 h, 96 h und 168 h.

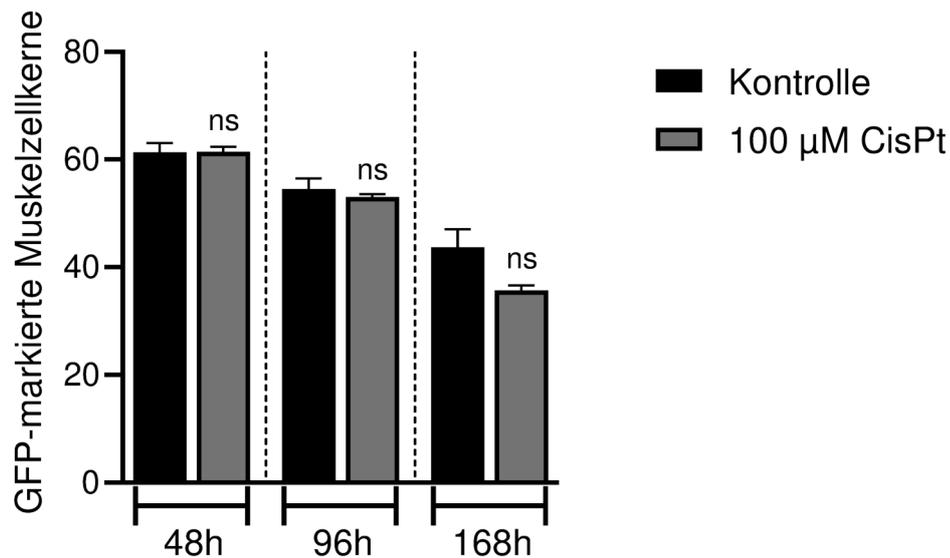


**Abbildung 17: Einfluss von Cisplatin auf die Muskelzellkerne in *C. elegans*.**

Dargestellt sind repräsentative Original-fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (schwarz) sowie die entsprechend invertierten Bilder (weiß) jeweils eines Nematoden des Reporterstamms PD4251 [myo-3p::GFP] für die Kontrollgruppe und die Cisplatin-Gruppe [100  $\mu$ M] zu den Zeitpunkten 48 h und 168 h bei 10-facher Vergrößerung. Mit zunehmendem Alter nimmt die Anzahl der Muskelzellkerne ab. Der Maßstabbalken definiert eine Länge von 100  $\mu$ m [1].

Die Anzahl der Muskelzellkerne in der unbehandelten Kontrollgruppe unterscheidet sich nicht von der Anzahl der Muskelzellkerne in der Cisplatin-Gruppe. Damit zeigt die für die neurotoxische Wirkung von Cisplatin relevante Cisplatin-Dosis keinen Effekt auf die Anzahl der Muskelzellkerne (ns in Abbildung 18). Da die Anzahl der Muskelzellkerne in diesem Modell als Maß für Muskeltoxizität von Cisplatin verwendet wird, kann durch dieses Resultat geschlossen werden, dass Cisplatin in *C. elegans* nicht muskeltoxisch wirkt [1].

Insgesamt lässt sich beobachten, dass die Anzahl der Muskelzellkerne altersbedingt abnimmt: die unbehandelte Kontrolle sinkt von  $61 \pm 2$  Muskelzellkernen nach 48 h, auf  $54 \pm 2$  Muskelzellkerne nach 96 h und auf  $44 \pm 3$  Muskelzellkerne nach 168 h (Mittelwert  $\pm$  SEM).



**Abbildung 18: Cisplatin zeigt in der verwendeten Konzentration keine Verminderung der Muskelzellkerne.**

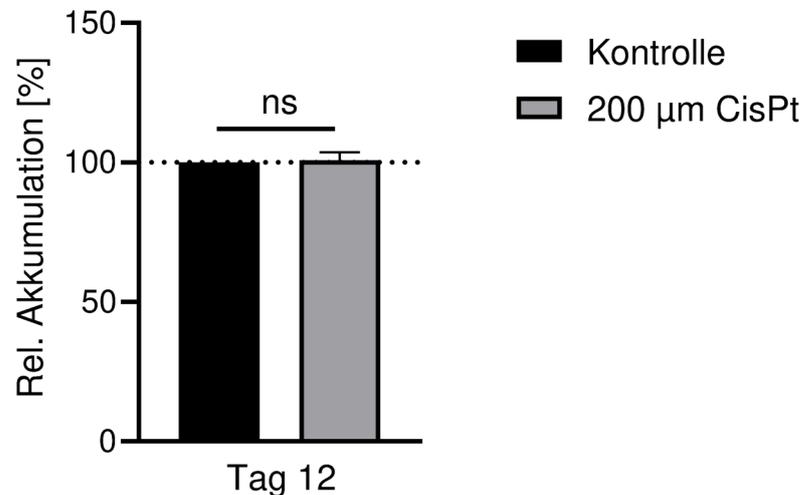
Dargestellt ist die Anzahl der GFP-markierten Muskelzellkerne nach Gabe von Cisplatin [100 µM]. Es wurden Nematoden im L4-Stadium des Reporterstamms PD4251 [myo-3p::GFP] verwendet. Die Versuchsgruppe wurde über 168 h mit Cisplatin [100 µM] behandelt, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub>. Die Aufnahmen zur Auswertung der Muskelzellkerne erfolgten nach 48 h, 96 h und 168 h unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10-facher Vergrößerung und 100 ms Belichtung im FITC-Filter. Die automatisierte Auszählung erfolgte mittels *ImageJ*-Software. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N ≥ 30 Individuen). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte mit Hilfe der One-Way ANOVA (\*p ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle, ns nicht signifikant mit p ≥ 0,05) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni [1].

### 3.8 Cisplatin-Exposition hat keine Auswirkung auf die Akkumulation der Alterspigmente

Das Alterspigment kann als Surrogatmarker für das biologische Alter von *C. elegans* genutzt werden. Durch die Messung dieses autofluoreszenten Alterspigments, welches im Darm des Nematoden akkumuliert [147], sollte untersucht werden, ob die Cisplatin-Exposition den Alterungsprozess in *C. elegans* verändert.

Die Versuchsgruppe wurde mit der zuvor verwendeten Konzentration von 200 µM Cisplatin behandelt, jedoch nun über 12 Tage. Die Kontrollgruppe wurde nicht mit Cisplatin behandelt und über den entsprechenden Zeitraum in S-Medium<sub>K</sub> inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten an Tag 12 im DAPI-Filter und die automatisierte Auswertung im Anschluss mittels *ImageJ*-Software. Eine Behandlung mit 200 µM Cisplatin über 12 Tage verändert die Akkumulation der

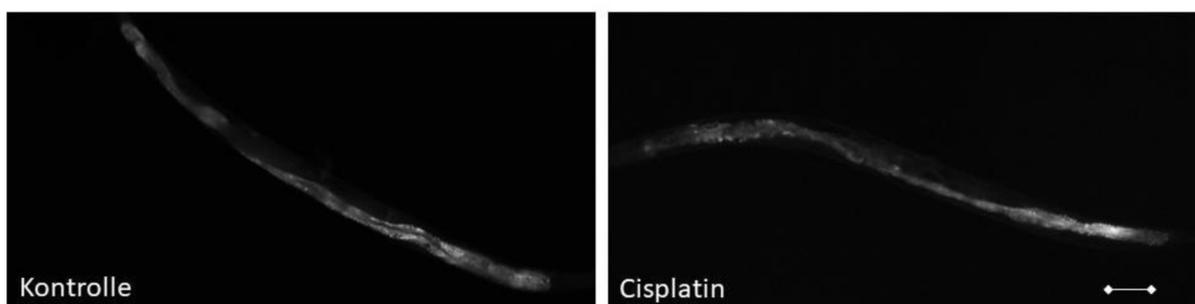
Alterspigmente gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen beträgt am Ende des Untersuchungszeitraums weniger als 1 % (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Die Cisplatin-Exposition verändert die Akkumulation der Alterspigmente nicht.**

Dargestellt ist die Akkumulation der Alterspigmente nach der Gabe von Cisplatin. Für das Experiment wurden wildtypische Nematoden im L4-Stadium verwendet. Die Versuchsgruppe wurde über 12 Tage mit Cisplatin [200 µM] behandelt, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub>. Die Aufnahmen des Alterspigments wurden nach 12 Tagen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10-facher Vergrößerung im DAPI-Filter gemacht. Die Auswertung erfolgte automatisiert mittels *ImageJ*-Software. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3, N ≥ 20 Individuen). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle erfolgte mit Hilfe des T-Tests (ns nicht signifikant mit p ≥ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle).

Somit kann keine vorzeitige Alterung von *C. elegans* durch Cisplatin anhand einer Zunahme des Surrogatmarkers „Alterspigment“ festgestellt werden. Dies lässt sich auch an den repräsentativen Aufnahmen nachvollziehen (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Einfluss von Cisplatin auf die Akkumulation der Alterspigmente in *C. elegans*.**

Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen jeweils eines Nematoden für die beiden in Abbildung 19 gezeigten Gruppen bei 10-facher Vergrößerung. Der Maßstabbalken definiert eine Länge von 100 µm.

## 4 Diskussion

Obwohl verschiedene Erklärungsansätze bestehen, ist der Pathomechanismus der CIPN bisher nicht vollständig verstanden. Eine effektive Prävention oder Therapie dieser, unter anderem von platinierenden Chemotherapeutika verursachten, Nebenwirkung fehlt [1, 33, 40, 159]. Da die Inzidenz von Krebserkrankungen in den nächsten Jahren steigen wird [2] und platinhaltige Chemotherapeutika weiterhin einen wichtigen Baustein der Antitumor-Therapie darstellen, bedarf es weiterer Forschung zur Reduktion der unerwünschten Wirkungen, insbesondere der CIPN [1, 62]. Mit Hilfe des alternativen Modellorganismus *C. elegans* konnten in dieser Arbeit experimentelle Untersuchungen durchgeführt und präklinische Daten gesammelt werden. Die Ergebnisse sollen insbesondere in Hinblick auf die Einschränkungen dieses CIPN-Modells im Folgenden diskutiert werden.

### 4.1 In den verwendeten Konzentrationen wirkt Cisplatin in *C. elegans* primär neurotoxisch

In dieser Arbeit konnte erneut gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cisplatin die pharyngeale Pumprate in *C. elegans* reduziert. Dass neurotoxische Substanzen, wie insbesondere Cisplatin, die pharyngeale Pumprate reduzieren, konnte bereits in anderen Arbeiten festgestellt werden [1, 135, 137-139]. In den Untersuchungen von Wellenberg et al. zeigte Cisplatin dabei im Vergleich zu Carbo- und Oxaliplatin die stärkste Reduktion der pharyngealen Pumprate [1]. Diese Ergebnisse stimmen mit den klinischen Daten überein, dass eine Behandlung mit Cisplatin im Vergleich zu den anderen Platinderivaten die stärkste Neurotoxizität hervorruft [17, 153]. Die pharyngeale Pumprate wurde in dieser Arbeit als Surrogatmarker gewählt, um die neurotoxischen Effekte von Cisplatin zu quantifizieren. Da der Pharynx jedoch eine neuromuskuläre Pumpe ist, könnte der Pumpraten-reduzierende Effekt möglicherweise auch auf einem Einfluss von Cisplatin auf die Muskelzellen beruhen. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der pharyngeale Pumpvorgang als neuromuskuläres System durch eine Cisplatin-induzierte Muskeltoxizität bereits in den Dosisbereichen beeinträchtigt ist, in welchen die Neurotoxizität, also die Reduktion der Pumpfrequenz, gezeigt werden konnte. Um eine potenziell muskeltoxische Wirkung

von Cisplatin auszuschließen, wurde die Anzahl der Muskelzellkerne ausgezählt. Diese kann als Surrogatmarker für Muskeltoxizität genutzt werden [144]. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Cisplatin keinen Einfluss auf die Anzahl der Muskelzellkerne hat [1]. Bestünde eine Funktionseinschränkung der Muskeln durch eine Cisplatin-bedingte Toxizität, wäre eine verminderte Anzahl an Muskelzellkernen zu erwarten [143].

Neben der in dieser Arbeit untersuchten Anzahl der Muskelzellkerne wurde durch Wellenberg et al. zuvor auch die Motilität der Nematoden unter Cisplatin-Exposition untersucht, um eine mögliche Beeinträchtigung der Integrität der Muskulatur durch Cisplatin auszuschließen [1]. Die Körpermuskulatur steht zwar unter der Kontrolle des somatischen Nervensystems und nicht unter der des pharyngealen Nervensystems [102, 119], trotzdem können so Hinweise auf eine mögliche Cisplatin-bedingt verminderte Muskelaktivität gesammelt werden. Jedoch zeigte in der Untersuchung von Wellenberg et al. selbst eine Cisplatin-Konzentration von bis zu 300  $\mu\text{M}$  keine Veränderung der Motilität; dies unterstreicht, dass die Reduktion der pharyngealen Pumprate durch die eingesetzte Cisplatin-Konzentration primär auf einem neurotoxischem Effekt beruht [1]. Zusätzlich ist bekannt, dass die Funktionalität der Nervenzellen wichtiger für die hochfrequente Pumprate ist als die der Muskelzellen. Eine normale Pumpfunktion erfordert eine Modulation durch das Nervensystem, zum Beispiel als Reaktion auf vorhandene Nahrung [152]. Das hier untersuchte hochfrequente Pumpen zur Nahrungsaufnahme ist vor allem abhängig von der neuronalen Übertragung und nicht von der myogenen Grundaktivität [1, 151, 152]. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die Reduktion der Pumprate nach Behandlung mit neurotoxischen Substanzen vor allem auf eine Schädigung der betreffenden Neurone zurückzuführen ist [1, 160, 161] und nicht auf eine Schädigung der Muskelzellen. Zudem konnten Crone et al. zeigen, dass Cisplatin in *C. elegans* besonders in der Kopfregion akkumuliert [150]. Dort liegt die höchste Anzahl an Neuronen und insbesondere die des pharyngealen Nervensystems. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass Cisplatin vor allem in diesen Nervenzellen verstärkt akkumuliert und dementsprechend auch wirkt.

Möglicherweise kritisch zu betrachten ist, dass in der Untersuchung der Muskelzellkerne eine mit 100  $\mu\text{M}$  geringere Cisplatin-Konzentration als in den anderen Versuchen gewählt wurde (zumeist 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin). Die Daten sind trotzdem vergleichbar, da die Inkubationsdauer mit Cisplatin in diesem Versuchsaufbau mit 168 h deutlich länger war als die 48-stündige Cisplatin-Puls-Behandlung in den

anderen Untersuchungen. Hinsichtlich der Methodik ist anzumerken, dass für die automatisierte Auswertung mittels *ImageJ*-Software die Vergrößerung und Belichtung genau so gewählt wurden, dass lediglich die GFP-markierten Muskelzellkerne und nicht die sehr kleinen Mitochondrien als solche gezählt wurden.

Neben einer Muskeltoxizität könnte auch eine vorzeitige Alterung von *C. elegans* durch Cisplatin zu der Reduktion der Pumprate beitragen. Da bekannt ist, dass die pharyngeale Pumprate mit einem höheren biologischen Alter der Nematoden abnimmt [138], sollte eine Cisplatin-bedingte vorzeitige Alterung ausgeschlossen werden. Denn sollte Cisplatin zu einer beschleunigten Alterung in *C. elegans* führen und die Pumprate allein dadurch abnehmen, könnte eine durch die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität bedingte Abnahme der Pumprate imitiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte die oben beschriebene Abnahme der pharyngealen Pumprate im Rahmen der physiologischen Alterung innerhalb der Kontrollpopulation über die drei Messzeitpunkte gezeigt werden. Zusätzlich konnte mit Hilfe des Alterspigments auch gezeigt werden, dass der Alterungsprozess durch Cisplatin nicht beschleunigt wird.

Das biologische Alter des Organismus in seiner Gesamtheit wurde über die Messung des autofluoreszenten Alterspigments bestimmt [147]. Die Nematoden wurden durchgängig über 12 Tage mit 200  $\mu$ M Cisplatin behandelt, um den Effekt von Cisplatin zu maximieren. Trotzdem war kein Unterschied in der Akkumulation des Alterspigments gegenüber der unbehandelten Kontrolle erkennbar. Deshalb kann geschlussfolgert werden, dass Cisplatin *C. elegans* nicht vorzeitig altern lässt und die Pumprate nicht über diesen Mechanismus verringert wird.

Dennoch kann bei den längeren Inkubationszeiten nicht ausgeschlossen werden, dass der Cisplatin-Effekt durch die physiologische Alterung begünstigt wird. Da die Pumprate durch die Cisplatin Behandlung jedoch bereits nach 48 h stark beeinträchtigt ist, ist ein solcher Effekt in diesen Untersuchungen vernachlässigbar. Kritisch anzumerken ist außerdem, dass lediglich die vorzeitige Alterung des gesamten Organismus *C. elegans* betrachtet wurde. Eine differenzierte Betrachtung der Alterung des Nervensystems von *C. elegans* konnte nicht erfolgen. Diese Unterscheidung ist jedoch wichtig, da langfristige Folgen auf das Nervensystem nach einer Cisplatin-Therapie im Sinne einer kognitiven Beeinträchtigung bekannt sind, insbesondere wenn die Therapie im Kindes- oder Jugendalter erfolgt ist [162]. Solche Einschränkungen können sich wie eine vorzeitige Alterung des Nervensystems äußern und sich durch eine verminderte Merkfähigkeit oder Aufmerksamkeit zeigen [162]. Für die gezielte

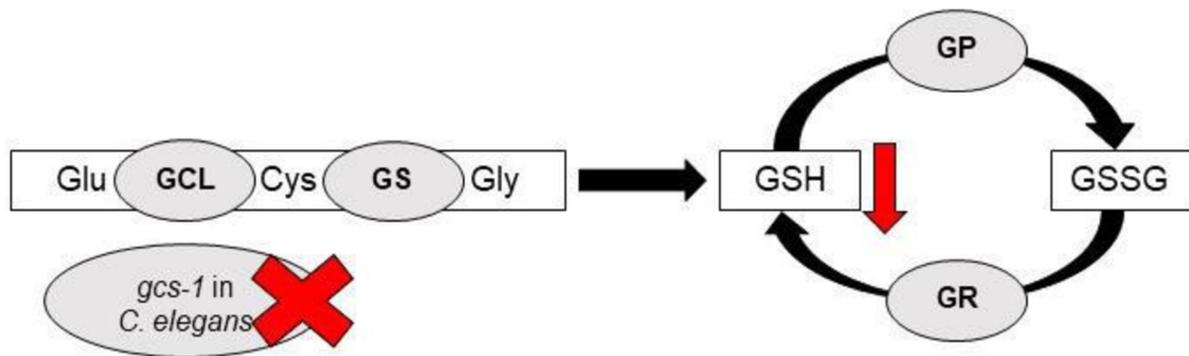
Untersuchung dieser Einschränkungen wurden bereits Rattenmodelle verwendet [162]. Mit deren Hilfe konnte sogar gezeigt werden, dass N-Acetylcystein die Cisplatin-bedingte kognitive Beeinträchtigung abmildern kann [163].

