

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik V
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. J. Behr
Pneumologie Innenstadt und Thorakale Onkologie
Leiter: Prof. Dr. med. R. M. Huber

**Einfluss des Chemotherapeutikums Cisplatin auf die Calcium
Konzentration in Zellen des respiratorischen Epithels**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andrea Penger

aus Freising

Jahr

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Rudolf M. Huber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Claus Belka Priv. Doz. Dr. med. Gerhard Preissler
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Fernando Gamarra
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	12.01.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Cisplatin	1
1.1.1 Entdeckung und Indikationen	1
1.1.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	1
1.1.3 Unerwünschte Wirkungen	2
1.1.4 Wirkmechanismen von Cisplatin	3
1.2 Calcium	5
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Kultivierung des respiratorischen Epithels im dreidimensionalen Modell.....	8
2.1.1 Herstellung des Kulturmediums AECGM.....	8
2.1.2 Zellgewinnung	9
2.1.3 Zellkulturherstellung	9
2.1.4 Kulturkontrolle	12
2.2 Bestimmung der Calcium Konzentration	12
2.2.1 Herauslösung des Schleims mittels DTT	12
2.2.2 Herstellung der Fluo-4 AM Lösung	13
2.2.3 Beladen der Spheroide mit Fluo-4 AM.....	13
2.2.4 Aufteilung in Cisplatin-und Kontrollgruppe.....	14
2.2.5 Untersuchung der Spheroide am Fluoreszenzmikroskop	14
2.3 Auswertung	16
2.4 Statistik.....	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Kultur der Spheroide.....	18
3.2 Entwicklung des Calciumgehalts direkt nach der Cisplatingabe.....	18
3.2.1 Entwicklung des Calciumgehalts in den ersten 5 Minuten	18
3.2.2 Entwicklung des Calciumgehalts über 35 Minuten	20
3.3 Entwicklung der Grundfluoreszenz über 35 Minuten.....	21
3.4 Calciumgehalt nach 24 Stunden.....	23
4 Diskussion	24

4.1 Diskussion von Material und Methoden	24
4.1.1 Die Spheroid-Methode	24
4.1.2 Kultivierbarkeit der nasalen Spheroide	25
4.1.3 Technik der Kulturanlage	25
4.1.4 Arbeit am Fluoreszenzmikroskop	27
4.1.5 Photobleaching	28
4.1.6 Austritt von Farbstoff	31
4.2 Diskussion der Ergebnisse	32
4.2.1 Calcium – der Second Messenger	32
4.2.2 Der Einfluss von Cisplatin auf die Calcium-Homöostase in den ersten 35 Minuten	35
4.2.3 Calcium erhöht nach 24 Stunden	39
4.2.4 Rolle von Calcium in der Resistenzentwicklung und Tumorthherapie.....	41
4.3 Ausblick auf zukünftige Fragestellungen.....	43
5 Zusammenfassung.....	44
6 Literaturverzeichnis	46
7 Danksagung.....	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cisplatin	3
Abbildung 2: Interaktion von Cisplatin mit der DNA	4
Abbildung 3: Waschvorgang	10
Abbildung 4: Aufteilung des Materials auf 6 Inserts	10
Abbildung 5: Modellhafter Aufbau eines Inserts	11
Abbildung 6: zwei Nasenepithelspherioide (\varnothing ca. 50 μ m) im eigenen Mukus (aufgenommen unter dem Fluoreszenzmikroskop ohne Verwendung eines optischen Filters)	12
Abbildung 7: Versuchsdurchführung unter dem Fluoreszenzmikroskop	15
Abbildung 8: Befehlsleiste des Bildbearbeitungsprogrammes „Image J“ zur Messung der Fluoreszenzintensität	16
Abbildung 9: Auswahl einer ROI (region of interest) am Randbereich eines fluoreszierenden Spheroids	16
Abbildung 10: Fluoreszenzentwicklung in den ersten 5 Minuten	19
Abbildung 11: Fluoreszenzentwicklung über 35 Minuten	21
Abbildung 12: Entwicklung der Grundfluoreszenz über 35 Minuten (= 60 Bilder)	22
Abbildung 13: Box-Plot Diagramm	23
Abbildung 14: Der Effekt des Photobleachings	30
Abbildung 15: Der Effekt des Photobleachings mit Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit	31
Abbildung 16: Das Zusammenspiel der verschiedenen Ca^{2+} -Kompartimente	34
Abbildung 17: Ca^{2+} als Initiator der Apoptose	38

Abkürzungen

AECGM	Airway Epithelial Cell Growth Medium
AM	Acetoxymethyl
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _z	zytoplasmatische Calcium Konzentration
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KOF	Körperoberfläche
NCS	Newborn Calf Serum
sHBSS	supplemented Hanks Balanced Salt Solution
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
ROS	reactive oxygen species)
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic- Reticulum- Calcium- ATPase

