

**Crosstalk between Glia Cells and Neurons under the Influence of  
Paclitaxel: Novel Insights into the ‘Chemobrain’?**

**Inaugural Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

Vorgelegt von

**Nilufar Nazarzadeh**

aus Köln

## Abstract

After chemotherapy, some patients develop long-lasting cognitive impairments, a condition known as 'chemobrain'. Patients with chemobrain may suffer from memory impairment, poor concentration, slow processing speed, and dysarthria, thus dramatically deteriorating the quality of life of affected patients. Chemobrain can occur in up to 75 % of patients receiving adjuvant chemotherapy, and therefore its understanding has become an important and indispensable task in science and medicine. Studies showed that paclitaxel, a taxane that is used in ovarian-, breast, and prostate-cancer can induce neurodegeneration and potentially cause the chemobrain condition. Paclitaxel as an antineoplastic drug alters cell proliferation and mitosis rate of tumour cells. It stabilises the microtubule organisation by binding directly to  $\beta$ -tubulins and, thus, suppresses depolymerization. Despite the actual function of paclitaxel to eliminate tumour cells by apoptosis, healthy cells such as sensory neurons of the dorsal root ganglion can be affected as well, leading to peripheral neuropathy. Studies showed that paclitaxel can lead to cytokine and chemokine release of macrophages into the dorsal root ganglia and hence, inducing inflammation. Moreover, it was shown *in vitro* that paclitaxel also exerts diverse changes in primary astrocytes and microglia.

In the healthy brain, astrocytes fulfil a multitude of functions. Most importantly, astrocytes are of great importance for the maintenance of neuronal functionality. They create the blood-brain barrier, regulate the homeostatic milieu in the extracellular space, and are responsible for the active removal of neurotransmitters in the synaptic cleft. Importantly, astrocytes maintain the brain's functions by supporting their surrounding cell entities. Another important group of glia residing in the central nervous system (CNS) are microglia, acting as immunocompetent cells. Microglia are phagocytes and remove remains of dead and degenerated neurons and glia cells, and thus also contribute to the maintenance of neuronal functionality.

To unravel the roles of astrocytes and microglia during healthy and pathological state induced by paclitaxel stimulation, diverse experiments on molecular and cellular levels were conducted with primary derived rat glia cells. For investigating the effect of glia on the functionality of neurons, the conditioned media of differently treated astrocytes, microglia and both together in co-culture were used for stimulation of cortical neurons. Functional changes were investigated by morphological and electrophysiological analyses. Transcriptomic analysis of paclitaxel treated astrocytes enabled the profiling of important genes modulated under pathological environments induced by paclitaxel.

Data revealed that paclitaxel-exposed primary astrocytes displayed an altered cytokine expression profile and up-regulated the release of neurotrophic substances like BDNF and NT 3. Microglia, on the other hand, responded to paclitaxel by releasing pro-inflammatory cytokines. However, these effects were more or less compensated when astrocytes and microglia were cultivated together.

Transcriptomic analysis of untreated astrocytes and astrocytes treated with 1  $\mu$ M paclitaxel confirmed previous data and highlight the importance of astrocytes under pathological conditions. Astrocytes underwent stimulation with paclitaxel showed upregulation in the expression of genes important for tubulin formation. This finding verified the antineoplastic effect of paclitaxel and approved structural changes of cells in the central nervous system being potentially involved in the emergence of chemotherapy-induced cognitive impairments. A highly promising finding was the upregulation of relevant growth factors. Consistent, to RT qPCR data neurotrophic factors are significantly overexpressed after paclitaxel-exposure, making astrocytes an attractive target for cancer treatment in future by offering support of neuronal maintenance. Further important changes were identified in genes for cell cycle DNA replication, astrocyte development, glutamate receptor activity, and reactive oxygen species comparing healthy and pathological astrocytes.

Furthermore, to investigate the inter-cellular communication of astrocytes and microglia that were exposed to paclitaxel with neurons, we collected the conditioned media of paclitaxel treated glia. Neuronal cultures were exposed to glia conditioned media, and we investigated the neuronal morphology as well as their activity using Multi-Electrode-Arrays (MEA) and the expression of  $Ca^{2+}$ -channels and diverse synapses. While the conditioned media of healthy astrocytes increased neuronal activity maintaining their morphology, the conditioned media of paclitaxel-treated astrocytes led to decreases neuronal activity and impaired the ramification of primary neurons *in vitro*. Opposite effects were seen for microglia. Healthy microglia had negative effects on the length and number of neuronal outgrowths. Neuronal activity was first decreased and then rose again within time after addition of the healthy microglial conditioned media, while paclitaxel-treated microglia acutely increased the spike rate of cortical neurons. Moreover, data showed that the conditioned media of glia differentially modulated the expression of pre- and postsynaptic markers, when glia were treated with paclitaxel being a potential reason for changes in neuronal activity. However, the expression profile of  $Ca^{2+}$  channels remained unchanged after stimulation with the different conditioned media. Interestingly, these extreme effects on the functionality, morphology, and expression profile of

cortical neurons were only observed for astrocytes and microglia alone, respectively, and were partly compensated in environments in which both were cultivated together.