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Reduktion der pharyngealen Pumprate durch Cisplatin primär auf einer neurotoxischen Wirkung beruht und eine mögliche Muskeltoxizität vernachlässigbar ist [1]. Auch eine vorzeitige Alterung spielt in dem hier verwendeten Versuchsaufbau keine Rolle. Durch Wellenberg et al. konnte zuvor außerdem gezeigt werden, dass Cisplatin nicht als Repellent in *C. elegans* wirkt [1]. Die Anwesenheit eines Repellents würde in *C. elegans* ein Vermeidungsverhalten bewirken, wodurch die Pumprate vermindert würde. Insgesamt kann demnach angenommen werden, dass die Reduktion der Pumprate in *C. elegans* durch die Behandlung mit Cisplatin primär auf einer neurotoxischen Wirkung beruht. In Zusammenschau dieser Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass die Messung der pharyngealen Pumprate ein robuster Endpunkt für Neurotoxizität ist und sich der Modellorganismus *C. elegans* damit auch für die Testung von neuroprotektiven Kandidatensubstanzen eignen kann [1].

## 4.2 Eine verminderte Funktion des Glutathion-Systems kann eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans* aggravieren

Für die genauere Untersuchung des Wirkmechanismus der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität sollte eine Modulation des Glutathion-Systems in *C. elegans* genutzt werden. Für die Manipulation des Glutathion-Systems wurde in der vorliegenden Arbeit die Genfunktion der *gcs-1*, deren humanes Homolog die Glutamat-Cystein-Ligase ist, mittels RNA-Interferenz (RNAi) herunterreguliert [1]. Glutathion selbst ist ein Tripeptid, zusammengesetzt aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Die Glutamat-Cystein-Ligase verbindet Glutaminsäure mit Cystein, was für den durchgeführten *Knockdown* relevant ist (Abbildung 21). GSH beschreibt Glutathion in seiner reduzierten Form, GSSG hingegen ein Glutathion-Disulfid, das durch die Oxidation von GSH über die Glutathion-Peroxidase entsteht. GSH hat die Funktion eines Redox-Puffers [164], da es eine freie Thiolgruppe besitzt und so Elektronen auf ROS übertragen kann. Das Verhältnis aus GSH/GSSG bestimmt den Redoxstatus

einer Zelle. Reagiert GSH beispielsweise mit ROS oder Xenobiotika, wird es aus dem vorhandenen GSH-Pool entfernt und das GSH/GSSG Verhältnis in Richtung GSSG verschoben [165]. Es ist davon auszugehen, dass durch den *Knockdown* von *gcs-1* weniger GSH vorhanden ist und damit insgesamt eine geringere antioxidative Kapazität besteht [1]. Auf diese Weise sollte in der vorliegenden Arbeit eine GSH-Depletion modelliert werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Schematische Übersicht des Glutathion-Systems und des *Knockdowns* von *gcs-1* mittels RNAi in *C. elegans*.**

Dargestellt wird das Glutathion-System als vereinfachtes Schema. Das Tripeptid Glutathion besteht aus den Aminosäuren Glutaminsäure (Glu), Cystein (Cys) und Glycin (Gly). Dabei ist im Menschen die Glutamat-Cystein-Ligase (GCL) für die Verbindung von Glutaminsäure mit Cystein verantwortlich, in *C. elegans* ist das Homolog die *gcs-1* (Synthetase). Die Glutathionsynthase (GS) fügt für die Entstehung von GSH noch Glycin an. GSH ist Glutathion in seiner reduzierten Form, GSSG steht für ein Glutathion-Disulfid, das durch die Oxidation von GSH über die Glutathion-Peroxidase (GP) entsteht. Aus einem GSSG-Dimer können unter Energieverbrauch durch die Glutathionreduktase (GR) wieder zwei GSH hergestellt werden. Durch die RNAi-vermittelte Interferenz wurde die Genfunktion von *gcs-1* herunterreguliert (*gcs-1 (RNAi)* in rot gekennzeichnet). Es kann angenommen werden, dass daher weniger GSH zur Verfügung steht und so eine GSH-Depletion modelliert werden kann [1].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von *gcs-1* mittels RNAi zu einer Verringerung der pharyngealen Pumprate in gleichem Ausmaß wie die Gabe von Cisplatin führt. Somit scheint das Glutathion-System in *C. elegans* wichtig für die neuronale Integrität zu sein und kann bei einer Dysfunktion zu einer Beeinträchtigung des pharyngealen Nervensystems führen [1]. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass diese Schädigung durch die zusätzliche Gabe von Cisplatin verstärkt wird; die Gabe von Cisplatin und der *gcs-1 Knockdown* wirken additiv vermindern auf die Pumprate. Bei dieser Kombination ist die Pumprate somit am stärksten im Vergleich zu der Kontrollgruppe reduziert. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass eine verminderte Funktion des Glutathion-Systems eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität aggravieren kann [1].

Dass eine GSH-Depletion eine mögliche Ursache für die Cisplatin-induzierte Toxizität sein könnte, wurde bereits in anderen Arbeiten vermutet und insbesondere im Rahmen der Entstehung einer Cisplatin-bedingten Ototoxizität diskutiert [153, 166]. Die Depletion von GSH ist explizit nur einer von mehreren potenziellen Entstehungsmechanismen der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität, der in dieser Arbeit jedoch genauer beleuchtet werden sollte. Ebenso wichtig, beispielsweise auch in Zusammenhang mit der oben genannten Cisplatin-bedingten Ototoxizität, ist die Bildung und Akkumulation von DNA-Addukten [68]. Neben der Schädigung der nukleären DNA vor allem durch die Bildung von Intrastrangquervernetzungen wird auch die mitochondriale DNA durch Cisplatin geschädigt, was zu einer Erhöhung der ROS-Level führen kann [77]. Die Auslösung von oxidativem Stress gilt als einer der wichtigsten bekannten Mechanismen für die allgemeine Toxizität von Cisplatin und wird darüber hinaus speziell auch für die neuronale Schädigung mitverantwortlich gemacht [1, 75, 77]. Die verschiedenen möglichen Pathomechanismen stehen in engem Zusammenhang und können sich gegenseitig verstärken, weshalb die Pathogenese der CIPN als wahrscheinlich multifaktoriell zu beschreiben ist. So sehen Marullo et al. die „mitochondrial-abhängige ROS-Reaktion“ in ihrem Hefe-Modellsystem als Verstärker des durch nukleäre DNA-Schädigung hervorgerufenen zytotoxischen Effektes [74]. Durch die Dysfunktion der Mitochondrien kommt es zu einem chronischen Energiedefizit [74], was zu einer Degeneration von primär afferenten Neuronen führen kann [75]. Daneben konnten Xiao et al. in einem Rattenmodell zeigen, dass eine zusätzliche Schädigung der Mitochondrien auch eine Oxaliplatin-induzierte periphere Neuropathie verstärkt [76]. Ebenso konnte bereits in *C. elegans* nachgewiesen werden, dass ein mtDNA-Schaden zu einer Degeneration dopaminergener Neurone führt [167]. Die zelluläre Schädigung durch oxidativen Stress erfordert einen Ausgleich der reaktiven Sauerstoffspezies und steht damit in direktem Zusammenhang mit dem Glutathion-System als ein möglicher Detoxifikations-Mechanismus [29]. An dieser Stelle ist noch einmal anzumerken, dass die Entstehung von oxidativem Stress explizit nur ein möglicher Mechanismus von verschiedenen potenziellen Wegen ist, über die Cisplatin zu einer Neurotoxizität beitragen kann. ROS-unabhängige Effekte wie die DNA-Schädigung durch Bildung von Intrastrangquervernetzungen sind mindestens genauso entscheidend [29, 75], sollen in diesem Abschnitt jedoch nicht vordringlich Gegenstand der Diskussion sein.

Ebenso ist einschränkend hervorzuheben, dass das Glutathion-System nur eines von mehreren Detoxifikations-Systemen ist. Neben diesem gibt es unter physiologischen Bedingungen auch weitere Mechanismen, die oxidativen Stress reduzieren können. Lei et al. teilen diese Abwehrmechanismen in drei verschiedene Schichten ein [168]. Dabei bilden Antioxidantien wie Glutathion aber auch Vitamin C oder Vitamin E die „erste Verteidigungslinie“ [168]. In der durch Lei et al. beschriebenen mittleren Ebene werden reaktive Sauerstoffspezies durch Superoxiddismutasen (SOD) und Katalasen (CAT) zu weniger reaktiven Molekülen detoxifiziert [155, 168]. Die „dritte Schicht“ stellen verschiedene Reparatur-Enzyme dar [168]. Der Fokus soll in dieser Arbeit jedoch auf der oben beschriebenen „ersten Schicht“ [168], also auf verschiedenen Antioxidantien und vor allem dem Glutathion-System, liegen.

Das mitochondriale Glutathion (GSH) ist laut Dasari und Tchounwou essenziell für die korrekte Funktion der Mitochondrien [29]. Die beiden Autoren beschreiben, dass die Cisplatin-induzierte Toxizität eng mit einer GSH-Depletion verbunden ist, wodurch oxidativer Stress gefördert wird [29]. Glutathion (GSH) und dessen Depletion, so wie sie in dieser Arbeit modelliert wurde, stehen somit möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der Wirkung von Cisplatin. So konnten Wellenberg et al. bereits zeigen, dass die Gabe von Cisplatin in *C. elegans* zu einer tendenziellen Reduktion der GSH-Konzentration führt: die Reduktion betrug bei Cisplatin-Konzentrationen zwischen 50  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$  bis zu 30 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe [1]. Trotz fehlender Signifikanz der Ergebnisse lässt dies die Überlegung zu, dass möglicherweise durch die direkte Detoxifikation von Cisplatin durch GSH auch weniger GSH für die ROS-Elimination zur Verfügung steht und auf diese Weise zu der Entstehung einer CIPN beitragen könnte [1]. Durch Wellenberg et al. konnte außerdem gezeigt werden, dass die Gabe von Cisplatin in *C. elegans* zu einer allgemeinen Sensitivierung gegenüber oxidativem Stress führen kann [1]. Dass die Gabe von Cisplatin jedoch zu einer direkten Produktion von ROS führt [72], konnten Wellenberg et al. für *C. elegans* nicht bestätigen: auch höhere Cisplatin-Konzentrationen von bis zu 500  $\mu\text{M}$  produzierten in *C. elegans* keine nennenswerten Mengen an ROS [1]. Diese Resultate führen zu der Annahme, dass die Neurotoxizität durch Cisplatin zumindest in *C. elegans* nicht primär ROS-vermittelt sein muss.

GSH hat nicht nur eine wichtige Funktion bei der Elimination von ROS, sondern auch bei der Entgiftung von Schwermetallen [1, 155, 156]. Durch die hohe Affinität der Thiolgruppe von GSH zu Schwermetallen [156] könnte Cisplatin wie zuvor beschrieben möglicherweise durch die Bindung von GSH inaktiviert werden [1]. Bereits in den neunziger Jahren konnte gezeigt werden, dass die Cisplatin-Konzentration in den DRGs von Ratten durch GSH-Gabe verringert wird [82]. Umgekehrt könnte die Menge an GSH möglicherweise durch die Gabe von Cisplatin auf Grund einer direkten Reaktion vermindert werden. Eine solche Verringerung der Menge an Glutathion bedeutet möglicherweise auch eine Reduktion der endogenen antioxidativen Kapazität [1], da Glutathion ein wichtiger Bestandteil der antioxidativen Schutzmechanismen ist [168]. Diese potenzielle Reduktion der endogenen antioxidativen Kapazität könnte besonders ungünstig für das periphere Nervensystem sein. Denn für humane periphere Nerven ist bekannt, dass sie auf Grund ihrer schwachen antioxidativen Abwehrmechanismen [169] sehr anfällig für oxidativen Stress sind [77]. Die externe Zufuhr von GSH wird daher als vielversprechender Ansatzpunkt bei der Prävention einer CIPN bewertet [62]. Es existieren klinische Studien, die Glutathion (GSH) eine neuroprotektive Wirkung zusprechen [79, 80] und in denen die Fähigkeit zur Neuroprotektion nach Platin-Gabe bereits gezeigt werden konnte [77]. Bei einer Cisplatin-Therapie von Patientinnen mit Ovarialkrebs konnten Smyth et al. schon 1997 zeigen, dass bei Glutathion-Behandlung eine tendenziell verminderte Neurotoxizität und eine insgesamt verbesserte Lebensqualität bestand [80]. Ebenso ergab sich laut Cascinu et al. nach Cisplatin-Therapie eine verbesserte Nervenleitgeschwindigkeit bei vorheriger GSH-Infusion [79]. Gleiches gilt für eine Chemotherapie mit Oxaliplatin und eine vorherige GSH-Gabe [170].

Die Ergebnisse dieser Arbeit passen zu den Resultaten der oben genannten Studien. Wie gezeigt werden konnte, wird die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans* durch eine verminderte Funktion des Glutathion-Systems und die damit angenommene Verminderung der endogenen antioxidativen Kapazität verstärkt: besonders deutlich ausgeprägt war die Neurotoxizität, wenn der *Knockdown* von *gcs-1* mit der Gabe von Cisplatin kombiniert wurde [1]. Eine mögliche Erklärung stellt eine additive Wirkung zum einen der endogenen Verringerung der antioxidativen Kapazität durch den *Knockdown* von *gcs-1* und zum anderen der zusätzlichen GSH-Depletion durch die „exogene“ Cisplatin-Gabe dar.

Durch die hier vorliegenden Resultate kann zusammenfassend keine abschließende Aussage über den Pathomechanismus der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität getroffen werden. Zwar unterstützen die Resultate die Vermutung, dass die Neurotoxizität von Cisplatin mitunter auf der Depletion von Glutathion beruht [1], jedoch ist die Entstehung der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität wahrscheinlich multifaktoriell und kann gleichzeitig auch durch viele andere Mechanismen begünstigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein funktionierendes Glutathion-System zumindest in *C. elegans* eine schützende Funktion auf das Nervensystem gegenüber den neurotoxischen Effekten von Cisplatin hat und damit möglicherweise ein entscheidender Faktor und erster Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen sein kann [1]. Daher besteht dringend weiterer Forschungsbedarf.

### 4.3 Die antioxidative Kapazität der Testsubstanzen ist nicht entscheidend für die Abmilderung der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität

Durch die zuvor beschriebenen Ergebnisse des *Knockdowns* von *gcs-1* kann angenommen werden, dass eine Reduktion der endogenen antioxidativen Kapazität eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans* möglicherweise begünstigen kann [1]. Daher kann auch angenommen werden, dass sich eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität wiederum positiv bzw. protektiv auf die pharyngeale Pumprate nach Cisplatin-Gabe in *C. elegans* auswirken könnte. Da Antioxidantien eine CIPN also möglicherweise abmildern können [77], sollten im Rahmen dieser Hypothese verschiedene antioxidativ wirksame Substanzen auf die Fähigkeit der Neuroprotektion in *C. elegans* hin untersucht werden. Die Auswahl der Testsubstanzen richtete sich vor allem nach der Verwendung in klinischen Studien (N-Acetylcystein und Amifostin [88]) oder Studien an Säugetiermodellen (Acetylsalicylsäure [157, 158]). Um ihr antioxidatives Potenzial zu bestimmen, wurden die verschiedenen Substanzen in der vorliegenden Arbeit auf ihre antioxidative Kapazität getestet. Eine Orientierung über die Höhe der antioxidativen Kapazität *in vitro* bietet dabei der TEAC-Test. In der vorliegenden Arbeit konnte die höchste antioxidative Kapazität für die Substanzen Vitamin C und Koffein gemessen werden. Außerdem verfügen N-Acetylcystein (NAC) und der aktive Metabolit von Amifostin,

WR 1065 über ein antioxidatives Potenzial [1]. Acetylsalicylsäure (ASS) und Glukose sind nicht antioxidativ wirksam. Da die Entstehung von oxidativem Stress jedoch nur ein möglicher Mechanismus ist, der zu einer Cisplatin-induzierten Neurotoxizität beitragen kann, sollten neben den oben genannten antioxidativ wirksamen Substanzen explizit auch Substanzen auf eine mögliche neuroprotektive Wirkung hin getestet werden, die im *TEAC*-Test nicht antioxidativ wirksam waren.

Nach der Bestimmung der antioxidativen Kapazität der einzelnen Substanzen erfolgte die Testung hinsichtlich einer neuroprotektiven Wirksamkeit nach Cisplatin-Exposition. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Neuroprotektion im Sinne einer Verbesserung der Pumprate nach Cisplatin-Gabe durch die Nachbehandlung mit NAC und WR 1065 möglich ist [1]. Ebenso zeigte eine Post-Inkubation mit ASS eine Verbesserung der Pumprate nach Cisplatin-Behandlung gegenüber der Post-Inkubation in Kontrollmedium. Die Pumpraten aller Gruppen, die einer Nachbehandlung mit diesen drei Testsubstanzen unterzogen wurden, unterscheiden sich zu beiden Messzeitpunkten nicht signifikant von der Pumprate der gänzlich unbehandelten Kontrolle. Der neurotoxische Effekt von Cisplatin kann in *C. elegans* somit durch die Nachbehandlung mit den drei Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS formal revertiert werden. Betrachtet man die absoluten Zahlenwerte nach 168 h, steigt die Höhe der Pumprate der WR 1065-Gruppe und die der ASS-Gruppe sogar über die Höhe der Pumprate der unbehandelten Kontrolle. Dies ist statistisch jedoch nicht signifikant. Vitamin C, Koffein und Glukose zeigen hingegen zu keinem Messzeitpunkt einen (protektiven) Effekt auf die Pumprate.