1 Einleitung

1.1 Cisplatin

1.1.1 Entdeckung und Indikationen

Durch Zufall entdeckte der amerikanische Chemiker Barnett Rosenberg 1965 bei seinen Experimenten mit Wechselstrom die proliferationshemmende Wirkung von Platinkomplexen. Das Wachstum der E.coli Bakterien, die er dem Wechselstrom aussetzte, wurde durch das von den Elektroden abgesonderte Platin gehemmt (1). Das daraus entwickelte Cisplatin (cis-Diaminodichloroplatinum, CDDP) wurde 1978 als das Zytostatikum Platinol® (Bristol-Myers Squibb) (2) in die klinische Praxis eingeführt. Heute ist Cisplatin ein sehr weit verbreitetes und zugleich eines der effektivsten Chemotherapeutika in der Behandlung von soliden Tumoren wie dem Ovarial-, Hoden-, Harnblasen-, Zervix- und Bronchialkarzinom, sowie den Plattenepithelkarzinomen von Hals und Kopf (3). Es wird allein oder in Kombination mit anderen Zytostatika als Erstlinientherapie eingesetzt, sowie adjuvant nach einer operativen Behandlung oder Bestrahlung (4).

1.1.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Die Verabreichung von Cisplatin erfolgt über eine intravenöse Infusionslösung, da es bei einer oralen Aufnahme durch die Magensäure hydrolysiert werden würde. Je nach Allgemeinzustand und vorhandenen Komorbiditäten des Patienten wird Cisplatin als Monotherapie oder im Rahmen einer Kombinationschemotherapie in einer Dosis von 50 bis 100 mg/m² KOF einmal wöchentlich oder alle 3 Wochen appliziert (5). In zahlreichen klinisch-pharmakokinetischen Untersuchungen wurde eine dreiphasische Elimination von Cisplatin aus dem Blutkreislauf beschrieben. 90% des im Plasma vorliegenden Cisplatins wird an Proteine gebunden (6). Die erste und die zweite Phase betrifft die Elimination der nicht plasmaproteingebundenen Substanz und dauert ca. 20–30 Minuten bzw. 48-67 Minuten. Beide Phasen sind eng an eine normale Nierenfunktion gebunden, da etwa 90 % des Cisplatins sowohl durch glomeruläre Filtration als auch tubuläre Sekretion ausgeschieden werden. Die dritte Phase der Elimination von Cisplatin betrifft die Entfernung des an Plasmaproteine gebundenen Cisplatins und erstreckt sich auf ca. 24 Stunden. In dieser Phase spielen Proteinabbau, Nierenausscheidung und die biliäre Ausscheidung eine Rolle. Insgesamt werden weniger als 10 % des Cisplatins über die Gallensekretion ausgeschieden

(5). Vor Therapiebeginn und während der Therapie müssen die Nierenfunktion, die Elektrolyte, das Blutbild, das Gehör sowie die Leber und die neurologischen Funktionen untersucht werden. Eine Untersuchung der Lungenfunktion oder gar der mukoziliären Funktion ist nicht Pflicht, weil die Auswirkungen von Cisplatin auf die respiratorischen Organe gar nicht erforscht sind. Bei der Kombination mit anderen zytostatischen Substanzen addiert sich die toxische Wirkung von Cisplatin. Auch an Interaktionen mit anderen nephro- und ototoxischen Medikamenten, wie z.B. Aminoglykoside oder Amphotericin B, muss gedacht werden (5).

1.1.3 Unerwünschte Wirkungen

Die Behandlung mit Cisplatin geht in Abhängigkeit von der Dosis mit schweren nephrotoxischen, ototoxischen und neurotoxischen Nebenwirkungen einher (7). Die myelotoxische Wirkung mit Abfall der Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten wird als mäßig beschrieben (8). Bei nahezu allen Patienten löst Cisplatin starke Übelkeit und Erbrechen aus, mit einer Dauer über 1-2 Tage (9). Dies macht eine prophylaktische antiemetische Therapie notwendig. Bei einem Drittel der Patienten kommt es während der Behandlung zu schweren ototoxischen Effekten. Die Schädigung der äußeren Haarzellen in der Cochlea führt zu irreversiblen Hörschäden im Bereich der hohen Frequenzen (4-8 Hz), häufig begleitet von einem Tinnitus (10, 11). Bei bis zu 50% der Patienten entwickelt sich im Verlauf der Chemotherapie mit Cisplatin eine periphere Neuropathie, gekennzeichnet durch Sensibilitätsstörungen, Parästhesien, Tremor und Schwäche der oberen und unteren Extremitäten (12). Durch die überwiegend renale Elimination ist die Cisplatin Konzentration in den Nieren fünfmal so hoch als im Blut, sodass vor allem im Bereich der proximalen Tubuli schwere Schäden entstehen. Bereits nach einer Dosis Cisplatin kommt es bei bis zu 35% der behandelten Patienten zu einem Abfall der Nierenfunktion (3). Durch eine ausreichende Hydratation mit isotonischer Kochsalzlösung und Sicherstellung einer Diurese mittels Mannitol kann der nephrotoxische Schaden minimiert werden (7, 9). Trotzdem ist die hohe Nephrotoxizität der entscheidende Faktor, der die Cisplatin Dosis in der Chemotherapie limitiert und den Effekt der Therapie mindert (3).