Additionally, *in vivo* experiments were performed on control mice and mice receiving different doses of paclitaxel-injections. However, immunohistochemical stainings indicated no neuronal loss, neurogenesis, or microglial activation. On the one hand, this suggested that cognitive impairments are due to functional, and not due to structural changes. On the other hand, the question remains open, which functional changes are induced by paclitaxel and what are the underlying mechanisms *in vivo*. In this field, further investigations are necessary. Overall, we propose that data from this project reveal glial cells as potential target for therapeutic strategies to mediate neuroprotection and enhance neurorepair under pathophysiological conditions such as chemotherapy. Notwithstanding, this study shows that the communication between glia and neurons is highly complex, but extremely important for maintaining brain function. This crosstalk is severely modulated even after slight pathological changes and requires further intensive inspections for understanding the potential role of glia under pathological conditions such as the chemobrain.

## Zusammenfassung

Nach einer Chemotherapie entwickeln einige Patienten langanhaltende kognitive Beeinträchtigungen, ein Zustand, die als „Chemobrain“ bezeichnet wird. Patienten mit Chemobrain können unter Gedächtnisstörungen, schlechter Konzentration, langsamer Verarbeitungsgeschwindigkeit und Dysarthrie leiden, was die Lebensqualität der Betroffenen dramatisch beeinträchtigt. Chemobrain kann bei bis zu 75 % der Patienten auftreten, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten, und daher ist das Verständnis dieses pathologischen Zustands zu einer wichtigen und unverzichtbaren Aufgabe in Wissenschaft und Medizin geworden. Studien haben gezeigt, dass Paclitaxel, ein Taxan, das bei Eierstock-, Brust- und Prostatakrebs eingesetzt wird, eine Neurodegeneration auslösen und zum Chemobrain führen kann. Paclitaxel verändert als antineoplastisches Medikament die Zellproliferation und die Mitoserate von Tumorzellen. Es stabilisiert die Mikrotubuli-Organisation durch direkte Bindung an  $\beta$ -Tubuline und unterdrückt so die Depolymerisation. Trotz der eigentlichen Funktion von Paclitaxel, Tumorzellen durch Apoptose zu eliminieren, können auch gesunde Zellen wie sensorische Neurone des Spinalganglions betroffen sein, was zu einer peripheren Neuropathie führt. Studien haben gezeigt, dass Paclitaxel zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen von Makrophagen in die Spinalganglien führen und dadurch Entzündungen auslösen kann. Kürzlich wurde auch gezeigt, dass Paclitaxel auch *in vitro* vielfältige Veränderungen in primären Astrozyten und Mikroglia auslöst.

Im gesunden Gehirn erfüllen Astrozyten eine Vielzahl von Funktionen. Vor allem sind Astrozyten für die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionalität von großer Bedeutung. Sie bilden die Blut-Hirn-Schranke, regulieren das homöostatische Milieu im extrazellulären Raum und sind für den aktiven Abbau von Neurotransmittern im synaptischen Spalt verantwortlich. Astrozyten erhalten die Gehirnfunktionen aufrecht, indem sie die umgebenden Zelleinheiten unterstützen. Eine weitere wichtige Gruppe von Gliazellen im Zentralnervensystem (ZNS) sind Mikroglia, die als immunkompetente Zellen fungieren. Mikroglia sind Phagozyten und entfernen Reste abgestorbener und degenerierter Neuronen und Gliazellen und tragen so auch zur Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionalität bei.

Um die Rolle von Astrozyten und Mikroglia im gesunden und pathologischen Zustand, der durch die Paclitaxel-Stimulation hervorgerufen wird, aufzuklären, wurden verschiedene Experimente auf molekularer und zellulärer Ebene mit primären Rattenzellen durchgeführt. Um den Einfluss von Glia auf die Funktionalität von Neuronen zu untersuchen, wurde das konditionierte Medium unterschiedlich behandelte Astrozyten und Mikroglia in Mono- als

auch Kokultur auf kortikalen Neuronen verwendet. Funktionelle Veränderungen wurden durch morphologische und elektrophysiologische Analysen untersucht. Die transkriptomische Analyse von Paclitaxel behandelten Astrozyten ermöglichte die Profilierung wichtiger Gene, die unter pathologischen Umgebungen moduliert wurden.