Im Folgenden sollen daher die einzelnen Kandidatensubstanzen, vor allem die mit einem neuroprotektiven Effekt, genauer betrachtet und ein möglicher (neuroprotektiver) Wirkmechanismus diskutiert werden.

Die Substanz N-Acetylcystein (NAC), die im klinischen Alltag als Hustenlöser eingesetzt wird (ACC®), dient als Vorstufe von Cystein für die GSH-Synthese und besitzt eine Thiolgruppe [171]. NAC kann die Depletion von GSH verhindern und als Antioxidans selbst reaktive Sauerstoffverbindungen eliminieren [172]. Neben seiner Funktion als Expektorans wird NAC daher auch regelhaft als Antidot bei Paracetamol-Vergiftungen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass das verwendete NAC eine gute antioxidative Kapazität hat und eine Post-Inkubation mit NAC eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität abmildern kann [1].

Als weitere Kandidatensubstanz wurde Amifostin bzw. dessen aktiver Metabolit WR 1065 ausgewählt, ein zytoprotektiv wirksamer Aminothioalkohol, der initial als radioprotektive Substanz entwickelt wurde [173]. Die aktivierte Form von Amifostin WR 1065 verfügt über eine Thiolgruppe [1, 174, 175]. Amifostin ist bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region in der Lage, Nebenwirkungen der Bestrahlung wie eine Mukositis oder eine Dysphagie zu reduzieren, ohne dabei Tumorzellen zu schützen [176]. Auch für den Einsatz von Amifostin zur Reduktion einer durch Cisplatin verursachten Nephrotoxizität konnte ein nephroprotektiver Effekt ohne gleichzeitige Verminderung der Antitumor-Wirkung gezeigt werden [177]. Eine mögliche Erklärung für diese Eigenschaft ist die Aktivierung von Amifostin zu dem aktiven Thiol-Metabolit WR 1065. Diese erfolgt durch membranständige alkalische Phosphatasen [175, 178], welche in Tumorzellen geringer vorhanden sind als in Normalgewebszellen. In Hinblick auf die Protektion gegenüber einer Cisplatin-induzierten Neurotoxizität konnte bereits *in vitro* ein neuroprotektives Potenzial von Amifostin nach Cisplatin-Gabe gezeigt werden [87]. Für die Eignung als mögliche (neuro-)protektive Kandidatensubstanz spricht besonders, dass Amifostin normales Gewebe besser schützen kann als Tumorgewebe [173]. Klinische Studien zur Wirksamkeit von Amifostin blieben bisher jedoch ohne eindeutiges Ergebnis bezüglich einer Neuroprotektion, da häufig nur geringe Patientenzahlen und keine quantitativen Endpunkte verwendet wurden [88]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass WR 1065 im *TEAC*-Test eine ähnliche antioxidative Kapazität wie NAC hat und ebenso in der Lage ist, den neurotoxischen Effekt von Cisplatin nachträglich zu revertieren [1].

Acetylsalicylsäure (ASS), welches unter dem Markennamen Aspirin® der Bayer AG bekannt ist, ist ein Cyclooxygenasehemmer und gehört zu der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). Im klinischen Alltag hat ASS verschiedene Anwendungsgebiete. Zum einen wird es wegen seiner analgetischen, antiphlogistischen und antipyretischen Wirkung als Schmerzmittel eingesetzt (zumeist in Dosierungen von 500 bis 1000 mg). Zum anderen wird ASS in einer Dosierung von 100 mg pro Tag zur Thrombozytenaggregationshemmung (TAH) eingesetzt und ist damit zur Primär- und Sekundärprophylaxe verschiedener (kardio-)vaskulärer Erkrankungen indiziert. Neben dem Myokardinfarkt zählt der ischämische Schlaganfall zu den wichtigsten Anwendungsgebieten. In Hinblick auf ein (neuro-)protektives Potenzial wurden durch Cui et al. und durch De Cristóbal et al. für ASS bereits in Rattenmodellen neuroprotektive Effekte beschrieben [157, 158]. Auch wenn diese Autoren in ihren Untersuchungen eine mechanische bzw. ischämische neuronale

Schädigung betrachten und nicht eine durch Cisplatin-induzierte Schädigung, ist ASS auf Grund des häufigen klinischen Gebrauchs als Kandidatensubstanz interessant [157, 158]. Die neuroprotektive Wirkung von ASS bei einem ischämischen Schlaganfall in Ratten schreiben De Cristóbal et al. neben der TAH auch einer Hemmung der Glutamatfreisetzung zu [179]. Diese Beobachtung gilt explizit nur für eine ischämische neuronale Schädigung. Eine Neuroprotektion durch ASS in Zusammenhang mit einer Cisplatin-induzierten Neurotoxizität wurde bisher nicht beschrieben. Trotzdem sollte ASS als Kandidatensubstanz getestet werden, da bereits eine verbesserte axonale Regeneration gezeigt werden konnte, die auch für die CIPN interessant sein könnte [157]. Auch wenn ASS kein antioxidatives Potenzial im *TEAC*-Test aufweist, wurde es auf Grundlage der oben beschriebenen Wirkungen als Kandidatensubstanz verwendet. Nach Cisplatin-Gabe kann durch eine Nachbehandlung mit ASS ebenso eine Neuroprotektion in *C. elegans* erreicht werden.

Bei Betrachtung der Resultate des *TEAC*-Tests und der Nachbehandlung mit diesen drei Testsubstanzen fällt auf, dass eine Neuroprotektion im Sinne einer Verbesserung der Pumprate nach Cisplatin-Gabe unabhängig von der antioxidativen Kapazität der eingesetzten Substanzen ist. Die antioxidative Kapazität kann nicht (allein) entscheidend für die Fähigkeit der Neuroprotektion sein, da ASS kein antioxidatives Potenzial zeigt und trotzdem eine Verbesserung der Pumprate und damit eine Verringerung der neuronalen Schädigung erwirken kann. Dieses Ergebnis wiederum könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass die Entstehung von ROS nicht der primäre Grund für die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität (in *C. elegans*) ist. Dafür spricht auch das Ergebnis von Wellenberg et al., dass Cisplatin in *C. elegans* keine nennenswerten Mengen an ROS produziert [1]. Eine mögliche Erklärung für die neuroprotektive Wirkung von NAC und WR 1065 könnte hingegen ihre Funktion als Thiol-Donor sein [1, 172, 174, 180]. Eine direkte Wirkung dieser beiden Substanzen auf das Glutathion-System kann angenommen werden: es könnte durch die Supplementierung mit den SH-Gruppen von NAC und WR 1065 eine GSH-Depletion vermieden werden, wie es für NAC bereits beschrieben wird [1, 171, 172]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein *Knockdown* von *gcs-1* in *C. elegans* und damit eine verminderte Funktion des Glutathion-Systems eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität verstärkt [1]. Umgekehrt könnte die Fähigkeit von NAC und WR 1065, „reduziertes Glutathion wieder aufzufüllen“ [172], eine Erklärung für die neuroprotektive Wirkung nach Cisplatin-Gabe sein [1]. Auf diese Weise könnte der für die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität wahrscheinlich mitverantwortlichen GSH-Verminderung (und damit angenommenen

Verarmung der endogenen antioxidativen Kapazität) entgegengewirkt werden. Ein solcher Mechanismus ist für ASS nicht bekannt. Der Wirkmechanismus von ASS als neuroprotektive Substanz ist weiterhin unklar. In Bezug auf die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität bedarf es weiterer Untersuchungen, da potenzielle Erklärungsansätze für die neuroprotektive Eigenschaft von ASS sich vor allem auf den Ischämie-induzierten neuronalen Schaden beziehen [158, 179].

Als weiterer Aspekt ist zu diskutieren, dass eine direkte Bindung des intrazellulären Cisplatins durch die im Folgenden genannten Substanzen zu einer Neuroprotektion führen könnte [1]. Für GSH ist in dieser Hinsicht die Fähigkeit zur Detoxifikation von Schwermetallen bekannt [155, 156]. Für NAC bestehen Fallberichte über effektive Chelat-bildende Eigenschaften im Menschen bei Metallvergiftungen [181], außerdem erhält NAC bekanntermaßen das GSH-Angebot aufrecht [172]. Für WR 1065 ist eine direkte Bindung von Cisplatin bereits bekannt [175, 182]. Auf diese Weise könnte GSH, aber auch NAC und WR 1065 dazu beitragen, Cisplatin zu inaktivieren [1]. Somit könnte ein möglicher Grund für die Neuroprotektion sein, dass weniger Cisplatin vorhanden ist, weil es durch die Kandidatensubstanzen gebunden werden könnte. So beschreiben Hu et al., dass Glutathion „durch seine hohe Affinität zu Schwermetallen die Anhäufung von Platin-Addukten in Spinalganglien“ verhindert [62]. Kritisch zu betrachten ist hierbei also, dass die Cisplatin-Konzentration vermindert werden könnte, so wie es in den DRGs von Ratten nach GSH-Gabe gezeigt werden konnte [82]. Damit könnte auch eine ausreichende apoptotische Wirkung von Cisplatin in Frage gestellt werden, sofern es durch die GSH-Gabe zu einer systemischen Senkung der Cisplatin-Konzentration käme. Um daher auszuschließen, dass durch die Gabe der als neuroprotektiv identifizierten Testsubstanzen der Cisplatin-Gehalt reduziert wird, wurde dieser nach der Post-Inkubation mit NAC, WR 1065 und ASS gemessen. Ziel dieser Untersuchung war es, eine mögliche Reduktion der insgesamt vorhandenen Menge an Cisplatin durch die Gabe der neuroprotektiven Substanzen zu erkennen und so als mögliche Ursache für die Neuroprotektion auszuschließen. Über die Quantifizierung des Platin-Gesamtgehalts durch die massenspektrometrische Methode ICP-MS konnte die Menge an Cisplatin in den verschiedenen Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Wellenberg et al. konnten bereits zeigen, dass freies Cisplatin dosisabhängig von *C. elegans* aufgenommen und in dem Nematoden verteilt wird [1, 150]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Nachbehandlung mit den neuroprotektiven Substanzen keinen signifikanten Effekt auf den Cisplatin-Gehalt in den Nematoden hat [1]. Trotzdem ist die Platin-

Konzentration in den Gruppen, die einer Post-Inkubation mit einer protektiven Substanz unterzogen wurden, im Vergleich zu der Gruppe mit einer Post-Inkubation in dem Kontrollmedium tendenziell vermindert. Als Ursache hierfür kann eine schnellere Elimination von Cisplatin im Sinne einer Detoxifikation durch die Kandidatensubstanzen diskutiert werden, da NAC und Amifostin bzw. WR 1065 eine Funktion als Thiol-Donor haben [1]. Der Platin-Gehalt der drei Testsubstanz-Gruppen ist aber weiterhin tendenziell höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe (ebenso nicht statistisch signifikant). Das Ergebnis spricht gegen eine beschleunigte Elimination von Cisplatin durch Gabe der Kandidatensubstanzen als Ursache für die Neuroprotektion, da sich vor allem kein signifikanter Unterschied des Platin-Gehalts zwischen der Post-Inkubation in Kontrollmedium zu der Post-Inkubation mit den Kandidatensubstanzen feststellen lässt [1]. Allerdings ist kritisch anzumerken, dass in dieser Untersuchung in *C. elegans* kein gewebsspezifischer Nachweis des Platin-Gehalts erfolgt ist. In Säugetiermodellen könnte eine gezielte Isolierung des gewünschten Gewebes und so die Ermittlung des Platin-Gehalts in beispielsweise ausschließlich Nerven- oder Tumorgewebe erfolgen.

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass der Cisplatin-Gehalt durch die Nachbehandlung mit den neuroprotektiven Testsubstanzen nicht signifikant verringert wird, erlaubt dies keine Aussage über die Effektivität der DNA-Adduktbildung durch Cisplatin. Ein weiterer möglicher Mechanismus der Neuroprotektion könnte sein, dass durch die Post-Inkubation mit den Testsubstanzen weniger Cisplatin-induzierte DNA-Addukte gebildet werden. Die Bildung von 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen ist hauptsächlich für die Zytotoxizität aber teilweise auch für die Neurotoxizität von Cisplatin verantwortlich [17, 26]. Um die Addukt-bildende Wirkung von Cisplatin zu überprüfen, kann die Anzahl der 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen mittels Southwestern-Blot gemessen werden [1, 69, 183, 184]. Durch Wellenberg et al. konnte bereits gezeigt werden, dass Cisplatin in wildtypischen *C. elegans* dosisabhängig DNA-Addukte bildet [1]. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine Post-Inkubation mit den Kandidatensubstanzen die Bildung von DNA-Addukten durch Cisplatin einschränkt (siehe Anhang, Abbildung 22). Um eine Vergleichbarkeit mit der Messung der pharyngealen Pumprate und des Platin-Gesamtgehalts zu gewährleisten, wurden die gleichen Messzeitpunkte (48 h und 96 h) und Konzentrationen (sowohl von Cisplatin als auch der Kandidatensubstanzen) gewählt. Zu dem Messzeitpunkt 48 h zeigt die Cisplatin-Gruppe eine im Mittel höhere Anzahl an 1,2-GpG-

Intrastrangquervernetzungen als die unbehandelte Kontrolle, dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant. Nach 96 h zeigt sich für die Post-Inkubation mit den neuroprotektiven Kandidatensubstanzen NAC, WR 1065 und ASS keine Veränderung der Menge an 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen weder gegenüber der Gruppe mit der Post-Inkubation in dem Kontrollmedium noch gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Anhang, Abbildung 22). Es lässt sich somit durch diese Untersuchung keine Aussage treffen, ob die Post-Inkubation mit den Kandidatensubstanzen die DNA-Schädigung abmildert, da nach 96 h in keiner der Versuchsgruppen Cisplatin-Addukte nachweisbar sind. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis von DNA-Addukten in den Cisplatin-Gruppen nach 96 h könnte die vorherige 48-stündige Regenerationszeit darstellen. Durch Wellenberg et al. konnte zuvor bereits für geringere Platin-Konzentrationen gezeigt werden, dass eine 24-stündige Regeneration zu einer tendenziellen Abnahme der Menge an Platin-Addukten führen kann [1]. Auch eine unspezifische Bindung der Antikörper und damit die Erzeugung eines fehlerhaften Signals ist denkbar und in diesem Fall wahrscheinlich. Eine Wiederholung der gesamten Versuchsreihe ist auf Grund der hohen Schwankungsbreite zwischen den drei unabhängigen Experimenten unbedingt notwendig (Anhang, Abbildung 22). Somit kann keine eindeutige Aussage über die Effektivität der Cisplatin-induzierten DNA-Adduktbildung nach Post-Inkubation mit den neuroprotektiven Testsubstanzen getroffen werden.

Unter physiologischen Bedingungen können die so entstandenen DNA-Schäden durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) erkannt und repariert werden. Für 1,2-Intrastrangquervernetzungen funktioniert dies jedoch weniger effizient [17] und auch für differenzierte neuronale Zellen wird angenommen, dass dieser Reparaturmechanismus abgeschwächt ist [71]. Dass dies zu einer neuronalen Schädigung durch Platinderivate beitragen kann, konnten Dzagnidze et al. zeigen: ist die NER nicht aktiv, akkumulieren deutlich mehr Platin-Addukte in den neuronalen Zellen, weshalb die betroffenen Mäuse früher neurologische Veränderungen in der elektrophysiologischen Testung zeigen [69]. Auch die Fähigkeit zur Reparatur von mitochondrialen DNA-Schäden kann allgemein in neuronalen Zellen reduziert sein, Astrozyten sind hiervon ausgenommen [185]. Dieser Schädigungsmechanismus und damit eine Dysfunktion der Mitochondrien ist für die Entstehung einer CIPN entscheidend [75]. Insbesondere das für Cisplatin typische „Coasting“-Phänomen wird auf die hohe Cisplatin-Akkumulation in den Neuronen bei gleichzeitig fehlender NER in deren Mitochondrien und damit auf die mitochondriale Schädigung

zurückgeführt [78]. Auch wenn die Cisplatin-Therapie bei Auftreten von neuropathischen Symptomen unterbrochen wird, ist eine Verstärkung der Symptome bis über Monate möglich [78].

Im Gegensatz zu einer Post-Inkubation mit den Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS kann eine Nachbehandlung mit den Testsubstanzen Vitamin C, Koffein und Glukose den neurotoxischen Effekt von Cisplatin nicht abmildern. Trotzdem sollen auch diese Kandidatensubstanzen im Folgenden genauer betrachtet werden.

So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Koffein eine hohe antioxidative Kapazität besitzt, die sogar der Referenzsubstanz Trolox ähnelt. Auch sind für Koffein allgemeine neuroprotektive Eigenschaften beschrieben; Kolahdouzan und Hamadeh beschreiben diese neuroprotektiven Effekte von Koffein jedoch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Morbus Parkinson und explizit nicht im Zusammenhang mit einer CIPN [186]. Auf Grund seiner geringen Toxizität, der hohen antioxidativen Kapazität und den bereits beschriebenen positiven Effekten bei neurodegenerativen Erkrankungen wurde Koffein als Kandidatensubstanz aufgenommen. Glukose hingegen zeigt im *TEAC*-Test keinerlei antioxidative Kapazität. Es sind auch keine neuroprotektiven Eigenschaften dieser Substanz bekannt. Für periphere Nerven sind dauerhaft erhöhte Glukosespiegel, beispielsweise wie bei einem Diabetes mellitus, sogar schädlich und führen in diesem Fall zu einer peripheren, diabetischen Polyneuropathie. Dies lässt auch die Überlegung zu, dass Glukose möglicherweise einen negativen Effekt auf die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität haben könnte. Initial wurde die Substanz jedoch im Sinne einer Kontrollsubstanz verwendet, da von einem neutralen Effekt auf die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität ausgegangen wurde und Glukose außerdem oral, ubiquitär und kostengünstig verfügbar ist. Für Vitamin C gibt es ähnlich wie für Glukose auch keine Hinweise auf ein mögliches neuroprotektives Potenzial. Positive Aspekte sind die orale Verfügbarkeit und die geringe allgemeine Toxizität von Vitamin C. Auf Grund seiner hohen antioxidativen Kapazität, die sich durch den *TEAC*-Test auch für das verwendete Vitamin C bestätigen ließ, wurde es als Kandidatensubstanz ausgewählt. Dass weder Vitamin C noch Koffein in der Lage ist, eine Neuroprotektion zu erwirken, obwohl ihr antioxidatives Potenzial deutlich höher (*TEAC*-Wert ca. 1) als das der beiden neuroprotektiven Substanzen NAC und WR 1065 ist (*TEAC*-Wert ca. 0,5), unterstützt die Annahme, dass die antioxidative Kapazität der Testsubstanzen nicht entscheidend für die Abmilderung der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität ist.