1.1.4 Wirkmechanismen von Cisplatin

Cisplatin oder cis-Diamindichloridoplatinum (II) ist ein planarer Komplex mit einem zentralen Platinatom, das zwei Chloridgruppen und zwei Amingruppen gebunden hat. Die cis-Stellung bedingt die antineoplastische Wirkung (4).

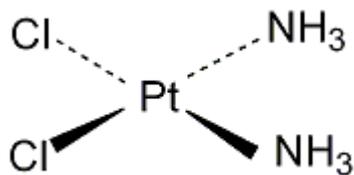


Abbildung 1: Cisplatin

Initial wurde angenommen, Cisplatin und seine Analoga gelangen durch passive Diffusion in die Zelle, bis 1981 zum ersten Mal die Hypothese aufgestellt wurde, Cisplatin könnte auch aktiv über Carrier-vermittelten Transport die Zellmembran passieren (4). Verschiedene Forschungsgruppen haben mittlerweile herausgefunden, dass der Plasmamembran „copper transporter-1“ (CTR1) der Haupttransporter ist. Dieser scheint die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle zu kontrollieren und seine Ausschaltung resultiert in eine Cisplatin Resistenz (13).

In der Zelle muss Cisplatin durch Hydrolyse erst einmal aktiviert werden. Dabei spielt die Chlorid Konzentration in der Zelle eine entscheidende Rolle. Die hohe Chlorid Konzentration (ca. 103 mM) im Blutplasma verhindert die extrazelluläre Hydrolyse. Gelangt Cisplatin jedoch in die Zelle, ist eine Hydrolyse auf Grund der niedrigen Chlorid Konzentration intrazellulär (ca. 4 mM) möglich und die Chlorid Atome werden durch Wassermoleküle ersetzt. Dieses aktivierte Cisplatin wird somit elektrophil, um mit vielen Nukleophilen, einschließlich DNA, RNA und Proteinen, zu reagieren (3, 4, 14).

Quervernetzung der DNA

So wird allgemein angenommen, dass sich die toxische Wirkung von Cisplatin vor allem auf DNA-Ebene abspielt. Die elektrophilen Cisplatin Komplexe bilden Addukte mit der DNA und führen zur Quervernetzung von DNA-Strängen. Durch Bindung an die Guanin Basen der DNA entstehen 1,2- und 1,3- Intrastrang Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Strangs und Interstrang Quervernetzungen zwischen zwei benachbarten DNA-Strängen, sowie DNA-Protein Quervernetzungen (10, 14). Treten gravierende DNA-Schäden auf, wird das

Tumorsuppressorgen p53 vermehrt synthetisiert und blockiert den Zellzyklus. Können die DNA-Reparatursysteme die Schäden reparieren, wird der Zellzyklus fortgesetzt, ansonsten wird die Apoptose eingeleitet (15). Park et al. konnten in ihren Versuchen einen Zusammenhang zwischen dem p53 Gehalt von Glioblastomzellen und ihrem Ansprechen auf Cisplatin nachweisen. Die Expression von p53 ist essentiell, damit Cisplatin seine zytotoxische Wirkung entfalten kann (16).

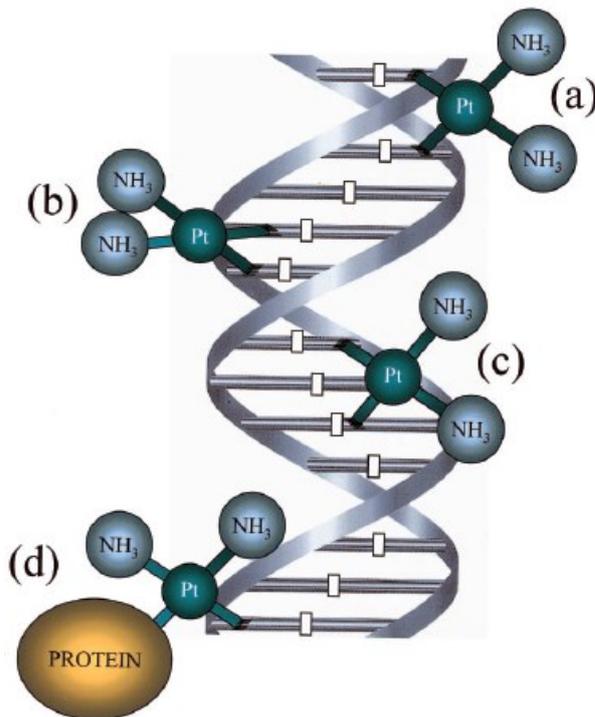


Abbildung 2: Interaktion von Cisplatin mit der DNA

- a) Interstrang Quervernetzung
- b) 1,2-Intrastrang Quervernetzung
- c) 1,3-Intrastrang Quervernetzung
- d) DNA-Protein Quervernetzung

(aus Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM: Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular pharmacology*. 2001;59(4):657-63.)