Unsere Daten zeigten, dass Paclitaxel-behandelte primäre Astrozyten ein verändertes Zytokinexpressionsprofil aufwiesen und die Freisetzung neurotropher Substanzen wie BDNF und NT-3 hochregulierten. Mikroglia hingegen reagierten auf Paclitaxel mit der Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine. Diese Effekte wurden jedoch mehr oder weniger kompensiert, wenn Astrozyten und Mikroglia gemeinsam kultiviert wurden. Transkriptomische Analyse unbehandelter Astrozyten und Astrozyten, die mit 1  $\mu\text{M}$  Paclitaxel stimuliert wurden, bestätigten nicht nur frühere Daten, sondern hoben auch die Wichtigkeit von Astrozyten unter pathologischen Bedingungen hervor. Astrozyten, die mit Paclitaxel stimuliert wurden, zeigten eine Hochregulierung der Expression von Genen, die für die Tubulinbildung wichtig sind. Dieser Befund bestätigte die antineoplastische Wirkung von Paclitaxel und legte nahe, dass strukturelle Veränderungen von Zellen im Zentralnervensystem möglicherweise an der Entstehung chemotherapiebedingter kognitiver Beeinträchtigungen beteiligt sind.

Ein vielversprechender Befund war auch die Hochregulierung relevanter Wachstumsfaktoren. Den RT-qPCR-Daten zufolge wurden neurotrophe Faktoren nach Paclitaxel-Exposition deutlich überexprimiert, was Astrozyten zu einem attraktiven Ziel für die Krebsbehandlung in der Zukunft macht. Weitere wichtige Veränderungen wurden in Genen für die Zellzyklus DNA-Replikation, die Astrozytenentwicklung, die Glutamatrezeptoraktivität und reaktive Sauerstoffspezies zwischen gesunden und pathologischen Astrozyten identifiziert.

Um die interzelluläre Kommunikation von Astrozyten und Mikroglia, die Paclitaxel ausgesetzt waren, mit Neuronen zu untersuchen, sammelten wir außerdem den Überstand der Paclitaxel behandelten Gliazellen. Neuronale Kulturen wurden dem Glia-Überstand ausgesetzt und wir untersuchten die neuronale Morphologie, ihre Aktivität mithilfe von Multi-Elektroden-Arrays (MEA), und die Expression von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und verschiedenen Synapsen. Während das konditionierte Medium gesunder Astrozyten die neuronale Aktivität erhöhte und ihre Morphologie beibehielt, führte der Überstand von mit Paclitaxel behandelten Astrozyten zu einer Verringerung der neuronalen Aktivität und beeinträchtigte die Verzweigung primärer Neuronen *in vitro*. Für Mikroglia wurden gegenteilige Effekte beobachtet. Gesunde Mikroglia reduzierten die Länge und Anzahl neuronaler Auswüchse. Die neuronale Aktivität nahm zunächst ab und stieg mit der Zeit nach Zugabe des gesunden Mikroglia-Überstands wieder an, während mit Paclitaxel behandelten Mikroglia die Spike-Rate kortikaler Neuronen akut

erhöhte. Darüber hinaus zeigten Daten, dass der Glia-Überstand die Expression prä- und postsynaptischer Marker unterschiedlich modulierte, wenn Gliazellen mit Paclitaxel behandelt wurden, was ein möglicher Grund für Veränderungen der neuronalen Aktivität war. Das Expressionsprofil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle blieb jedoch nach Stimulation der verschiedenen konditionierten Medien unverändert. Interessanterweise wurden diese extremen Auswirkungen auf die Funktionalität, Morphologie und das Expressionsprofil kortikaler Neuronen, die für Astrozyten und Mikroglia in Monokultur beobachtet wurden, zum Teil in Umgebungen kompensiert, in denen beide zusammen kultiviert werden.

Zusätzlich wurden *in-vivo*-Experimente an Kontrollmäusen und Mäusen durchgeführt, denen unterschiedliche Dosen von Paclitaxel-Injektionen verabreicht wurden. Allerdings lieferten immunhistochemische Färbungen keine Hinweise auf neuronalen Verlust, Neurogenese und Mikroglia-Aktivierung. Zum einen bestätigte dies, dass Veränderungen nicht auf struktureller, sondern auf funktioneller Ebene stattfinden. Jedoch bleibt die Frage offen, wie Paclitaxel zu den funktionellen Veränderungen *in vivo* beiträgt, und was die grundlegenden Mechanismen sind. Auf diesem Gebiet sind weitere Untersuchungen notwendig.

In der Zusammenschau zeigt die vorliegende Arbeit, dass Glia ein potenzielles Ziel für therapeutische Strategien zur Vermittlung von Neuroprotektion und zur Verbesserung der Neuroreparatur unter pathophysiologischen Bedingungen wie der Chemotherapie darstellt. Auch wird deutlich, dass die Kommunikation zwischen Glia und Neuronen hochkomplex, aber äußerst wichtig für die Aufrechterhaltung der vollen Gehirnfunktionalität ist. Dieser Crosstalk ist selbst nach geringfügigen pathologischen Veränderungen stark moduliert und erfordert weitere intensive Untersuchungen, um die mögliche Rolle von Glia unter pathologischen Bedingungen wie dem Chemobrain zu verstehen.