Kritisch anzumerken ist, dass eine fehlende Wirkung dieser Substanzen, insbesondere von Vitamin C und Koffein möglicherweise an einer falsch bzw. zu niedrig gewählten Dosis liegen könnte. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Substanzen Glukose und Koffein die pharyngeale Pumprate auch ohne vorherige Cisplatin-Exposition nach 96 h verringern. Dies wird durch einen Vergleich der entsprechenden alleinigen Post-Inkubationsgruppen deutlich. Hier wurde also die Veränderung der Pumprate lediglich nach Gabe von Glukose oder Koffein ohne vorherige Cisplatin-Exposition betrachtet. Die prozentualen Unterschiede gegenüber der gänzlich unbehandelten Kontrolle liegen jedoch für beide Substanzen im einstelligen Bereich und sind daher als eher schwache Effekte zu werten. Auch hier wäre für die Zukunft eine bessere Dosisfindung sinnvoll, um die möglichen Effekte stärker herausarbeiten zu können. Diese schwachen Effekte der Pumpraten-Reduktion nach 96 h durch diese beiden Testsubstanzen scheinen auch nicht additiv zu einer Cisplatin-bedingten Schädigung zu wirken, da sich die Pumprate der Glukose- und Koffein-Post-Inkubationsgruppen nach Cisplatin-Gabe nicht signifikant von den Gruppen mit einer Post-Inkubation in Kontrollmedium unterscheidet. Nach 168 h hingegen ist keine signifikante Verringerung der Pumprate durch die alleinige Applikation von Glukose oder Koffein feststellbar. Zu diesem Messzeitpunkt besteht für die Post-Inkubation mit Glukose lediglich eine tendenzielle Erniedrigung der Pumprate, weshalb auch hier perspektivisch höhere Glukose-Konzentrationen gewählt werden sollten, um den möglichen Effekt zu verstärken. Die Beobachtung, dass die Inkubation mit Glukose allein zu einer Verringerung der Pumprate führen kann, könnte perspektivisch beispielsweise für die Modellierung einer diabetischen Polyneuropathie in *C. elegans* genutzt werden.

Auch einige andere Aspekte hinsichtlich der Resultate der Pumpratenmessung nach Cisplatin-Gabe und Post-Inkubation mit den neuroprotektiven Kandidatensubstanzen sind kritisch zu betrachten. Zum einen ist die Pumprate der Cisplatin-Gruppe mit einer Post-Inkubation in Kontrollmedium nach 168 h nur in der NAC-Versuchsreihe signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle vermindert. Es ist dem Versuchsaufbau geschuldet, dass für die Messung der Pumprate nach Gabe der Testsubstanz WR 1065 sowie für die Messung der Pumprate nach Gabe von ASS die gleiche gänzlich unbehandelte Kontrollgruppe und Cisplatin-Kontrollgruppe verwendet wurde. Nach 168 h ist die Pumprate dieser Cisplatin-Kontrollgruppe nicht (mehr) signifikant (aber trotzdem tendenziell) gegenüber der unbehandelten Kontrolle erniedrigt. Gleiches gilt für die Versuche mit den Testsubstanzen Vitamin C, Glukose

und Koffein. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Signifikanz könnte eine bereits eingetretene Regeneration zu dem Messzeitpunkt 168 h sein, da die Cisplatin-Behandlung lediglich über die ersten 48 h erfolgt ist (daher auch „Puls-Behandlung“ genannt). Zu diesem Zweck wäre die Cisplatin-Konzentration in der Optimierung des Modellsystems perspektivisch höher zu wählen, beispielsweise bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin. Diese Konzentration wurde bereits als Puls-Behandlung mit einer Post-Inkubation mit NAC getestet und die Ergebnisse mit denen der Puls-Behandlung in Höhe von 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin verglichen (siehe Anhang, Abbildung 23). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass durch eine Puls-Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin stärker ausgeprägte und länger andauernde Effekte erzielt werden können. Es konnte sowohl eine prozentual stärkere Verminderung der pharyngealen Pumprate auch nach 168 h (um ca. 20 % bei 200  $\mu\text{M}$  vs. ca. 30-50 % bei 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin) als auch eine stärkere Protektion durch eine Post-Inkubation mit NAC (um ca. 20 % bei 200  $\mu\text{M}$  vs. ca. 50 % bei 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin) bewirkt werden (Anhang, Abbildung 23). Somit zeigt ein höherkonzentrierter „Cisplatin-Puls“ stärker ausgeprägte Effekte und ist daher in zukünftigen Untersuchungen zu bevorzugen.

Zusammenfassend sprechen die Resultate der vorliegenden Arbeit dafür, dass die antioxidative Kapazität der Testsubstanzen nicht entscheidend für die Abmilderung der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität ist. Vielmehr scheint es durch die Wiederherstellung des GSH-Spiegels durch die Nachbehandlung mit den Testsubstanzen NAC und WR 1065 möglich, den neurotoxischen Effekt von Cisplatin nachträglich zu revertieren. Diese Schlussfolgerung passt zu den Ergebnissen des *Knockdowns* von *gcs-1*. Eine verminderte Funktion des Glutathion-Systems kann eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität somit aggravieren und eine Wiederherstellung des GSH-Spiegels kann diese wiederum abmildern. Diese Annahmen decken sich mit den Ergebnissen aus klinischen Studien, in denen die Gabe von Glutathion beispielsweise als vielversprechender Ansatzpunkt bei der Prävention einer CIPN bewertet wird [62].

## 4.4 Die neuroprotektiven Testsubstanzen schränken die apoptotische Wirkung von Cisplatin in *C. elegans* nicht ein

Nachdem die Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS in der vorliegenden Arbeit als neuroprotektiv identifiziert worden sind und gezeigt werden konnte, dass der Platin-Gesamtgehalt durch die Post-Inkubationen mit diesen Kandidatensubstanzen nicht signifikant verändert wird (siehe 4.3), sollte außerdem untersucht werden, ob die Testsubstanzen die Apoptose-induzierende Wirkung von Cisplatin einschränken. Die klinische Anwendung von Cisplatin in der Antitumor-Therapie hat die Induktion der Apoptose der Tumorzellen zum Ziel. Eine zwingende Voraussetzung für eine potenzielle klinische Anwendung der neuroprotektiven Substanzen ist daher, dass eine suffiziente apoptotische Wirkung von Cisplatin trotz der Nachbehandlung mit der jeweiligen Testsubstanz gegeben ist. Hervorzuheben ist, dass in dem Modellorganismus *C. elegans* an dieser Stelle explizit nur von der akut apoptotischen Wirkung von Cisplatin auf mitotisch aktives Gewebe und nicht von einer „Antitumor-Wirkung“ gesprochen werden kann. Dies ist eine Limitation des Modellorganismus *C. elegans*; für eine Aussage über eine tatsächliche Antitumor-Wirkung bedarf es geeigneter (Säugetier-)Tumormodelle. Trotzdem sollte in *C. elegans* überprüft werden, ob trotz Einsatz der neuroprotektiven Substanzen die gewünschte apoptotische Wirkung von Cisplatin auf mitotisch aktive (Normalgewebs-)Zellen gegeben ist. In diesem Tiermodell eignen sich die Keimbahnzellen von *C. elegans* für die Untersuchung der akut apoptotischen Wirkung von Cisplatin auf Grund ihrer schnellen Teilungsrate, welche der von Tumorzellen ähnelt. Die Apoptoserate dieser mitotisch aktiven Keimbahnzellen kann in *C. elegans* mikroskopisch quantifiziert werden. Für Cisplatin konnte bereits eine erhöhte Apoptoserate in den Keimbahnzellen von *C. elegans* nach 24-stündiger Cisplatin-Inkubation [50, 100 und 150  $\mu\text{M}$ ] gezeigt werden [1]. Ziel war es daher, zu überprüfen, ob die Apoptoserate durch die Post-Inkubationen mit den neuroprotektiven Kandidatensubstanzen maßgeblich verändert wird. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden; es konnte gezeigt werden, dass eine Nachbehandlung mit NAC und WR 1065 die Apoptoserate nicht gegenüber der Post-Inkubation in dem Kontrollmedium verändert [1]. Gleiches gilt für eine Nachbehandlung mit ASS. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle bleibt die Apoptoserate in den mitotisch aktiven Keimbahnzellen somit in allen Cisplatin-

Gruppen unabhängig von der Post-Inkubation erhöht, sodass eine apoptotische Wirkung von Cisplatin trotz Gabe der neuroprotektiven Substanzen angenommen werden kann. Dies spricht dafür, dass es möglich ist, chronische unerwünschte Wirkungen von Cisplatin wie die Neurotoxizität durch eine Post-Inkubation zu verringern, ohne akute apoptotische Effekte abzumildern [1].

In Zusammenhang mit der akut apoptotischen Wirkung von Cisplatin ist es sinnvoll, auch Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin, sowohl von Normalgewebs- als auch von Tumorzellen, zu erwähnen. Denn für die Ausbildung einer Cisplatin-Resistenz sind teilweise ähnliche Mechanismen von Bedeutung, die auch für eine potenzielle Neuroprotektion wichtig sein könnten. Cisplatin führt in *C. elegans* beispielsweise zu einer Hochregulierung der Glutathion-S-Transferase (GST, in *C. elegans* *gst-4*) [183]. Dieses Enzym ist wichtig für die Bindung von GSH an Xenobiotika und somit für deren Detoxifikation. Auf diese Weise kann es jedoch auch zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin kommen: Godwin et al. konnten bereits 1992 zeigen, dass eine hohe Cisplatin-Resistenz in Ovarialkarzinomzellen mit erhöhten Glutathion-Spiegeln durch eine gesteigerte Synthese assoziiert ist [187]. Insbesondere eine erhöhte Expression der mRNA für die  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase, welche heute Glutamat-Cystein-Ligase (GCL) genannt wird und in *C. elegans* der zuvor beschriebenen *gcs-1* entspricht, ist mit einer starken Cisplatin-Resistenz assoziiert [187, 188]. Eine im Gegensatz dazu verminderte Expression der mRNA für die *gcs-1* führt wiederum zu einer Verstärkung der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität in *C. elegans*, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte [1].

Hierdurch wird deutlich, warum bei Einsatz potenziell neuroprotektiver Kandidatensubstanzen gleichzeitig unbedingt auf eine weiterhin bestehende akut apoptotische Wirkung von Cisplatin zumindest in mitotisch aktivem Gewebe geachtet werden muss und warum *C. elegans* damit vor allem einen Stellenwert als Modellorganismus in der Vorbereitung von Säugetiermodellen hat. Denn als Limitation dieses alternativen Modellorganismus ist erneut hervorzuheben, dass *C. elegans* explizit kein Tumor-Modell ist und damit keine Tumorzellen untersucht werden können. *C. elegans* bietet sich jedoch als vollständiger Organismus im Sinne des 3R-Konzepts insbesondere für das Screening verschiedener Kandidatensubstanzen an, um nur vielversprechende Substanzen zielgerichtet und ressourcenschonend an Säugetiermodellen zu testen.

Bezüglich der Methodik dieser Untersuchung ist außerdem zu beachten, dass die Dauer der Cisplatin-Inkubation bzw. die der Inkubation mit den Kandidatensubstanzen (4 h + 20 h) gegenüber den anderen Versuchen (48 h + 120 h) verkürzt ist. Dies ist dem Versuchsaufbau geschuldet und erschwert eine exakte Vergleichbarkeit, wie sie zwischen den anderen Versuchen mit gleichen Zeiträumen gegeben ist. Da der Zeitanteil der Cisplatin-Inkubation an der gesamten Inkubationsdauer im Verhältnis zu der Messung der Apoptoserate jedoch geringer (17 %) ist als bei der Messung der Pumprate (29 %), kann bei der Pumpratenmessung sogar von einer noch stärkeren Cisplatin-Schädigung ausgegangen werden.

Neben dem relativen Vergleich der Apoptoseraten der Post-Inkubationsgruppen wurden auch weitere Messungen durchgeführt (siehe Anhang, Abbildung 24). Zu diesem Zweck wurden weitere Inkubations-Kombinationen und eine Induktion der Apoptose mittels UV-C Bestrahlung untersucht. Eine UV-C Bestrahlung kann als Positiv-Kontrolle für die Apoptose-Induktion dienen [189] (Anhang, Abbildung 24 D). Eine interessante Beobachtung hierbei ist, dass eine sofortige NAC Post-Inkubation für 24 h nach UV-C Bestrahlung die Apoptoserate gegenüber einer erst 4 h später begonnenen 20-stündigen Post-Inkubation senken kann (Anhang, Abbildung 24). Der Mechanismus dieser Protektion ist unklar. Die Höhe der antioxidativen Kapazität scheint auch hier nicht entscheidend zu sein, da die Beobachtung nicht für Amifostin/WR 1065 gilt, obwohl es NAC in seinem *TEAC*-Wert gleicht. Da die Beobachtung nur für NAC und nicht für WR 1065 gilt, scheint in diesem Versuchsaufbau auch nicht die Funktion als Thiol-Donor entscheidend zu sein. Eine ASS-Gabe (für 20 h oder 24 h) hingegen senkt die Apoptoserate nach UV-C Exposition so sehr ab, dass sie nicht mehr gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht ist (Anhang, Abbildung 24). Da ASS jedoch keine antioxidative Kapazität im *TEAC*-Assay zeigt, spricht dies ebenso dafür, dass die Reduktion von ROS in diesem Zusammenhang nicht der entscheidende Protektionsmechanismus sein kann.

In Zusammenschau dieser Resultate lässt sich schlussfolgern, dass Cisplatin weiterhin eine effektive apoptotische Wirkung trotz geringerer Neurotoxizität durch die Post-Inkubation mit NAC, WR 1065 und ASS hat. Es ist davon auszugehen, dass die neuroprotektiven Substanzen in der Lage sind, die „schädlichen chronischen Effekte von Cisplatin abzumildern, nachdem die akute und erwünschte Apoptoseinduktion in mitotisch aktiven Geweben stattgefunden hat“ [1].

## 4.5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte erneut bestätigt werden, dass sich der Modellorganismus *C. elegans* für Untersuchungen im Bereich der Cisplatin-induzierten (Neuro-)Toxizität eignet; insbesondere die Messung der pharyngealen Pumprate kann als Surrogatmarker für die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität dienen [1]. Die Messung der pharyngealen Pumprate zeigt sich hier als robuster Endpunkt, da sie in dem Neurotoxizität-induzierenden Dosisbereich von Cisplatin nicht durch andere Störfaktoren wie Muskeltoxizität oder vorzeitige Alterung beeinflusst wird. Dies ist eine weitere Bestätigung, dass sich *C. elegans* als Modellorganismus für die Untersuchung der Platin-induzierten Neurotoxizität eignet und somit auch Informationen für die Therapie oder sogar Prävention der CIPN im Menschen liefern kann [1].

Der Pathomechanismus der CIPN ist nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheint das Glutathion-System hierbei von Bedeutung zu sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Funktion des Glutathion-Systems eine Cisplatin-induzierte Neurotoxizität in *C. elegans* aggravieren kann; als Ursache kann möglicherweise eine Verringerung der endogenen antioxidativen Kapazität durch eine GSH-Depletion vermutet werden [1]. Auf Grund dieser Resultate ist für Kandidatensubstanzen, welche in dieses System eingreifen können, eine neuroprotektive Wirkung anzunehmen, wenngleich die jeweilige antioxidative Kapazität dafür nicht entscheidend ist. Eine Post-Inkubation mit den Substanzen NAC und Amifostin bzw. WR 1065 zeigt in der vorliegenden Arbeit eine Abmilderung der Neurotoxizität [1]. Auch eine Post-Inkubation mit ASS wirkt neuroprotektiv und kann ebenso wie eine Nachbehandlung mit NAC und WR 1065 den neurotoxischen Effekt von Cisplatin revertieren. Andere, zum Teil ebenfalls antioxidativ wirksame Substanzen wie Vitamin C oder Koffein verbessern die Pumprate nach Cisplatin-Gabe hingegen nicht. Glukose zeigt sogar tendenziell eine zusätzliche Verringerung der Pumprate. In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass der Platin-Gesamtgehalt durch den Einsatz der neuroprotektiven Kandidatensubstanzen NAC und WR 1065 nicht verändert wird [1]. Dies gilt auch für eine Post-Inkubation mit ASS. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Post-Inkubation mit diesen Substanzen keine Auswirkung auf die Apoptose-Induktion in *C. elegans* hat: die akut apoptotische Wirkung von Cisplatin auf mitotisch aktive Zellen wird trotz Reduktion der Neurotoxizität durch die Kandidatensubstanzen nicht abgeschwächt [1].

Zusammenfassend konnte in *C. elegans* eine Abmilderung der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität und damit eine Protektion des Nervensystems nach Cisplatin-Exposition durch die Nachbehandlung mit den Kandidatensubstanzen NAC, WR 1065 und ASS gezeigt werden. Diese Ergebnisse decken sich zumeist mit den Resultaten der wenigen und zumeist schwachen klinischen Studien zu diesem Thema, weshalb dringend weitere Forschung in diesem Bereich notwendig ist. Perspektivisch könnten die Substanzen auch für den alltäglichen klinischen Einsatz zur Behandlung einer CIPN vielversprechend sein. Insgesamt hat *C. elegans* als 3R-konformer Modellorganismus für die CIPN das Potenzial, für das Screening weiterer Kandidatensubstanzen und die genauere Untersuchung des Patho- und Wirkmechanismus genutzt zu werden [1].

## 4.6 Ausblick

Die Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathie (CIPN), welche unter anderem als Nebenwirkung einer Behandlung mit Cisplatin auftreten kann, ist häufig therapielimitierend [3]. Da der Pathomechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, fehlen eine effektive Therapie oder sogar Prävention [1, 33, 40, 159]. Diese Arbeit konnte zeigen, dass eine Neuroprotektion in *C. elegans* durch Post-Inkubation möglich ist. NAC und WR 1065 zeigen eine neuroprotektive Wirkung, welche möglicherweise ihrer Thiol-Gruppe zugesprochen werden kann [1]. Für ASS ist der neuroprotektive Wirkmechanismus bisher unklar.