Weitere Angriffspunkte von Cisplatin

Aber nur zirka 1% des intrazellulären Cisplatin interagiert überhaupt mit der DNA (17). In zahlreichen Studien konnte die Autoren zeigen, dass Cisplatin auch ohne DNA-Schädigung seine zytotoxische Wirkung entfaltet (14). Burger et al. fanden keinen Zusammenhang zwischen der Bildung von DNA-Addukten und der Cisplatin Zytotoxizität. Genauso wenig korrelierte die intrazelluläre Konzentration an aufgenommenen Platin mit der Cisplatin Sensitivität der TGCT (testicular germ cell tumour) Zelllinien (18). Mandic et al. zeigten, dass

Cisplatin auch in zellkernlosen Zytoblasten die Apoptose einleitet und identifizieren das endoplasmatische Retikulum (ER) und Calpain als einen möglichen nicht-nuklearen Angriffspunkt von Cisplatin (19). Auch Yu et al. beschreiben, dass die Wirkung von Cisplatin schon im Zytoplasma beginnt und Enzyme, wie die cyclinabhängige Proteinkinase 2 (cdk2), eine wichtige Rolle im Apoptoseweg spielen (17). Neuere Studien zeigen, dass auch Sauerstoffradikale, sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS), für die schädigende Wirkung von Cisplatin verantwortlich sind und zum Zelltod führen können (10, 20). Berndtsson et al. wiesen nach, dass DNA-Schäden nichts mit der Cisplatin-assoziierten Apoptose zu tun haben, sondern ROS benötigt werden (21). Über den Anstieg der Lipidperoxidase führen diese reaktiven Sauerstoffspezies bei Cisplatingabe zu einem Umbau von Enzymen und Strukturproteinen und leiten somit direkt die Apoptose ein. Diese ROS sollen für die Nephrotoxizität und Ototoxizität von Cisplatin verantwortlich sein (2, 10, 22). Der Einfluss vieler weiterer Proteine und Kanäle auf die Cisplatinwirkung konnte bisher nachgewiesen werden (16, 23). Diese unübersichtliche Datenlage verdeutlicht, dass der genaue Mechanismus, wie Cisplatin den Apoptose-Signalweg in Tumorzellen einleitet, sehr komplex und nur unzureichend verstanden ist.

1.2 Calcium

Das Ion Calcium (Ca^{2+}) ist eines der wichtigsten Signalmoleküle in der Zelle. Es ist so vielseitig, dass es an fast allen intrazellulären Prozessen beteiligt ist, wie an der Gentranskription, Muskelkontraktion, Fertilisation, Apoptose und Zellproliferation (24-26). Um so viele verschiedene und auch gegensätzliche Funktionen ausüben zu können, ist ein hochkomplexes System nötig. Die zytoplasmatische Calcium Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_z$), die Ca^{2+} -Aufnahme in die Zellen und der Mechanismus, der Ca^{2+} entgegen des Konzentrationsgradienten transportiert, werden streng reguliert. Die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ in den Zellen kann entweder durch Aufnahme von außen, oder durch Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern erhöht werden. Um die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ zu senken, werden Pumpen oder Austauscher auf der äußeren Zellmembran aktiv, oder Ca^{2+} wird zurück in die Speicher transportiert. Die Hauptspeicher sind dabei das ER und die Mitochondrien, neben dem Golgi-Apparat und dem Nucleus. Die vielen verschiedenen biologische Signalwege werden durch Bindung von Ca^{2+} an Ca^{2+} -Sensorproteine aktiviert (24, 26, 27).

In unserer Arbeitsgruppe konnte zum Beispiel von Berger et al. gezeigt werden, dass die bronchiale Hyperreagibilität in einem Asthma bronchiale Tiermodell mit einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im ER einhergeht (28).

Dass Ca^{2+} auch eine wichtige Rolle bei der Auslösung des Zelltodes spielt, wurde von Fleckenstein et al. zuerst behauptet. Sie stellten die Hypothese auf, dass das in die kardialen Myozyten entströmende Ca^{2+} nach einer ischämischen Attacke für den Zelltod verantwortlich war (29). Danach wurde in vielen anderen Studien nachgewiesen, dass eine Rezeptorüberstimulation oder eine zytotoxische Substanz einen letalen Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen auslösen können (26).

Eine unkontrollierte Proliferation und eine verminderte Apoptoserate sind charakteristische Merkmale von bösartigen Tumorzellen. Gerade deshalb rückte Ca^{2+} , beteiligt an der Regulation von Zellwachstum und Zelltod, in den letzten Jahren immer mehr in den Focus. Die Idee dahinter ist, dass sich über die Beeinflussung des Ca^{2+} -Haushaltes von Tumorzellen neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Lungenkrebs ergeben könnten. Berger et al. untersuchten dazu in ihren Versuchen, ob es Unterschiede gibt im Ca^{2+} -Haushalt des Endoplasmatischen Retikulums (ER) von Lungenkrebszelllinien und Zellen des gesunden Lungenepithels (30). Sie fanden heraus, dass der Ca^{2+} -Gehalt des ERs in der kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie H1339 und in der Adenokarzinomzelllinie HCC vermindert war, verglichen mit Zellen des gesunden Lungenepithels. Der verminderte ER Ca^{2+} -Gehalt in H1339 und HCC korrelierte dabei mit einer verminderten Expression von SERCA 2. SERCA ist ein Transmembranprotein des ERs, verantwortlich dafür, den Konzentrationsgradienten zwischen Zytosol und dem ER aufrechtzuerhalten und Ca^{2+} in das ER zu pumpen. Zugleich wiesen sie einen verminderten Gehalt des Ca^{2+} -Puffers Calretikulin nach, sowie eine erhöhte Expression des IP_3 -Rezeptors, der für den Ca^{2+} -Strom aus dem ER verantwortlich ist (27, 30). Durch ihre Versuche wurde deutlich, dass Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase in Lungenkrebszelllinien eine Rolle spielen.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Cisplatin ist ein hochwirksames Chemotherapeutikum, jedoch auch bekannt für seine schweren Nebenwirkungen. So ist gerade die Nephrotoxizität oft verantwortlich für die Dosislimitierung in der Cisplatintherapie. Dabei sind die genauen Mechanismen, wie Cisplatin gesunde Zellen schädigt noch immer nicht vollständig geklärt. Wie wirkt Cisplatin auf gesunde Zellen? Viele neue, DNA-unabhängige Angriffspunkte von Cisplatin wurden bereits identifiziert. So scheint Cisplatin auch über das universelle Signalmolekül Ca^{2+} seine Wirkung zu entfalten. Doch wie genau beeinflusst Cisplatin die Ca^{2+} -Homöostase in den Zellen? Wie lassen sich die Ergebnisse in die bereits bekannten Ca^{2+} -Signalwege einordnen?