Insgesamt ist *C. elegans* ein nützliches und 3R-konformes *in vivo* Modell für die CIPN [1]. In der Optimierung des Modells sollte die Methode der Auszählung des Pharynxpumpens automatisiert und dadurch objektiviert werden, da es sich bei den Ergebnissen in dieser Arbeit um eine manuelle Messung handelt. Eine automatisierte Untersuchung der Pumprate kann mittels Elektropharyngeogramm (EPG) erfolgen. Hierbei wird die neuronale Aktivität der Pharynx-assoziierten Neurone direkt über das *ScreenChip*<sup>™</sup> System der Firma *InVivo Biosystems* (ehemals *NemaMetrix*) gemessen [1, 190]. Wellenberg et al. haben diese Methode bereits genutzt, um die pharyngeale Pumprate nach Cisplatin-Exposition automatisiert zu untersuchen: hierdurch konnte gezeigt werden, dass Cisplatin zu einer dosisabhängigen Reduktion der Aktivität der pharyngealen Neurone führt [1]. Auch ein Teil der oben gezeigten Ergebnisse konnte so bereits objektiviert und bestätigt werden: eine Nachbehandlung

mit NAC zeigte auch in diesem Versuchsaufbau eine Verbesserung der Pumprate nach Cisplatin-Exposition [1]. Die Messung über EPGs erfolgt für jeden Nematoden einzeln. Da perspektivisch ein breiteres Screening weiterer potenziell neuroprotektiver Kandidatensubstanzen wünschenswert ist, könnte daher ergänzend auch der *Clearance-Assay* für die Standardisierung verwendet werden. Dieser könnte sich insbesondere für die Umsetzung von Hochdurchsatz-Screenings eignen, da eine hohe Anzahl von Nematoden und Substanzen verwendet werden kann. Bei dieser indirekten Messmethode wird über die Bestimmung der optischen Dichte (OD) des Flüssigmediums, in welchem die Nematoden inkubiert werden, auf die pharyngeale Pumprate geschlossen. Diese Methode ist angelehnt an den „*Fitness Assay*“, wie er durch Elvin et al. beschrieben wurde [191] sowie an den „*Food Intake (OD<sub>600</sub>) Assay*“, beschrieben von Gomez-Amaro et al. [192]. Sinkt die pharyngeale Pumprate (beispielsweise in einer Cisplatin-Gruppe), wird die optische Dichte auf Grund der weniger stark dezimierten Bakterienpopulation in einem geringeren Ausmaß reduziert als in Gruppen mit einer hohen Pumprate (beispielsweise Kontrollgruppe). Das Ergebnis einer initialen, einmaligen, beispielhaften Testung für den Vergleich einer Cisplatin-Gruppe zu ihrer Kontrolle war vielversprechend (Anhang, Abbildung 25). Perspektivisch könnten so in einem ersten Schritt Hochdurchsatz-Screenings zur Identifizierung neuroprotektiver Kandidatensubstanzen realisiert werden, welche bei Hinweisen für einen positiven Effekt in einem zweiten Schritt über die Messung der EPGs bestätigt werden könnten. Bei einer zusätzlichen Automatisierung der Auswertung der Apoptoserate, beispielsweise über die *ImageJ*-Software, könnte eine hohe Standardisierung der in dieser Arbeit manuell durchgeführten Versuche erreicht werden.

Außerdem sollte in der Optimierung dieses CIPN-Modells bei der Messung der pharyngealen Pumprate regelhaft eine höhere Cisplatin-Konzentration für die 48-stündige Puls-Behandlung gewählt werden, beispielsweise 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin. Für diese Cisplatin-Konzentration konnte in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden, dass der neuroprotektive Effekt durch eine NAC-Post-Inkubation stärker ausgeprägt ist (Anhang, Abbildung 23). Durch diesen initial stärkeren Cisplatin-Puls von 300  $\mu\text{M}$  kann bewirkt werden, dass die Cisplatin-Gruppen mit einer Post-Inkubation in Kontrollmedium auch nach 168 h eine signifikant erniedrigte Pumprate zeigen (Anhang, \* in Abbildung 23), anders als bei einem initialen Cisplatin-Puls von 200  $\mu\text{M}$ .

Als Ergänzung zu der Untersuchung des Pharynxpumpens als funktioneller Endpunkt sollte auch die Untersuchung eines neuroanatomischen Endpunkts erfolgen. Für diesen Zweck können Reporterstämme genutzt werden, die die neuronalen Verbindungen in *C. elegans* sichtbar machen. In dem Reporterstamm STR198 sind die PVD-Neurone GFP-markiert, welche von mechanosensorischer Qualität sind und in der Körperwand liegen [1, 125]. Von ihnen gehen viele, sich verzweigende dendritische Ausläufer ab [193], sodass sie gut geeignet sind, um den Einfluss von Cisplatin auf die Morphologie des Nervensystems zu untersuchen. Erste Experimente mit diesem Ziel wurden bereits durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Cisplatin-Gruppe (400  $\mu$ M Cisplatin für 96 h) mit einer unbehandelten Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer neuronalen Verzweigung verglichen [1]. Da jedoch keine automatisierte Auswertung über *ImageJ* bzw. *NeuronJ* möglich war, können die Ergebnisse nur als repräsentative Bilder aufgeführt werden (Anhang, Abbildung 26). Anhand der Bilder lassen sich keine Veränderungen der Morphologie des Nervensystems nach Cisplatin-Gabe nachvollziehen [1]. Perspektivisch sollte eine objektive Auswertung erfolgen, da dieser experimentelle Aufbau vielversprechend für eine adäquate anatomische Modellierung einer peripheren Neuropathie ist. Yip und Heiman konnten in *C. elegans* bereits zeigen, über welche neuronale Plastizität diese Art von Neuronen verfügt [193]. Durch Wellenberg et al. wurden auch andere qualitative Beobachtungen durchgeführt. So wurde der Reporterstamm BZ555 [egl-1 [dat-1p::GFP]] zur Visualisierung der Neurotoxizität in dopaminergen Neuronen verwendet: die Neurone der Tiere, die für 96 h mit 100  $\mu$ M Cisplatin behandelt wurden, zeigten eine tendenziell schwächere Leuchtkraft im Vergleich zu den unbehandelten Tieren [1].

Außerdem sollten einige der hier gezeigten Versuche wiederholt werden; unter anderem ist die Messung des Platin-Gesamtgehalts mittels ICP-MS nicht aussagekräftig. Es konnte zwar gezeigt werden, dass sich der Platin-Gehalt in den Gruppen mit einer Post-Inkubation mit den neuroprotektiven Substanzen nicht signifikant von dem in der Kontroll-Post-Inkubationsgruppe unterscheidet. Jedoch konnte dabei nicht gezeigt werden, dass der Platin-Gehalt in diesen drei Cisplatin-Gruppen mit einer Nachbehandlung mit den neuroprotektiven Testsubstanzen weiterhin signifikant höher ist als in der gänzlich unbehandelten Kontrollgruppe. Dies wäre jedoch wichtig, um zu unterstreichen, dass die Kandidatensubstanzen nicht zu einer verstärkten Elimination von Cisplatin führen. Zu diesem Zweck sollte auch hier

gegebenenfalls eine höhere Cisplatin-Konzentration für die Puls-Behandlung gewählt werden (beispielsweise auch 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin). Der Southwestern-Blot sollte ebenfalls wiederholt werden, da die Aussagekraft gering ist (Anhang, Abbildung 22). Auch wenn die Anzahl der DNA-Addukte in der Cisplatin-Gruppe nach 48 h tendenziell höher ist als in der unbehandelten Kontrolle, fehlt eine statistische Signifikanz für eine eindeutige Aussage. Nach 96 h ist die Anzahl der 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen in den Gruppen mit einer Nachbehandlung mit den neuroprotektiven Testsubstanzen zwar nicht gegenüber der Post-Inkubation in dem Kontrollmedium verändert, aber auch nicht gegenüber der unbehandelten Kontrolle (siehe Anhang, Abbildung 22). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Menge an Platin-Addukten auf Grund der 48-stündigen Regenerationszeit abgenommen haben könnte [1]. Daher sollten die Inkubationszeiträume mit den Kandidatensubstanzen und damit auch die Regenerationszeit nach Cisplatin-Exposition verkürzt werden (zum Beispiel auf maximal 24 h) und die Cisplatin-Konzentration für die Puls-Behandlung ebenso erhöht werden (zum Beispiel auf 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin).

Hinsichtlich der Aufarbeitung des Pathomechanismus wäre eine nähere Untersuchung der mitochondrialen Schädigung durch Cisplatin als Ursache der CIPN für die Zukunft interessant. Substanzen, die die Mitochondrien schädigen, aggravieren eine Oxaliplatin-bedingte Neuropathie [76]. Xiao et al. nehmen daher an, dass Substanzen, die einen positiven Effekt auf die Mitochondrien-Funktion haben, auch für die Prävention oder Therapie sinnvoll sein können [76]. Dies ist ein möglicher Ansatzpunkt für die Suche nach weiteren neuroprotektiven Substanzen. Klinisch besonders relevant sind dabei Substanzen, die gleichzeitig mehrere Nebenwirkungen von Cisplatin abmildern können. So beschreiben einige aktuelle Studien Melatonin anhand von Säugetiermodellen als protektive Substanz gegenüber den Cisplatin bedingten Nebenwirkungen Ototoxizität [194], Nephrotoxizität [195] und Neurotoxizität, unter anderem auf Grund seiner antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkung [196]. Im klinischen Alltag wird Melatonin bei Schlafstörungen und Depressionen eingesetzt [196], Anwendungsgebiete die häufig auch Krebspatienten betreffen. Daher könnte auch eine Testung von Melatonin in *C. elegans* interessant sein. Da zu den möglichen, hier jedoch nicht ausführlich thematisierten Pathomechanismen der CIPN auch die Neuroinflammation gezählt wird [77, 197], könnte auch die antiinflammatorische Wirkung ein Auswahlkriterium für potenzielle Kandidatensubstanzen sein. Perspektivisch aussichtsreich ist aber vor allem die

Testung von Kombinationstherapien: Flatters et al. schlagen diesen Weg vor, um gleichzeitig an den verschiedenen möglichen Pathomechanismen der CIPN anzusetzen, da diese sich gegenseitig verstärken können [159]. Für diesen Ansatz wäre *C. elegans* sehr gut geeignet, da hier zum Beispiel die Kombination einer genetischen Manipulation und die gleichzeitige Gabe einer Testsubstanz möglich ist. Hier könnte beispielsweise konkret untersucht werden, ob der Effekt des *gcs-1* Knockdowns durch die gleichzeitige Gabe einer neuroprotektiven Kandidatensubstanz (zum Beispiel NAC oder WR 1065 auf Grund ihrer Thiolgruppe) abgemildert werden kann. Auch eine Kombination aus zwei bereits als neuroprotektiv identifizierten Kandidatensubstanzen sollte durchgeführt und auf einen additiven Effekt hin untersucht werden.

Die Verwendung des Modellorganismus *C. elegans* und insbesondere die Messung der pharyngealen Pumprate als Surrogatmarker für Neurotoxizität ist hilfreich, um mehr Informationen über den zugrundeliegenden Pathomechanismus der CIPN zu sammeln und potenziell neuroprotektive Kandidatensubstanzen zu identifizieren. Auf diese Weise soll perspektivisch möglicherweise auch mit Hilfe von Hochdurchsatz-Screenings von Substanzbibliotheken dazu beigetragen werden, kurative oder sogar präventive Maßnahmen gegen die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität zu entwickeln [1].

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Wellenberg, A., et al., *Use of C. elegans as a 3R-compliant in vivo model for the chemoprevention of cisplatin-induced neurotoxicity*. Experimental Neurology, 2021: p. 113705.
2. WHO, *World Cancer Report 2014*, B.W. Stewart and C.P. Wild, Editors. 2014.
3. Carozzi, V.A., A. Canta, and A. Chiorazzi, *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms?* Neurosci Lett, 2015. **596**: p. 90-107.
4. Hartmann, J.T. and H.P. Lipp, *Toxicity of platinum compounds*. Expert Opin Pharmacother, 2003. **4**(6): p. 889-901.
5. Engelhardt, M., R. Mertelsmann, and J. Duyster, *Das Blaue Buch: Chemotherapie-Manual Hämatologie und Onkologie*. 2020: Springer Berlin Heidelberg. 1-29.
6. Rosenberg, B., L. Van Camp, and T. Krigas, *Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode*. Nature, 1965. **205**(4972): p. 698-699.
7. Lokich, J. and N. Anderson, *Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature*. Ann Oncol, 1998. **9**(1): p. 13-21.
8. Goodsell, D.S., *The molecular perspective: Cisplatin*. Stem Cells, 2006. **24**(3): p. 514-5.
9. McKeage, M.J., *Comparative adverse effect profiles of platinum drugs*. Drug Saf, 1995. **13**(4): p. 228-44.
10. Siddik, Z.H., et al., *The comparative pharmacokinetics of carboplatin and cisplatin in mice and rats*. Biochem Pharmacol, 1987. **36**(12): p. 1925-32.
11. 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 Res, 1986. **46**(4 Pt 2): p. 1972-9.
12. Tashiro, T., et al., *Antitumor activity of a new platinum complex, oxalato (trans-1,2-diaminocyclohexane)platinum (II): new experimental data*. Biomed Pharmacother, 1989. **43**(4): p. 251-60.
13. Hromas, R.A., J.A. North, and C.P. Burns, *Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells*. Cancer Lett, 1987. **36**(2): p. 197-201.
14. Buss, I., et al., *Relevance of copper transporter 1 and organic cation transporters 1-3 for oxaliplatin uptake and drug resistance in colorectal cancer cells*. Metallomics, 2018. **10**(3): p. 414-425.
15. Ishida, S., et al., *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14298-302.
16. Chauhan, S.S., et al., *Reduced endocytosis and altered lysosome function in cisplatin-resistant cell lines*. Br J Cancer, 2003. **88**(8): p. 1327-34.
17. 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.
18. 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.
19. Kelland, L.R., *New platinum antitumor complexes*. Crit Rev Oncol Hematol, 1993. **15**(3): p. 191-219.
20. Cepeda, V., et al., *Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity*. Anticancer Agents Med Chem, 2007. **7**(1): p. 3-18.

21. Jamieson, E.R. and S.J. Lippard, *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts*. Chemical Reviews, 1999. **99**(9): p. 2467-2498.
22. Misset, J.L., et al., *Oxaliplatin clinical activity: a review*. Crit Rev Oncol Hematol, 2000. **35**(2): p. 75-93.
23. Di Francesco, A.M., A. Ruggiero, and R. Riccardi, *Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(11): p. 1914-27.
24. Schmidt, W. and S.G. Chaney, *Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines*. Cancer Res, 1993. **53**(4): p. 799-805.
25. Raymond, E., et al., *Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin*. Molecular Cancer Therapeutics, 2002. **1**(3): p. 227.
26. Zamble, D.B., et al., *Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease*. Biochemistry, 1996. **35**(31): p. 10004-13.
27. Pinto, A.L. and S.J. Lippard, *Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(14): p. 4616.
28. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
29. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. Eur J Pharmacol, 2014. **740**: p. 364-78.
30. Carozzi, V.A., P. Marmioli, and G. Cavaletti, *The role of oxidative stress and anti-oxidant treatment in platinum-induced peripheral neurotoxicity*. Curr Cancer Drug Targets, 2010. **10**(7): p. 670-82.
31. Florea, A.-M. and D. Büsselberg, *Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects*. Cancers, 2011. **3**(1): p. 1351-1371.
32. McWhinney, S.R., R.M. Goldberg, and H.L. McLeod, *Platinum neurotoxicity pharmacogenetics*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(1): p. 10-6.
33. Ma, J., et al., *Beyond symptomatic relief for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Targeting the source*. Cancer, 2018. **124**(11): p. 2289-2298.
34. Rybak, L.P. and C.A. Whitworth, *Ototoxicity: therapeutic opportunities*. Drug Discov Today, 2005. **10**(19): p. 1313-21.
35. Wagstaff, A.J., et al., *Carboplatin. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer*. Drugs, 1989. **37**(2): p. 162-90.
36. Yao, X., et al., *Cisplatin nephrotoxicity: a review*. Am J Med Sci, 2007. **334**(2): p. 115-24.
37. Miller, R.P., et al., *Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity*. Toxins, 2010. **2**(11): p. 2490-2518.
38. Ruggiero, A., et al., *The ability of mannitol to decrease cisplatin-induced nephrotoxicity in children: real or not?* Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2016. **77**(1): p. 19-26.
39. Williams, R.P., et al., *Mannitol for the prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity: A retrospective comparison of hydration plus mannitol versus hydration alone in inpatient and outpatient regimens at a large academic medical center*. Journal of Oncology Pharmacy Practice, 2016. **23**(6): p. 422-428.
40. Wolf, S., et al., *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies*. Eur J Cancer, 2008. **44**(11): p. 1507-15.
41. 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.

42. Höke, A. and M. Ray, *Rodent Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy*. ILAR Journal, 2014. **54**(3): p. 273-281.
43. Stubblefield, M., et al., *NCCN Task Force Report: Management of Neuropathy in Cancer*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, 2009. **7 Suppl 5**: p. S1-S26; quiz S27.
44. Windebank, A.J. and W. Grisold, *Chemotherapy-induced neuropathy*. J Peripher Nerv Syst, 2008. **13**(1): p. 27-46.
45. Roelofs, R.I., et al., *Peripheral sensory neuropathy and cisplatin chemotherapy*. Neurology, 1984. **34**(7): p. 934-8.
46. Rosenfeld, C.S. and L.E. Broder, *Cisplatin-induced autonomic neuropathy*. Cancer Treat Rep, 1984. **68**(4): p. 659-60.
47. Cohen, S.C. and J.E. Mollman, *Cisplatin-induced gastric paresis*. J Neurooncol, 1987. **5**(3): p. 237-40.
48. Hansen, S.W., *Autonomic neuropathy after treatment with cisplatin, vinblastine, and bleomycin for germ cell cancer*. Bmj, 1990. **300**(6723): p. 511-2.
49. Hildebrand, J., *Neurological complications of cancer chemotherapy*. Curr Opin Oncol, 2006. **18**(4): p. 321-4.
50. Meijer, C., et al., *Cisplatin-induced DNA-platination in experimental dorsal root ganglia neuronopathy*. Neurotoxicology, 1999. **20**(6): p. 883-7.
51. Glendenning, J.L., et al., *Long-term neurologic and peripheral vascular toxicity after chemotherapy treatment of testicular cancer*. Cancer, 2010. **116**(10): p. 2322-31.
52. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF). *Supportive Therapie bei onkologischen PatientInnen - Langversion 1.3, 2020, AWMF Registernummer: 032/054OL*. 2020 [cited 2021 15.06.]; Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/supportive-therapie/>.
53. Quasthoff, S. and H.P. Hartung, *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. J Neurol, 2002. **249**(1): p. 9-17.
54. Avan, A., et al., *Platinum-Induced Neurotoxicity and Preventive Strategies: Past, Present, and Future*. The Oncologist, 2015. **20**(4): p. 411 - 432.
55. Park, S.B., et al., *Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility*. Oncologist, 2011. **16**(5): p. 708-16.
56. Argyriou, A.A., et al., *Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: a prospective study in 170 patients with colorectal cancer*. Cancer, 2013. **119**(2): p. 438-44.
57. 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.
58. Argyriou, A.A., et al., *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature*. Cancer Manag Res, 2014. **6**: p. 135-47.
59. Rowinsky, E.K., et al., *Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol)*. Semin Oncol, 1993. **20**(4 Suppl 3): p. 1-15.
60. Aley, K.O., D.B. Reichling, and J.D. Levine, *Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans*. Neuroscience, 1996. **73**(1): p. 259-65.
61. Cavaletti, G. and P. Marmiroli, *Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity*. Curr Opin Neurol, 2015. **28**(5): p. 500-7.

62. 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.
63. 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.
64. McKeage, M.J., et al., *Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs*. *Br J Cancer*, 2001. **85**(8): p. 1219-25.
65. 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.
66. 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.
67. Gobbel, G.T., et al., *Response of postmitotic neurons to X-irradiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis*. *J Neurosci*, 1998. **18**(1): p. 147-55.
68. Thomas, J.P., et al., *High accumulation of platinum-DNA adducts in strial marginal cells of the cochlea is an early event in cisplatin but not carboplatin ototoxicity*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(1): p. 23-9.
69. Dzagnidze, A., et al., *Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy*. *J Neurosci*, 2007. **27**(35): p. 9451-7.
70. Karran, P., A. Moscona, and B. Strauss, *Developmental decline in DNA repair in neural retina cells of chick embryos. Persistent deficiency of repair competence in a cell line derived from late embryos*. *The Journal of cell biology*, 1977. **74**(1): p. 274-286.
71. Nouspikel, T. and P.C. Hanawalt, *DNA repair in terminally differentiated cells*. *DNA Repair (Amst)*, 2002. **1**(1): p. 59-75.
72. Starobova, H. and I. Vetter, *Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy*. *Front Mol Neurosci*, 2017. **10**: p. 174.
73. Trecarichi, A. and S.J.L. Flatters, *Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. *Int Rev Neurobiol*, 2019. **145**: p. 83-126.
74. 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.
75. Chiorazzi, A., S. Semperboni, and P. Marmioli, *Current View in Platinum Drug Mechanisms of Peripheral Neurotoxicity*. *Toxics*, 2015. **3**(3): p. 304-321.
76. Xiao, W.H. and G.J. Bennett, *Effects of mitochondrial poisons on the neuropathic pain produced by the chemotherapeutic agents, paclitaxel and oxaliplatin*. *Pain*, 2012. **153**(3): p. 704-9.
77. Areti, A., et al., *Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy*. *Redox Biol*, 2014. **2**: p. 289-95.
78. Podratz, J.L., et al., *Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons*. *Neurobiol Dis*, 2011. **41**(3): p. 661-8.
79. Cascinu, S., et al., *Neuroprotective effect of reduced glutathione on cisplatin-based chemotherapy in advanced gastric cancer: a randomized double-blind placebo-controlled trial*. *J Clin Oncol*, 1995. **13**(1): p. 26-32.
80. Smyth, J.F., et al., *Glutathione reduces the toxicity and improves quality of life of women diagnosed with ovarian cancer treated with cisplatin: results of a double-blind, randomised trial*. *Ann Oncol*, 1997. **8**(6): p. 569-73.

81. Bogliun, G., et al., *Evaluation by somatosensory evoked potentials of the neurotoxicity of cisplatin alone or in combination with glutathione*. The Italian Journal of Neurological Sciences, 1992. **13**(8): p. 643-647.
82. Cavaletti, G., et al., *Protective effects of glutathione on cisplatin neurotoxicity in rats*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994. **29**(4): p. 771-6.
83. Mairinger, F.D., et al., *Immunohistochemically detectable metallothionein expression in malignant pleural mesotheliomas is strongly associated with early failure to platin-based chemotherapy*. Oncotarget, 2018. **9**(32): p. 22254-22268.
84. Lin, P.C., et al., *N-acetylcysteine has neuroprotective effects against oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colon cancer patients: preliminary data*. Support Care Cancer, 2006. **14**(5): p. 484-7.
85. Dickey, D.T., et al., *Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(3): p. 1052-8.
86. Pace, A., et al., *Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy: a randomized, placebo-controlled trial*. Neurology, 2010. **74**(9): p. 762-6.
87. Verstappen, C.C., et al., *Amifostine protects against chemotherapy-induced neurotoxicity: an in vitro investigation*. Anticancer Res, 2004. **24**(4): p. 2337-41.
88. Albers, J.W., et al., *Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(3): p. Cd005228.
89. S3-Leitlinie, *Leitlinienprogramm Onkologie | Evidenztabelle S3-LL Supportive Therapie/ November 2016*. 2016, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) , Deutsche Krebshilfe (DKH).
90. Gadgil, S., et al., *A systematic summary and comparison of animal models for chemotherapy induced (peripheral) neuropathy (CIPN)*. PLoS One, 2019. **14**(8): p. e0221787.
91. Boyd, W.A., et al., *Medium- and high-throughput screening of neurotoxicants using C. elegans*. Neurotoxicol Teratol, 2010. **32**(1): p. 68-73.
92. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
93. 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.
94. Hulme, S.E. and G.M. Whitesides, *Die Chemie und der Wurm: Caenorhabditis elegans als Plattform für das Zusammenführen von chemischer und biologischer Forschung*. Angewandte Chemie, 2011. **123**(21): p. 4870-4906.
95. Schierenberg, E. and R. Cassada, *Der Nematode Caenorhabditis elegans — ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus*. Biologie in unserer Zeit, 1986. **16**(1): p. 1-7.
96. Frézal, L. and M.-A. Félix, *C. elegans outside the Petri dish*. eLife, 2015. **4**: p. e05849.
97. Felix, M.A. and C. Braendle, *The natural history of Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2010. **20**(22): p. R965-9.
98. Hodgkin, J., R.H. Plasterk, and R.H. Waterston, *The nematode Caenorhabditis elegans and its genome*. Science, 1995. **270**(5235): p. 410-4.
99. Cunha, A., et al., *Variable cell number in nematodes*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 253.
100. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 64-119.

101. 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.
102. Altun, Z.F. and D.H. Hall. *Alimentary System, Pharynx*. WormAtlas 2009 [cited 2021 24.05.]; Available from: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>.
103. Altun, Z.F. and D.H. Hall. *Introduction*. WormAtlas 2009 [cited 2021 24.05.]; Available from: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>.
104. 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.
105. Leung, M.C., et al., *Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology*. Toxicol Sci, 2008. **106**(1): p. 5-28.
106. Leung, C.K., et al. *High-throughput screening and biosensing with fluorescent C. elegans strains*. Journal of visualized experiments : JoVE, 2011. DOI: 10.3791/2745.
107. 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.
108. Hodgkin, J., H.R. Horvitz, and S. Brenner, *Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS*. Genetics, 1979. **91**(1): p. 67-94.
109. 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.
110. Ankeny, R.A., *The natural history of Caenorhabditis elegans research*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(6): p. 474-9.
111. Consortium, T.C.e.S., *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2012-8.
112. Kuwabara, P.E. and N. O'Neil, *The use of functional genomics in C. elegans for studying human development and disease*. J Inherit Metab Dis, 2001. **24**(2): p. 127-38.
113. Timmons, L. and A. Fire, *Specific interference by ingested dsRNA*. Nature, 1998. **395**(6705): p. 854.
114. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
115. 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.
116. Hillier, L.W., et al., *Genomics in C. elegans: so many genes, such a little worm*. Genome Res, 2005. **15**(12): p. 1651-60.
117. [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org). *The Nobel Prize - Nobel Prizes & Laureates*. 2021 [cited 2021 24.05.].
118. Hobert, O. *Specification of the nervous system*. The C. elegans Research Community, *WormBook* 2005 Aug 8 [cited 2021 24.05.]; Available from: <http://www.wormbook.org>.
119. Altun, Z.F. and D.H. Hall. *Nervous system, general description*. WormAtlas 2009 [cited 2021 24.05.]; Available from: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>.
120. Cook, S.J., et al., *Whole-animal connectomes of both Caenorhabditis elegans sexes*. Nature, 2019. **571**(7763): p. 63-71.

121. Bargmann, C., *Beyond the connectome: How neuromodulators shape neural circuits*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 2012. **34**: p. 458-65.
122. Pierce-Shimomura, J.T., et al., *The homeobox gene lim-6 is required for distinct chemosensory representations in C. elegans*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 694-8.
123. Bargmann, C.I. *Chemosensation in C. elegans*. The *C. elegans* Research Community, *WormBook* 2006 Oct 25 [cited 2021 24.05.]; Available from: <http://www.wormbook.org>.
124. Wes, P.D. and C.I. Bargmann, *C. elegans odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 698-701.
125. Goodman, M.B. *Mechanosensation*. The *C. elegans* Research Community, *WormBook* 2006 Jan 6 [cited 2021 24.05.]; Available from: <http://www.wormbook.org>.
126. Mango, S.E. *The C. elegans pharynx: a model for organogenesis*. The *C. elegans* Research Community, *WormBook* 2007 Jan 22 [cited 2021 24.05.]; Available from: <http://www.wormbook.org>.
127. 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.
128. Pilon, M. and C. Mörck, *Development of Caenorhabditis elegans pharynx, with emphasis on its nervous system*. Acta Pharmacologica Sinica, 2005. **26**(4): p. 396-404.
129. Raizen, D.M. and L. Avery, *Electrical activity and behavior in the pharynx of Caenorhabditis elegans*. Neuron, 1994. **12**(3): p. 483-95.
130. 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.
131. Chalfie, M., et al., *The neural circuit for touch sensitivity in Caenorhabditis elegans*. The Journal of Neuroscience, 1985. **5**(4): p. 956.
132. Peterson, R.T., et al., *Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study*. Neurotoxicology, 2008. **29**(3): p. 546-555.
133. Nass, R., et al., *Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 3264-9.
134. Wolozin, B., et al., *Watching worms whither: modeling neurodegeneration in C. elegans*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011. **100**: p. 499-514.
135. Helmcke, K.J., et al., *Characterization of the effects of methylmercury on Caenorhabditis elegans*. Toxicology and applied pharmacology, 2009. **240**(2): p. 265-272.
136. Aschner, M., et al., *Metal-induced neurodegeneration in C. elegans*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2013. **5**(18).
137. Boyd, W.A., S.J. McBride, and J.H. Freedman, *Effects of genetic mutations and chemical exposures on Caenorhabditis elegans feeding: evaluation of a novel, high-throughput screening assay*. PLoS One, 2007. **2**(12): p. e1259.
138. 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.
139. Ju, J., et al., *Cyanobacterial xenobiotics as evaluated by a Caenorhabditis elegans neurotoxicity screening test*. International journal of environmental research and public health, 2014. **11**(5): p. 4589-4606.
140. Avery, L. and B.B. Shtonda, *Food transport in the C. elegans pharynx*. Journal of Experimental Biology, 2003. **206**(14): p. 2441.

141. 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.
142. Hazra, B., S. Biswas, and N. Mandal, *Antioxidant and free radical scavenging activity of Spondias pinnata*. BMC Complement Altern Med, 2008. **8**: p. 63.
143. Shenkman, B.S., et al., *Skeletal muscle activity and the fate of myonuclei*. Acta naturae, 2010. **2**(2): p. 59-66.
144. Cao, Z., et al., *Ginkgo biloba extract EGb 761 and Wisconsin Ginseng delay sarcopenia in Caenorhabditis elegans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2007. **62**(12): p. 1337-45.
145. Lant, B. and W.B. Derry, *Fluorescent visualization of germline apoptosis in living Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harb Protoc, 2014. **2014**(4): p. 420-7.
146. Hoffman, S., et al., *C. elegans CEP-1/p53 and BEC-1 are involved in DNA repair*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88828.
147. Garigan, D., et al., *Genetic analysis of tissue aging in Caenorhabditis elegans: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation*. Genetics, 2002. **161**(3): p. 1101-12.
148. Gerstbrein, B., et al., *In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2005. **4**(3): p. 127-37.
149. Kamath, R.S. and J. Ahringer, *Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans*. Methods, 2003. **30**(4): p. 313-21.
150. Crone, B., et al., *Elemental bioimaging of Cisplatin in Caenorhabditis elegans by LA-ICP-MS*. Metallomics, 2015. **7**(7): p. 1189-95.
151. Zhu, B., et al., *Functional analysis of epilepsy-associated variants in STXBP1/Munc18-1 using humanized Caenorhabditis elegans*. Epilepsia, 2020. **61**(4): p. 810-821.
152. 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*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 22940.
153. Amptoulach, S. and N. Tsavaris, *Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues*. Chemother Res Pract, 2011. **2011**: p. 843019.
154. Hemmingsson, O., et al., *ASNA-1 activity modulates sensitivity to cisplatin*. Cancer Res, 2010. **70**(24): p. 10321-8.
155. Gu, X. and J.E. Manautou, *Molecular mechanisms underlying chemical liver injury*. Expert Rev Mol Med, 2012. **14**: p. e4.
156. Jiang, X., B. Du, and J. Zheng, *Glutathione-mediated biotransformation in the liver modulates nanoparticle transport*. Nat Nanotechnol, 2019. **14**(9): p. 874-882.
157. Cui, Y., et al., *The neuroprotective effects of aspirin following crush injury to rat sciatic nerve*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(10): p. 18185-90.
158. De Cristóbal, J., et al., *Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats*. J Neurochem, 2001. **79**(2): p. 456-9.
159. 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.
160. Li, P., et al., *Chronic exposure to graphene-based nanomaterials induces behavioral deficits and neural damage in Caenorhabditis elegans*. J Appl Toxicol, 2017. **37**(10): p. 1140-1150.

161. 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.
162. John, T., N. Lomeli, and D.A. Bota, *Systemic cisplatin exposure during infancy and adolescence causes impaired cognitive function in adulthood*. Behav Brain Res, 2017. **319**: p. 200-206.
163. Lomeli, N., et al., *Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats*. Free radical biology & medicine, 2017. **102**: p. 274-286.
164. Aslund, F., K.D. Berndt, and A. Holmgren, *Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30780-6.
165. Caito, S.W. and M. Aschner, *Quantification of Glutathione in Caenorhabditis elegans*. Curr Protoc Toxicol, 2015. **64**: p. 6.18.1-6.
166. Peters, U., et al., *Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin*. Anticancer Drugs, 2000. **11**(8): p. 639-43.
167. González-Hunt, C.P., et al., *Exposure to mitochondrial genotoxins and dopaminergic neurodegeneration in Caenorhabditis elegans*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114459.
168. Lei, X.G., et al., *Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications*. Physiol Rev, 2016. **96**(1): p. 307-64.
169. Low, P.A., K.K. Nickander, and H.J. Tritschler, *The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy*. Diabetes, 1997. **46 Suppl 2**: p. S38-42.
170. Cascinu, S., et al., *Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. J Clin Oncol, 2002. **20**(16): p. 3478-83.
171. Samuni, Y., et al., *The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(8): p. 4117-29.
172. Abdel-Wahab, W.M. and F.I. Moussa, *Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation*. Drug design, development and therapy, 2019. **13**: p. 1155-1162.
173. Spencer, C.M. and K.L. Goa, *Amifostine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector*. Drugs, 1995. **50**(6): p. 1001-31.
174. Calabro-Jones, P.M., et al., *Uptake of WR-2721 derivatives by cells in culture: identification of the transported form of the drug*. Cancer Res, 1988. **48**(13): p. 3634-40.
175. Verstappen, C.C.P., et al., *In Vitro Protection from Cisplatin-induced Neurotoxicity by Amifostine and its Metabolite WR1065*. Journal of Neuro-Oncology, 1999. **44**(1): p. 1-5.
176. Gu, J., et al., *Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials*. PloS one, 2014. **9**(5): p. e95968-e95968.
177. Capizzi, R.L., *Amifostine reduces the incidence of cumulative nephrotoxicity from cisplatin: laboratory and clinical aspects*. Semin Oncol, 1999. **26**(2 Suppl 7): p. 72-81.
178. Nakamura, J., L.M. Shaw, and D.Q. Brown, *Hydrolysis of WR2721 by Mouse Liver Cell Fractions*. Radiation Research, 1987. **109**(1): p. 143-152.