Ziel dieser Arbeit ist es, den frühen Einfluss des Chemotherapeutikums Cisplatin auf Zellen des respiratorischen Epithels zu untersuchen. Dabei wird das Augenmerk auf die Veränderung der $[Ca^{2+}]_z$ unmittelbar nach Cisplatingabe, sowie 24 Stunden nach 3-stündiger Inkubation gelegt. Etabliert wurde dabei ein Versuchsaufbau am Fluoreszenzmikroskop zur kontinuierlichen Erfassung der Ca^{2+} -Entwicklung über 35 Minuten nach Cisplatingabe.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung des respiratorischen Epithels im dreidimensionalen Modell

2.1.1 Herstellung des Kulturmediums AECGM

Die im Folgenden beschriebene Herstellung des Kulturmediums AECGM erfolgte steril unter einem Arbeitsplatzabzug (Laminar Airflow, Heraeus, Hanau, Deutschland). Als Grundmedium für die Zellkultivierung wurde das Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECGM) verwendet (C-21260, PromoCell, Heidelberg). Diesem Nährmedium wurde das AECGM Supplement Pack (C-39160, Promo Cell, Heidelberg) mit folgenden Endkonzentrationen beigemischt:

Bovine Pituitary Extract (Rinder-Hypophysenextrakt)	0.004 ml / ml
Epidermal Growth Factor (recombinant human)	10 ng / ml
Insulin (recombinant human)	5 µg / ml
Hydrocortisone	0.5 µg / ml
Epinephrine	0.5 µg / ml
Triiodo-L-thyronine	6.7 ng / ml
Transferrin, holo (human)	10 µg / ml
Retinoic Acid	0.1 ng / ml

Dieses Medium war bei 4°C für ca. 4 Wochen haltbar.

Für den täglichen Gebrauch wurden 36 ml des hergestellten Mediums mit 4ml NCS (Newborn Calf Serum, Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland), 80µl PenStrep (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland) und 160 µl Amphotericin B (Fungizone, Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland) zusammengemischt. Dieses AECGM konnte schließlich bei 4°C für eine Woche verwendet werden.

2.1.2 Zellgewinnung

Die Entnahme von respiratorischem Epithel wurde an freiwilligen Spendern nach vorheriger Aufklärung und schriftlicher Zustimmung durchgeführt. Unsere Ausschlusskriterien waren akute respiratorische Infekte, allergische Rhinitis und Rauchen. Insgesamt nahmen 7 Probanden, 3 männliche und 4 weibliche im Alter zwischen 23 und 31 Jahren teil. Vor der Entnahme wurden die Probanden aufgefordert die Nase zu schnäuzen. Mit Hilfe einer zytologischen Bürste (ConMed Endoscopic Technologies, Billerica, USA) wurde aus beiden unteren Nasengängen des jeweiligen Probanden respiratorisches Oberflächenepithel gewonnen. Dazu wurde die Bürste vorher mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% Natriumchloridlösung von Braun) angefeuchtet und an der lateralen Nasenwand mehrmals auf- und abgeführt. Das so gewonnene Material bestand aus Schleim, einzelnen Epithelzellen und Epithelstreifen. Durch mehrmaliges Vor- und Zurückschieben der Bürste aus der Hülle wurde schließlich das Material in ein mit 2ml AECGM gefülltes Zentrifugenröhrchen abgelegt. Proben mit Spuren von Blut mussten verworfen werden. Insgesamt vergingen zwischen Probenentnahme und Anlage der Kultur 15-60 Minuten. In dieser Zeit wurde das Zentrifugenröhrchen verschlossen und aufrecht in eine Haltevorrichtung gestellt, damit sich das Material auf den Boden des Röhrchens setzen konnte.