179. De Cristóbal, J., et al., *Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation*. Stroke, 2002. **33**(1): p. 261-7.
180. Ferreira, L.F., K.S. Campbell, and M.B. Reid, *N-acetylcysteine in handgrip exercise: plasma thiols and adverse reactions*. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2011. **21**(2): p. 146-54.
181. Giampreti, A., et al., *N-Acetyl-Cysteine as Effective and Safe Chelating Agent in Metal-on-Metal Hip-Implanted Patients: Two Cases*. Case reports in orthopedics, 2016. **2016**: p. 8682737-8682737.
182. Treskes, M., et al., *Effects of the modulating agent WR2721 and its main metabolites on the formation and stability of cisplatin-DNA adducts in vitro in comparison to the effects of thiosulphate and diethyldithiocarbamate*. Biochem Pharmacol, 1992. **43**(5): p. 1013-9.
183. García-Rodríguez, F.J., et al., *Genetic and cellular sensitivity of Caenorhabditis elegans to the chemotherapeutic agent cisplatin*. Disease models & mechanisms, 2018. **11**(6): p. dmm033506.
184. Park, J.-M. and T.-H. Kang. *DNA Slot Blot Repair Assay*. 2015.
185. LeDoux, S.P., et al., *Mitochondrial DNA repair: a critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults*. Neuroscience, 2007. **145**(4): p. 1249-1259.
186. Kolahdouzan, M. and M.J. Hamadeh, *The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases*. CNS neuroscience & therapeutics, 2017. **23**(4): p. 272-290.
187. Godwin, A.K., et al., *High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 3070-4.
188. Chen, H.H.W. and M.T. Kuo, *Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy*. Metal-based drugs, 2010. **2010**: p. 430939.
189. Stergiou, L., et al., *The nucleotide excision repair pathway is required for UV-C-induced apoptosis in Caenorhabditis elegans*. Cell Death Differ, 2007. **14**(6): p. 1129-38.
190. Lockery, S.R., et al., *A microfluidic device for whole-animal drug screening using electrophysiological measures in the nematode C. elegans*. Lab on a chip, 2012. **12**(12): p. 2211-2220.
191. Elvin, M., et al., *A fitness assay for comparing RNAi effects across multiple C. elegans genotypes*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 510.
192. Gomez-Amaro, R.L., et al., *Measuring Food Intake and Nutrient Absorption in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2015. **200**(2): p. 443-54.
193. Yip, Z.C. and M.G. Heiman, *Duplication of a Single Neuron in C. elegans Reveals a Pathway for Dendrite Tiling by Mutual Repulsion*. Cell Rep, 2016. **15**(10): p. 2109-2117.
194. JG, D.E.A., et al., *Protective Effect of Melatonin on Cisplatin-induced Ototoxicity in Rats*. Anticancer Res, 2019. **39**(5): p. 2453-2458.
195. Ko, J.W., et al., *Melatonin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in rats via induction of anti-aging protein, Klotho*. Food Chem Toxicol, 2019. **129**: p. 201-210.
196. Cankara, F.N., et al., *Agomelatine confers neuroprotection against cisplatin-induced hippocampal neurotoxicity*. Metab Brain Dis, 2020.
197. Zajaczkowska, R., et al., *Mechanisms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).

## 6 Anhang

**Anhang 1:** Bestimmung der 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen nach Cisplatin-Exposition und NAC-, WR 1065- und ASS-Post-Inkubation mittels Southwestern-Blot.

### Southwestern-Blot Analyse

Um die Bildung von 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen nachzuweisen, wurde ein Southwestern-Blot durchgeführt, wie durch F.J. García-Rodríguez beschrieben [1, 183]. Der Versuchsaufbau entsprach dem von Wellenberg et al., die durch diese Methode bereits die Bildung von 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen für die Cisplatin-Konzentrationen 50 - 150  $\mu\text{M}$  nachweisen konnten [1]. Durch den Southwestern-Blot, auch Slot-Blot genannt, kann der Cisplatin-induzierte DNA-Schaden mittels Antikörper-vermittelter Detektion sichtbar gemacht werden.

Um das Experiment mit der Messung des Pharynxpumpens und des Platin-Gesamtgehalts vergleichbar zu machen, erfolgte die Inkubation der Nematoden mit Cisplatin bzw. mit den verschiedenen Testsubstanzen wie bisher beschrieben. Um ausreichend DNA isolieren zu können, war mindestens eine Anzahl von 400 Nematoden pro Versuchsgruppe notwendig. Die Dauer des Experiments betrug insgesamt 96 h. Die DNA-Isolation erfolgte für jede Gruppe nach 48 h und 96 h, die Messung mittels Southwestern-Blot erfolgte anschließend für alle Gruppen gemeinsam.

### DNA-Isolation

Die DNA der Versuchstiere konnte mit Hilfe des Pipettierroboters *QIAcube* gewonnen werden. Hierfür wurden die Nematoden mit dem dazugehörigen *DNeasy® Blood & Tissue Kit* nach Herstellerprotokoll vorbereitet. Der Inhalt eines Wells wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, bei 5000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und 80 % des Überstandes verworfen. Um die verbliebenen Bakterien vollständig zu entfernen, wurden die Pellets mehrfach in M9-Puffer gewaschen und wieder zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde 180  $\mu\text{l}$  ATL-Puffer auf jedes Pellet gegeben und mittels Vortexer vermischt. Die Lysierung erfolgte durch Zugabe von jeweils 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K mit anschließend 3-stündiger Inkubation bei 55 °C unter gelegentlichem Verwirbeln. Die anschließende DNA-Isolation und Aufreinigung erfolgte durch den vollautomatischen *QIAcube*. Nach Überführen der Proben in den *QIAcube* wurde das

Programm „DNA Blood and Tissue - Tissue Rodent“ gewählt. Die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA erfolgte mittels Nanodrop.

### Slot-Blot

Zur Orientierung diene das Slot-Blot Protokoll von Park und Kang [184]. Aus jeder Versuchsgruppe wurden 100 ng DNA mit TE-Puffer auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt. Es folgte die Denaturierung der Proben bei 95 °C für 10 Minuten und die anschließende Abkühlung auf Eis. Unterdessen erfolgte die Vorbereitung der Slot-Blot Apparatur. Zuerst mussten die Nitrozellulosemembran und drei Whatman-Filterpapiere passgenau zugeschnitten und für 10 Minuten in 6 x SSC inkubiert werden. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran oberhalb der Whatman-Filterpapiere in die Apparatur eingelegt, welche zuvor mit dH<sub>2</sub>O befeuchtet und luftdicht mittels Parafilm verschlossen worden war [183]. Die vollständig vorbereitete Slot-Blot Apparatur wurde an eine Vakuum-Pumpe angeschlossen.

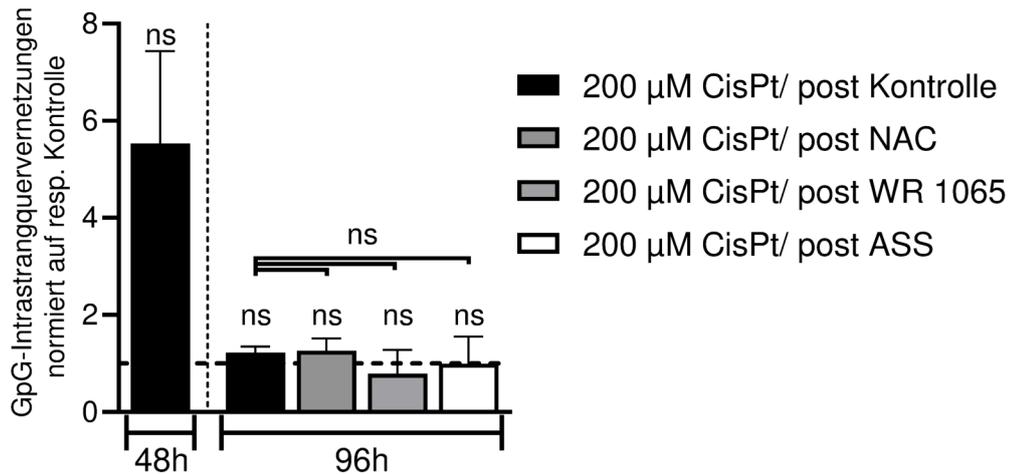
Unmittelbar vor Auftragen der Proben in die Slot-Blot Apparatur wurden diese jeweils mit 100 µl eiskaltem Ammoniumacetat [2 M] vermischt, sodass jede Probe ein Gesamtvolumen von 200 µl hatte. In Vertiefungen ohne Probenmaterial wurden 200 µl TE-Puffer gegeben. Anschließend wurde die Vakuumpumpe aktiviert und die Proben durch den Unterdruck durch die Membran gefiltert. Um eine höhere Fixierung auf der Membran zu erreichen, wurden anschließend 400 µl 2 x SSC in die Probenspalten gegeben. Im Anschluss wurde die Membran aus der Apparatur genommen, ihre Oberseite markiert und mit Ammoniumacetat [1 M] gewaschen. Danach erfolgte die Hitze-fixierung für 2 h bei 80 °C in einem Trockenschrank. Der letzte Schritt des ersten Arbeitstages war das Waschen der Membran in TBST für 10 Minuten und das Blockieren der Membran in Milchpulver (5 %), die über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler gelagert wurde.

Am darauffolgenden Arbeitstag erfolgte die Auftragung der Antikörper. In Vorbereitung darauf wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten mit TBST gewaschen. Im Anschluss erfolgte die einstündige Inkubation mit dem für 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen spezifischen Primärantikörper von Abcam (ab103261) in einer Verdünnung von 1:1000 bei Raumtemperatur und stetiger Rotation. Im Anschluss wurde die Membran viermal für jeweils 15 Minuten mit TBST gewaschen bevor der Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:2000 für 2 h bei Raumtemperatur hinzugegeben wurde. Darauf folgte erneut eine vierfache Waschung in TBST für 15 Minuten.

Die Visualisierung erfolgte mittels Chemilumineszenz (Antikörperdetektion mittels ECL-Reaktion). Dazu wurde die Lösung des ECL-Chemilumineszenz-Kits gleichmäßig auf der Membran verteilt und das Ergebnis mittels *ChemiDoc Touch Imaging System* von *Bio-Rad* aufgenommen. Um eine korrekte Aussage über die Anzahl der 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen treffen zu können, musste die Fluoreszenz-Intensität der Chemilumineszenz-Aufnahmen in ein Verhältnis zu dem DNA-Gehalt der jeweiligen Probe gesetzt werden. Um den DNA-Gehalt zu ermitteln, wurde die Membran nach Abschluss der Chemilumineszenz-Aufnahmen für 30 Minuten mit Methylblau angefärbt und abermals die Fluoreszenz-Intensität mittels *ChemiDoc Touch* von *Bio-Rad* aufgenommen, diesmal jedoch im Auflicht Modus (*Colorimetric*). Die Analyse der Fluoreszenz-Intensität beider Aufnahmen erfolgte mit der Software *ImageLab*.

**Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper.**

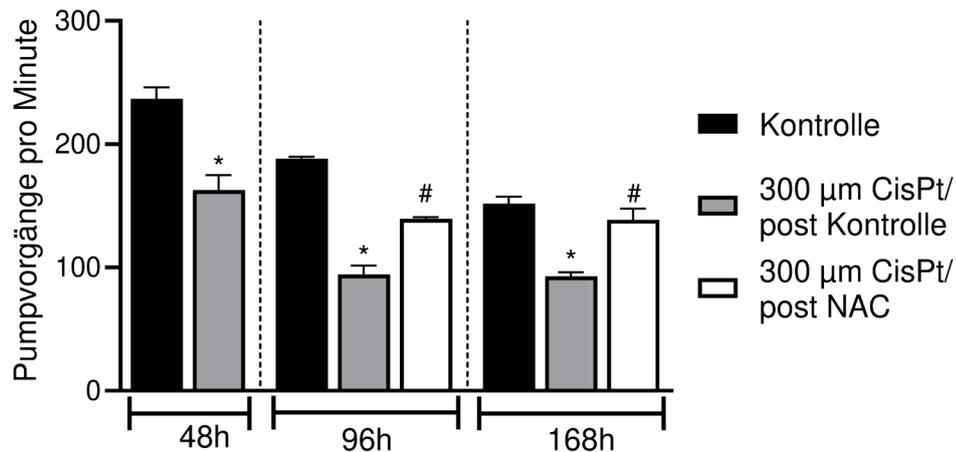
Primärantikörper (Southwesternblot)	Spezifisch gegen 1,2-GpG- Intrastrangquervernetzungen Abcam, Cambridge (Großbritannien) ab103261 Verdünnung: 1:1000
Sekundärantikörper (Southwesternblot)	Mit Peroxidase gekoppelt Anti-Ratte IgG Rockland, Limerick (USA) Art.-Nr. 612-4326 Verdünnung: 1:2000



**Abbildung 22: NAC-, WR 1065- und ASS-Post-Inkubation verändern die Anzahl der 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen nicht.**

Dargestellt wird die Detektion von 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen mittels Southwestern-Blot nach Gabe von Cisplatin und einer Nachbehandlung mit den Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS. Für das Experiment wurden mindestens 400 wildtypische Nematoden im L4-Stadium verwendet ( $N \geq 400$  Individuen). Die Versuchsgruppen wurden über 48 h mit Cisplatin [200 µM] behandelt, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend eine Inkubation in S-Medium<sub>K</sub> über den gesamten Zeitraum. Im Anschluss erfolgte für die Versuchsgruppen eine Post-Inkubation über weitere 48 h in S-Medium<sub>K</sub> („post Kontrolle“), mit 5 mM NAC („post NAC“), mit 100 µM WR 1065 (4 x in 48 h, „post WR 1065“) und mit 0,5 mM ASS („post ASS“). Die DNA-Gewinnung erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 h und 96 h, die Durchführung des Slot-Blots für alle Gruppen anschließend gemeinsam. Die Visualisierung erfolgte über die Antikörperdetektion mittels ECL-Reaktion und mit Methylenblau. Die Analyse der Banden-Intensität erfolgte mit der Software *ImageLab*. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen ( $n = 3$ ). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte für jeden Messzeitpunkt mit Hilfe des T-Tests und der One-Way ANOVA ( $ns =$  nicht signifikant mit  $p \geq 0,05$  vs. respektive Kontrolle) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni. Zu keinem Messzeitpunkt ist die Intensität der Cisplatin-Banden gegenüber der Intensität der Banden der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht. Eine solche Tendenz lässt sich aber insbesondere für den Messzeitpunkt 48 h feststellen. Die Post-Inkubation mit den respektiven Testsubstanzen verändert die Anzahl der 1,2-GpG-Intrastrangquervernetzungen gegenüber der Post-Inkubation in Kontrollmedium nicht signifikant. Jedoch ist nach 96 h auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Cisplatin-Gruppen und der unbehandelten Kontrolle festzustellen.

**Anhang 2:** Bestimmung der pharyngealen Pumprate nach Erhöhung des Cisplatin-Pulses auf 300  $\mu\text{M}$  und Post-Inkubation mit NAC in *C. elegans*



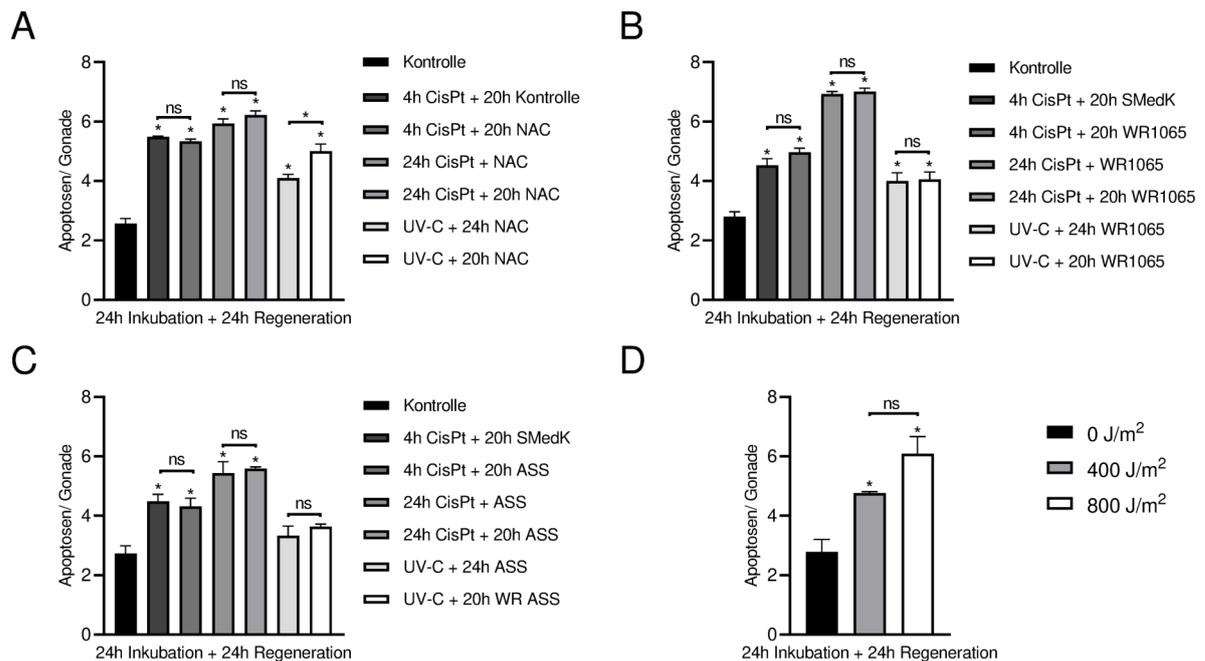
**Abbildung 23:** Eine 48-stündige Puls-Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin zeigt stärker ausgeprägte Effekte als eine Puls-Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin.

Dargestellt wird die Anzahl der Pumpvorgänge des Pharynx pro Minute (ppm) nach Gabe von Cisplatin und einer Nachbehandlung mit der Testsubstanz NAC [5 mM]. Für das Experiment wurden wildtypische Nematoden im L4-Stadium verwendet und die Pumpvorgänge pro Minute für mindestens 10 Nematoden pro Versuchsgruppe und Messzeitpunkt mindestens zweimalig gezählt. Anschließend wurde ein Mittelwert kalkuliert. Die unbehandelte Kontrollgruppe erhielt S-Medium<sub>K</sub> über den gesamten Zeitraum. Die Versuchsgruppe wurde über 48 h mit Cisplatin [300  $\mu\text{M}$ ] behandelt, im Anschluss erfolgte eine Post-Inkubation („post“) über 120 h in S-Medium<sub>K</sub> („post Kontrolle“) und mit 5 mM NAC („post NAC“). Die Messung des Pharynxpumpens erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 h, 96 h und 168 h bei 20 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der ppm aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3) mit jeweils min. 10 Individuen pro Versuchsgruppe (N  $\geq$  10). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte für jeden Messzeitpunkt mit Hilfe der One-Way ANOVA (\*p  $\leq$  0,05 vs. respektive Kontrolle, #p  $\leq$  0,05 Cisplatin vs. NAC-Post-Inkubation) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni.