2.1.3 Zellkulturherstellung

Das per Bürstenabstrich gewonnene Material wurde unter sterilen Bedingungen unter einem Arbeitsplatzabzug durch vorsichtiges Umpipettieren insgesamt dreimal gewaschen. Dafür wurden 3 mit 2ml AECGM gefüllte Petrischalen verwendet. Mit Hilfe einer Pipette wurde versucht, möglichst viel Material und wenig Flüssigkeit jeweils von einer Petrischale zur nächsten zu transportieren, bevor das Material schließlich auf insgesamt 6 Inserts (Cell Culture Insert, Falcon™, Becton-Dickinson and Company, Franklin Lakes, N. J., USA) aufgeteilt wurde.

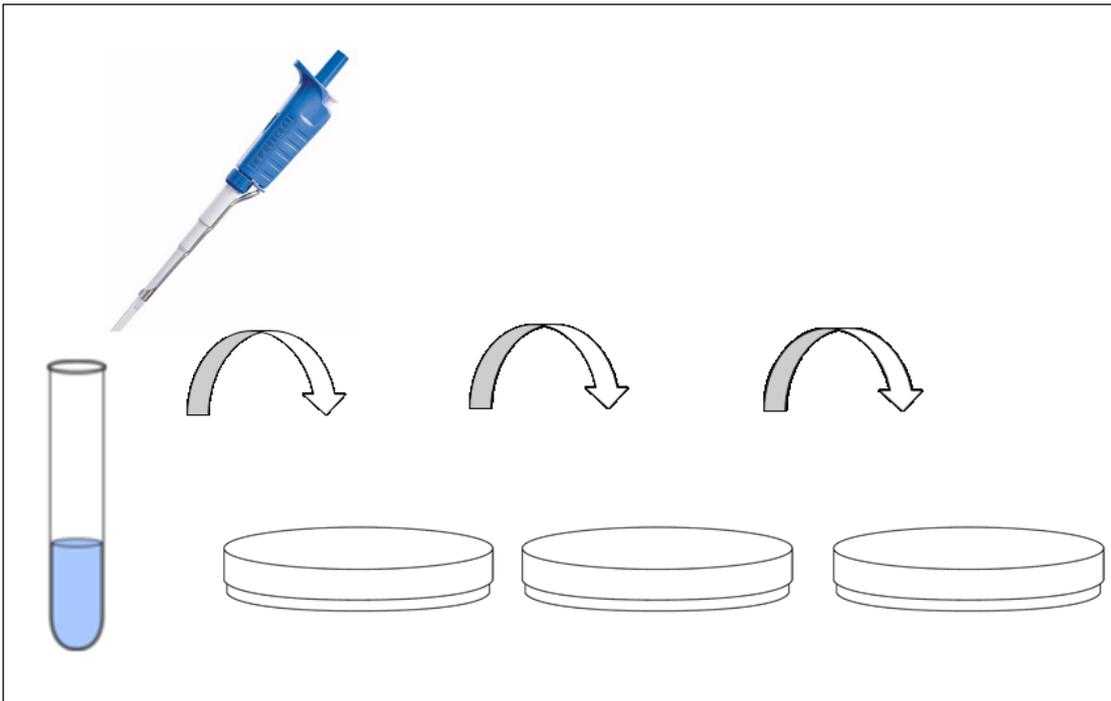


Abbildung 3: Waschvorgang

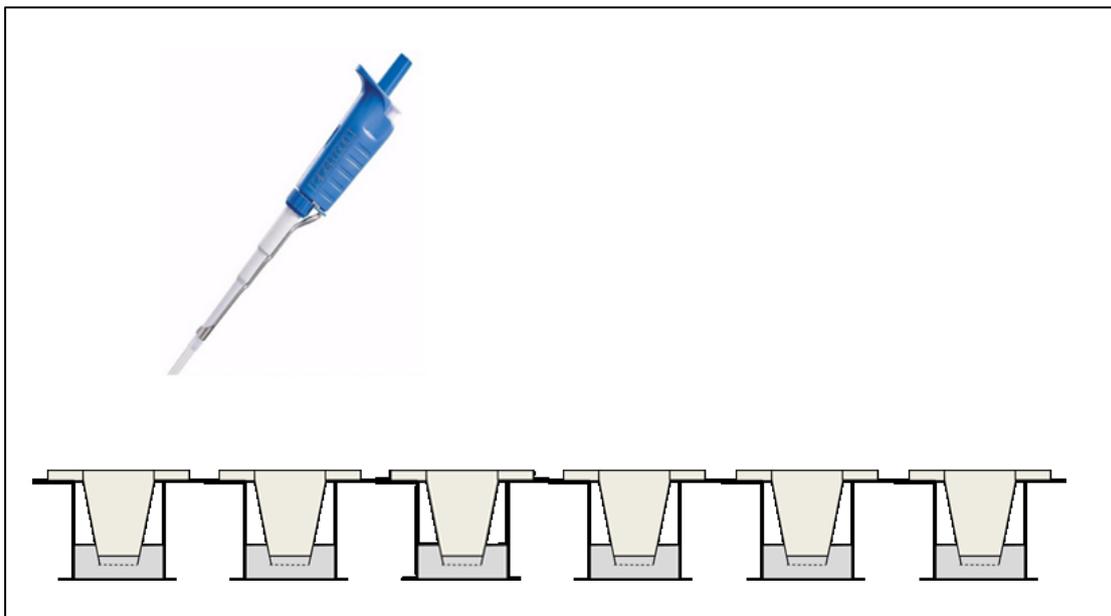


Abbildung 4: Aufteilung des Materials auf 6 Inserts

Der Boden der Inserts bestand aus Kernspurmembranen, sogenannten Track-Etch-Membranen, hergestellt aus dem Kunststoff Polyethylenterephthalat (PET). Diese Membranen waren sehr stabil und ermöglichten durch ihre durchlässigen Poren ($8 \mu\text{m}$ Porengröße, $1,0 \times 10^8$ Poren/ cm^2) trotzdem die Diffusion von Nährstoffen und Molekülen. Durch ihre Transparenz waren sie besonders für das Fluoreszenzmikroskop geeignet. Die 6

Inserts mit dem darin enthaltenen Material wurden in die erste Reihe einer 24-Loch-Multiwellplatte (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon™, Becton-Dickinson and Company, Franklin Lakes, N. J., USA) eingesetzt, wodurch schließlich je zwei Kompartimente entstanden: ein inneres Kompartiment im Insert und ein äußeres Kompartiment im Well. Innen wurden noch 50 µl AECGM und außen 400 µl AECGM gegeben. Der genaue Aufbau der Zellkultur wird in der folgenden Abbildung noch einmal deutlich:

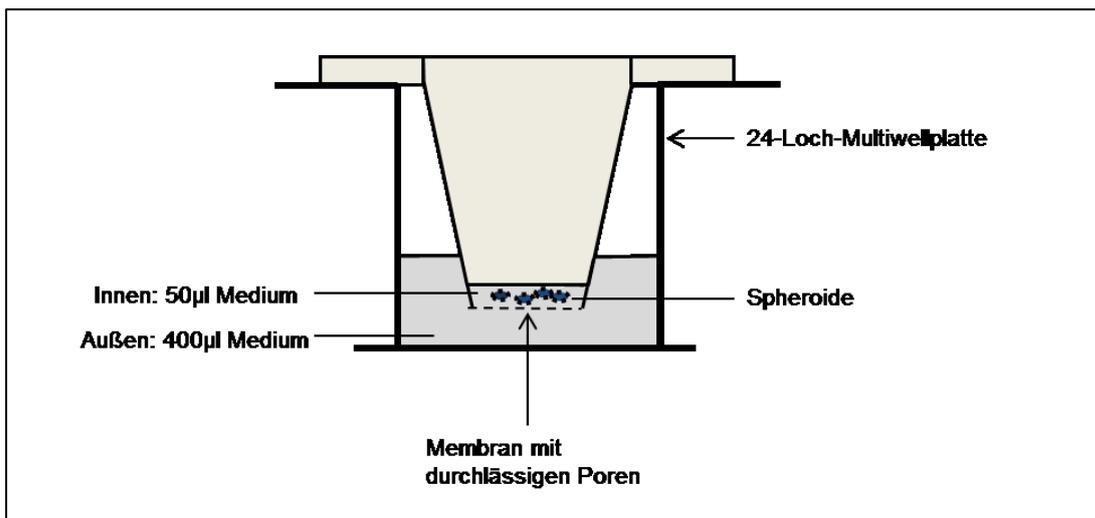


Abbildung 5: Modellhafter Aufbau eines Inserts

Im Anschluss an die Zellkulturanlage wurden die Proben lichtmikroskopisch kontrolliert und in den Brutschrank (HERAcell, Heraeus, Hanau, Deutschland) gestellt, wo sie bei 37°C, 5% CO₂ und zirka 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden. Bereits nach einigen Stunden lagerten sich die ersten Epithelstreifen und einzelne Epithelzellen zu einem kugeligen Gebilde, genannt Spheroide, zusammen. Umgeben von Schleim begannen einige Spheroide sich, auf Grund der schlagenden Zilien auf ihrer Oberfläche, um ihre eigene Achse zu drehen.



Abbildung 6: zwei Nasenepithelspheroide (\varnothing ca. $50\mu\text{m}$) im eigenen Mukus (aufgenommen unter dem Fluoreszenzmikroskop ohne Verwendung eines optischen Filters)

2.1.4 Kulturkontrolle

Bis zur Versuchsdurchführung am 3. und 4. Tag nach Kulturanlage wurden die Spheroide jeden Tag unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) kontrolliert, gezählt und die genaue Anzahl der rotationsfähigen Spheroide notiert. Mit Bakterien kontaminierte Proben wurden verworfen. Um einer möglichen Austrocknung vorzubeugen, konnte bei Bedarf innen in die Inserts $50\ \mu\text{l}$ frisches AECGM gegeben werden. Am 2. Tag wurde zusätzlich ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurde jedes Insert in ein neues Well umgesetzt und $400\ \mu\text{l}$ frisches AECGM außen dazu gegeben. Insgesamt wurden die Proben bis zur Versuchsdurchführung 3 bis 4 Tage kultiviert.