Eine 48-stündige Cisplatin-Puls-Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  ist in der Lage, die pharyngeale Pumprate in der Cisplatin-Gruppe mit anschließender Post-Inkubation in Kontrollmedium stärker abzusinken als eine Puls-Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin (siehe Abbildung 12). Nach 48 h sinkt die Pumprate um 32 % auf 68 % bei einer Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin (von 237  $\pm$  9 ppm auf 162  $\pm$  12 ppm) im Gegensatz zu einer Reduktion um nur 21 % auf 79 % bei Gabe von 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin (von 224  $\pm$  3 ppm auf 177  $\pm$  9 ppm) ab, nach 96 h halbiert sie sich bereits von 188  $\pm$  2 ppm zu 94  $\pm$  7 ppm (300  $\mu\text{M}$  Cisplatin) im Gegensatz zu einer Verringerung um lediglich 22 % bei einer Cisplatin-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  (von 208  $\pm$  1 ppm zu 163  $\pm$  5 ppm). Auch nach 168 h ist sie bei 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin mit einer Verringerung um 40 % (152  $\pm$  6 ppm zu 92  $\pm$  3 ppm) stärker reduziert als bei 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin mit einer Verringerung von 28 % (176  $\pm$  7 ppm zu 127  $\pm$  7 ppm, jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM).

Auch die Protektion hat dadurch einen prozentual stärkeren Effekt, hier erfolgt ein Vergleich anhand der Post-Inkubation mit NAC. Für die Cisplatin-Puls-Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin beträgt die prozentuale Erhöhung durch eine Post-Inkubation mit 5 mM NAC nach 96 h ca. 20 % (von 163  $\pm$  5 ppm auf 195  $\pm$  7 ppm) und nach 168 h ca. 23 % (von 127  $\pm$  7 ppm auf 156  $\pm$  5 ppm) [1]. Für eine Cisplatin-Puls-Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin beträgt die prozentuale Erhöhung durch eine Post-Inkubation mit 5 mM NAC hingegen 48 % (von 94  $\pm$  7 ppm auf 139  $\pm$  2 ppm) und nach 168 h sogar 51 % (von 92  $\pm$  3 ppm auf 139  $\pm$  9 ppm, immer Mittelwert  $\pm$  SEM). Damit kann durch eine Puls-Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin sowohl eine prozentual stärkere Verringerung der pharyngealen Pumprate als auch eine stärkere Protektion durch eine Post-Inkubation mit NAC [5 mM] erwirkt werden als durch eine Puls-Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin.

### Anhang 3: Bestimmung der Keimzellapoptose nach Cisplatin- und UV-C-Exposition und NAC-, WR 1065- und ASS-Post-Inkubation in *C. elegans*.



#### Abbildung 24: Absolute Anzahl der Apoptosen aller Versuchsgruppen und Positiv-Kontrolle.

Dargestellt ist die absolute Anzahl der Apoptosen pro Gonade nach UV-C-Bestrahlung bzw. Gabe von Cisplatin und einer Nach- oder Co-Behandlung mit den Testsubstanzen NAC, WR 1065 und ASS (A-C), ergänzend zu der Darstellung der relativen Apoptoserate für diese Kandidatensubstanzen aus Abbildung 16 [1]. Für das Experiment wurden Nematoden im L4-Stadium des Reporterstamms MD701 [CED-1::GFP] verwendet (N ≥ 20 (A-C) Individuen, eine Gonade pro Individuum ausgezählt). Abbildung D zeigt lediglich die reine UV-C-Bestrahlung mit 400J/m<sup>2</sup> und 800 J/m<sup>2</sup> (hier galt N ≥ 12). Die Versuchsgruppen erhielten über 4 h Cisplatin in einer Konzentration von 200 µM und eine Post-Inkubation über weitere 20 h in S-Medium<sub>K</sub> und mit 5 mM NAC, mit 100 µM WR 1065 (4 x in 20 h) [1] oder mit 0,5 mM ASS, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend über 24 h S-Medium<sub>K</sub>. Außerdem wurden zwei Co-Inkubationen durchgeführt, zum einen für 24 h mit Cisplatin und mit der jeweiligen Testsubstanz, zum anderen für 4 h mit Cisplatin allein und für 20 h gemeinsam mit der Testsubstanz. Die Bestrahlung in Abbildung A-C erfolgte als Positivkontrolle mit 800 J/m<sup>2</sup>, eine Post-Inkubation folgte für 24 h bzw. 20 h in der jeweiligen Testsubstanz. Die Messung der Apoptoserate erfolgte nach 24 h Inkubation und weiteren 24 h Regeneration unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10-facher Vergrößerung und 250 ms im FITC-Filter. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3). Die statistische Überprüfung möglicher signifikanter Unterschiede zur respektiven Kontrolle erfolgte mit Hilfe der One-Way ANOVA (\*p ≤ 0,05 vs. respektive Kontrolle, ns = nicht signifikant mit p ≥ 0,05) und dem Post-hoc Test nach Bonferroni.

Alle Versuchsgruppen außer die UV-C Bestrahlungen in Kombination mit ASS zeigen eine gegenüber der unbehandelten Versuchsgruppe erhöhte Anzahl von Apoptosen (\* in A-D). Sowohl 400J/m<sup>2</sup> als auch 800 J/m<sup>2</sup> erhöhen die Apoptoserate gegenüber der Kontrolle, unterscheiden sich jedoch untereinander nicht (ns in D). Die Post-Inkubation mit NAC und WR 1065 verringert die Apoptoserate nach Cisplatin-Exposition nicht [1] (A-B, siehe Abbildung 16). Gleiches gilt für die Post-Inkubation mit ASS (C). Die 24-stündige Inkubation mit Cisplatin erhöht die Apoptoserate, unabhängig von der Länge und Auswahl der gleichzeitig gegebenen Testsubstanz (A-C). Die Apoptoserate nach UV-C-Bestrahlung ist nach Post-Inkubation mit ASS (für 20 h oder 24 h) nicht mehr signifikant höher als die der unbehandelten Kontrolle (C). Sonst kann nur die sofortige, 24-stündige Post-Inkubation mit NAC die UV-C induzierte Apoptose gegenüber einer erst 4 h später begonnenen 20-stündigen NAC-Post-Inkubation senken (A). Für die anderen Substanzen zeigt sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied.

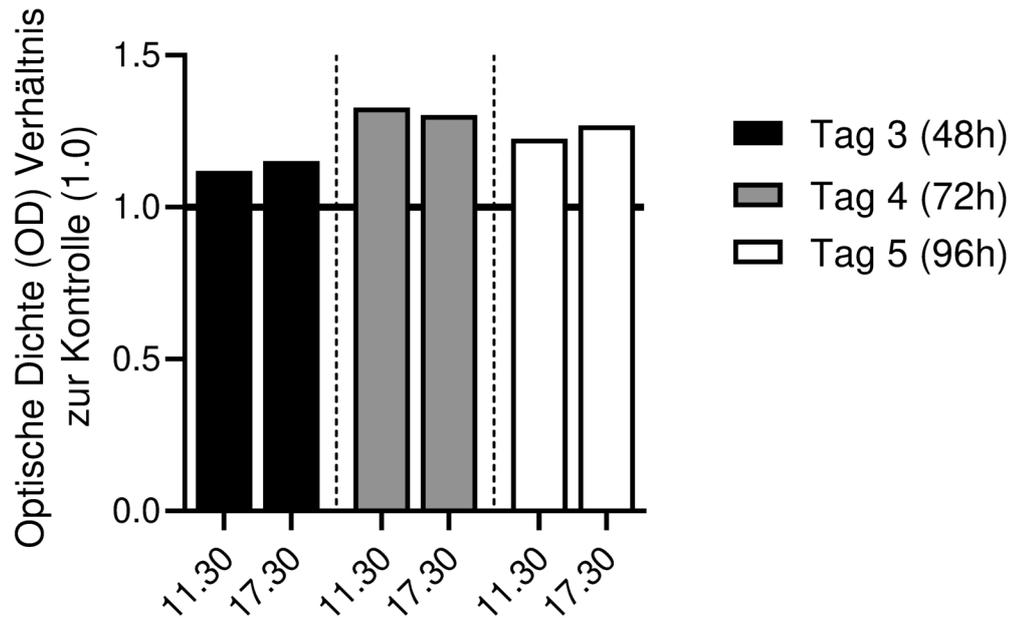
#### **Anhang 4:** Bestimmung der optischen Dichte mittels *Clearance-Assay*.

##### Clearance-Assay

Der *Clearance-Assay* beschreibt eine indirekte Methode zur Abschätzung der pharyngealen Pumprate über die photometrische Messung der optischen Dichte (OD). Die Methode ist modifiziert nach dem „*Fitness Assay*“, wie er durch Elvin et al. beschrieben wurde [191] sowie nach dem „*Food Intake (OD<sub>600</sub>) Assay*“, beschrieben von Gomez-Amaro et al. [192]. Gemessen wird die OD des Flüssigmediums, in welchem die Nematoden inkubiert werden. Eine Verringerung der OD spricht dabei für eine hohe Pumprate der Nematoden, da weniger Bakterien im Medium vorhanden sind.

Für die im Folgenden gezeigte einmalige Messung wurden pro Versuchsgruppe jeweils exakt 30 junge adulte wildtypische Nematoden verwendet und bei 20 °C für insgesamt 96 h in 60 µl Flüssigmedium (S-Medium<sub>K</sub>) in einer 96er-Well-Platte inkubiert. Die Versuchsgruppe erhielt über die ersten 48 h 200 µM Cisplatin und im Anschluss für die weiteren 48 h eine Inkubation in S-Medium<sub>K</sub>. Die Kontrollgruppe erhielt über den entsprechenden Zeitraum nur S-Medium<sub>K</sub>. Der Medienwechsel erfolgte wie bei den anderen Untersuchungen nach 48 h. Die Messung der OD erfolgte jeweils um 11.30 Uhr und um 17.30 Uhr an Tag 3 (entspricht ca. dem Messzeitpunkt 48 h im regulären Versuchsaufbau), an Tag 4 und an Tag 5 (entspricht ca. dem Messzeitpunkt 96 h im regulären Versuchsaufbau). Es erfolgte eine Normierung auf die respektive Kontrollgruppe. Das Experiment wurde nur einmal durchgeführt, mit jeweils drei technischen Replikaten.

Zu allen Messzeitpunkten konnte eine Tendenz hin zu einer erhöhten OD der Cisplatin-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die verringerte pharyngeale Pumprate zurückzuführen. Eine statistische Analyse war bei nur einmaliger Testung nicht möglich.



**Abbildung 25: Clearance-Assay.**

Dargestellt wird die photometrisch gemessene optische Dichte (OD) in einem 96er-Well der Cisplatin-Gruppe im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Für das Experiment wurden exakt 30 wildtypische Nematoden im L4-Stadium verwendet (N = 30 Individuen) und mit 60  $\mu$ l Medium in einer 96-Well Platte bei 20 °C inkubiert. Die Versuchsgruppe erhielt über die ersten 48 h Cisplatin [200  $\mu$ M] und im Anschluss für die weiteren 48 h S-Medium<sub>K</sub>, die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub> über den gesamten Zeitraum. Die Messung der optischen Dichte mittels Photometer erfolgte an den Tagen 3, 4 und 5 jeweils zweimal täglich um 11.30 Uhr und um 17.30 Uhr. Die Messzeitpunkte entsprechen der Messung des pharyngealen Pumpens (Tag 3 entspricht 48 h, Tag 5 entspricht 96 h). Dargestellt ist die OD der Cisplatin-Gruppe im Verhältnis zu der OD der Kontrollgruppe aus einem einmaligen Versuch (n = 1), weshalb keine statistische Überprüfung erfolgen konnte.

Es zeigt sich zu allen Messzeitpunkten eine Tendenz hin zu einer erhöhten OD der Cisplatin-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe, was höchstwahrscheinlich auf die verringerte pharyngeale Pumprate zurückzuführen ist.

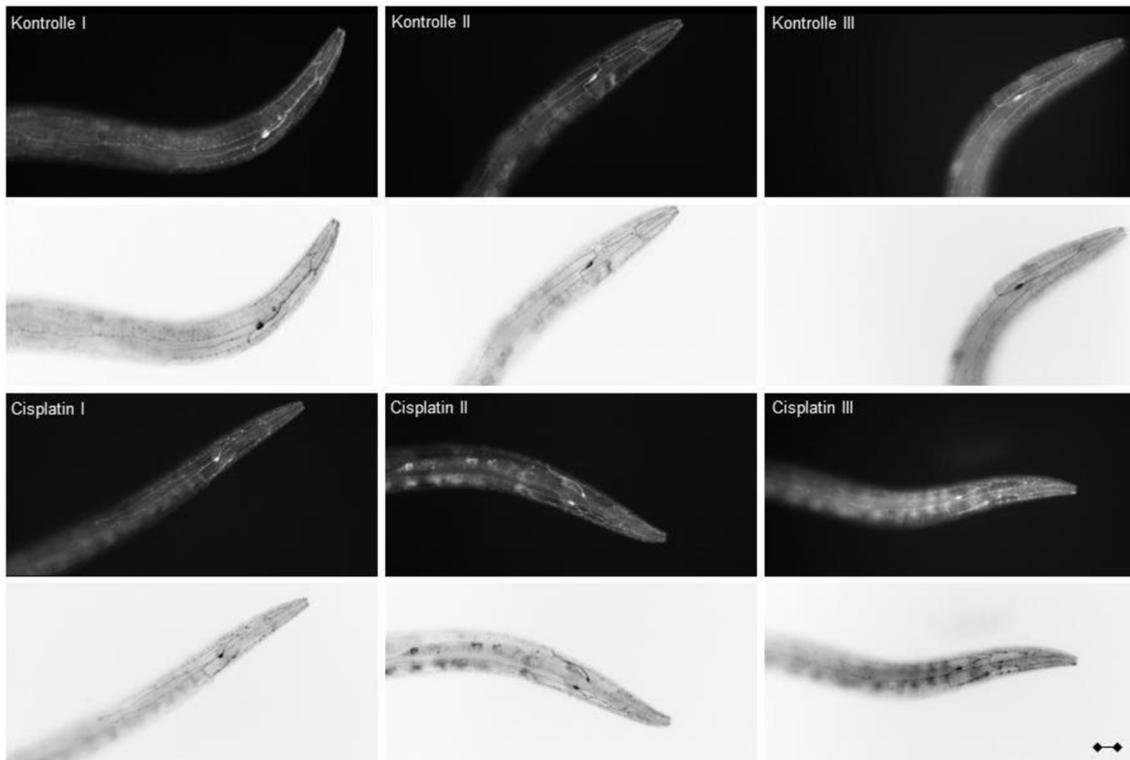
## **Anhang 5:** Wirkung von Cisplatin auf die Morphologie des Nervensystems des Reporterstamms STR198.

### Auswertung des Reporterstamms STR198

Um die Wirkung von Cisplatin auf die neuronalen Verbindungen von *C. elegans* beurteilen zu können, wurde der Reporterstamm STR198 hrtls3 [des-2p::myr::GFP + unc-122p::DsRed]. hrtEx52 [des-2p::mKate::GS1(high) + unc-119(+) + myo-2p::tdTomato] genutzt, welcher unserer Arbeitsgruppe von Martin Harterink (Universität Utrecht) geschenkt wurde [1]. Hieran konnte die Verzweigung der GFP-markierten PVD-Neurone nach Gabe von Cisplatin untersucht werden [1]. Die PVD-Neurone sind von mechanosensorischer Qualität und liegen in der Körperwand [125]. Von ihnen gehen viele, sich verzweigende dendritische Ausläufer ab [193].

Der Versuchsaufbau erfolgte wie durch Wellenberg et al. beschrieben [1]. Pro Versuchsgruppe wurden mindestens 30 Nematoden im L4-Stadium für 96 h bei 20 °C in Flüssigmedium inkubiert. S-Medium<sub>K</sub> diente als Kontrollmedium, Cisplatin [400 µM] war die zu testende Substanz. Ein Medienwechsel erfolgte nach 48 h. Nach 96 h wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mittels FITC-Filter gemacht. Hierzu wurden die Nematoden mit einem Tropfen Natriumazid [15 mM] auf ein Agarose-Pad gegeben und mindestens 30 Tiere pro Gruppe mit dem FITC-Filter bei 250 ms Belichtung und 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Das Experiment wurde jeweils dreimal wiederholt.

Es konnte kein offensichtlicher morphologischer Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der Cisplatin-Gruppe festgestellt werden [1]. Es ist jedoch keine automatisierte, objektivierte Auswertung erfolgt.



**Abbildung 26: Morphologie des Nervensystems nach Cisplatin-Behandlung des Reporterstamms STR198.**

Dargestellt sind repräsentative Original-Aufnahmen (schwarz) sowie die dazugehörigen invertierten Bilder (weiß) jeweils eines Nematoden des Reporterstamms STR198, dessen sensorische PVD-Neurone GFP-markiert sind. Gezeigt werden drei unabhängige Versuche (I – III,  $n = 3$ ) mit jeweils einer Kontrollgruppe und einer Cisplatin-Gruppe pro Versuchsdurchgang bei 10-facher Vergrößerung.

Für das Experiment wurden mindestens 30 Nematoden im L4-Stadium des Reporterstamms STR198 verwendet ( $N \geq 30$  Individuen). Die Versuchsgruppen erhielten über 96 h Cisplatin [400  $\mu\text{M}$ ], die Kontrollgruppe erhielt entsprechend S-Medium<sub>K</sub>. Ein Medienwechsel erfolgte nach 48 h. Die Aufnahme erfolgte nach 96 h Inkubationszeit unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10-facher Vergrößerung und 250 ms Belichtung im FITC-Filter. Der Maßstabbalken definiert eine Länge von 50  $\mu\text{m}$  [1].

Ein offensichtlicher Unterschied der Morphologie des Nervensystems zwischen den beiden Gruppen konnte nicht festgestellt werden [1].

# Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz für die Möglichkeit, diese Promotion im Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität durchführen zu können. Außerdem möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens und die hilfreichen Anregungen zu dieser Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Marc Remke für die freundliche Bereitschaft, sich als Zweitgutachter zur Verfügung zu stellen.

Ein besonderer Dank richtet sich an die *C. elegans* Arbeitsgruppe. Vor allem möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Sebastian Honnen für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit und damit für die Einblicke in diesen interessanten Bereich der Wissenschaft bedanken. Du hast mich sehr für diesen Teil der Medizin begeistern können und mich auch persönlich inspiriert. Außerdem danke ich Anna, an die ich mich jederzeit wenden konnte und die immer einen guten Ratschlag für mich hatte. Besonders möchte ich mich auch bei Andreas für seine tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken, du hattest immer ein offenes Ohr für mich.

Niklas und Lilli möchte ich für ihre Hilfe und Geduld während der gesamten Zeit danken.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren unermüdliche Unterstützung das gesamte Studium und auch diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Vielen Dank für euer bedingungsloses Vertrauen.