2.2 Bestimmung der Calcium Konzentration

2.2.1 Herauslösung des Schleims mittels DTT

Bei der Zellentnahme mit Hilfe der zytologischen Bürste blieb automatisch der Schleim des nasalen Epithels an den Epithelzellen haften. Dieser scheint für die Zusammenlagerung und ihre Entwicklung zu rotationsfähigen Spheroiden eine wichtige Rolle zu spielen, sodass dieser während der Zellkultivierung auch nicht entfernt wurde. Jedoch stellte der Mucus nach Anfärben der Spheroide mit dem Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 AM und während der anschließenden

Beobachtung der Spherotide unter dem Fluoreszenzmikroskop einen entscheidenden Störfaktor dar. Mit dem Einsatz von DL-Dithiothreitol (DTT) konnte der Schleim durch Reduktion seiner Disulfidbrücken gelöst werden.

Zur Herstellung des Schleimlösers wurde 1 g des DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in 13 ml Medium gelöst und anschließend 100 µl davon mit 9,9 ml Medium vermischt. Somit entstand eine 5 mM Lösung.

Nach Abtupfen der Inserts auf einer sterilen Kompresse wurden je 50 µl der DTT-Lösung innen in die Inserts und je 400 µl der DTT-Lösung außen gegeben. Die Inkubation erfolgte im Inkubator für 8 Minuten. Anschließend wurden die Inserts abgetupft, mit 50 µl Medium innen und 400 µl Medium außen gewaschen, erneut abgetupft und für eine Erholungszeit von 10 Minuten in den Inkubator gestellt.

2.2.2 Herstellung der Fluo-4 AM Lösung

Für die Herstellung der fluoreszierenden Lösung wurden 50 µg des Ca^{2+} -Indikators Fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) in 45,5 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Calbiochem, La Jolla, California, USA) vermischt. Das so gelöste Fluo-4 AM wurde in ein mit 3,9 ml sHBSS (supplemented Hanks Balanced Salt Solution, Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland) gefülltes Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit Hilfe eines Rüttlers gut gemischt. Somit standen für das Anfärben der Spherotide 4 ml einer 10 µM Färbelösung zur Verfügung. Durch Abdunkeln des Arbeitsplatzes und Umwickeln des Röhrchens mit einer einfachen Alufolie konnte die photosensible Fluo-4 AM Lösung vor UV-Licht geschützt werden.

2.2.3 Beladen der Spherotide mit Fluo-4 AM

Nach Abtupfen der Inserts auf einer sterilen Kompresse wurden die Spherotide mit der eben hergestellten Fluo-4 AM Lösung gefärbt. Dafür gab man je 50 µl der Fluo-4 AM Lösung innen in die Inserts und je 400 µl der Fluo-4 AM Lösung außen. Während der 45-minütigen Inkubationszeit lagerten die Spherotide bei 37°C im lichtundurchlässigen Inkubator. Anschließend folgte eine 45-minütige Erholungsphase in sHBSS, um überschüssigen Farbstoff auszuwaschen und eine Deesterifizierung des Farbstoffs zu ermöglichen, welche den Farbstoffaustritt aus den Zellen verhindert. Dafür wurden die Inserts erneut abgetupft und je 50 µl sHBSS innen und 400 µl sHBSS außen dazu pipettiert. Wieder wurde die Platte mit den Spheroiden während dieser Zeit in den Inkubator gestellt.

Während des Färbeprozesses wurde durch Umwickeln der Platten mit Alufolie und Abdunkeln des Raums stets darauf geachtet, die nun photosensiblen Spheroide vor UV-Licht abzusichern.

2.2.4 Aufteilung in Cisplatin- und Kontrollgruppe

Zur Versuchsdurchführung wurden die Inserts in eine Cisplatingruppe und in eine Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Randomisierung erfolgte durch Würfeln. Für die Cisplatingruppe wurde eine Cisplatinlösung (2 µl/ml) hergestellt. Dafür wurden 2 µl Cisplatin (Apotheke Klinikum Großhadern, München, Deutschland) mit 1 ml DMEM (HERPES-gepuffertes Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in einem Eppendorfgefäß gemischt, während für die Kontrolle nur DMEM verwendet wurde.

2.2.5 Untersuchung der Spheroide am Fluoreszenzmikroskop

Um den Einfluss von Cisplatin auf die $[Ca^{2+}]_z$ der Spheroide zu erfassen, wurden die Zellen wie beschrieben mit Fluo-4 AM angefärbt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der $[Ca^{2+}]_z$. Die folgenden Versuche wurden direkt am Fluoreszenzmikroskop in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

Teil 1:

Pro Insert wurde eine Gruppe gut zu fokussierender Spheroide unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewählt, 200 µl der Cisplatinlösung bzw. 200 µl der Kontrolllösung außen in das Well hinzugegeben und das Bild gleich wieder scharf gestellt. Sofort im Anschluss wurde mit der digitalen CCD Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss Vision, München, Deutschland) das erste Bild einer insgesamt 35-minütigen Bilderserie nach folgendem Schema erstellt: 1 Aufnahme/10 Sekunden in der ersten 5 Minuten und 1 Aufnahme/60 Sekunden in den folgenden 30 Minuten. Dabei wurde darauf geachtet, die Ausleuchtung der Spheroide während der Aufnahme möglichst kurz zu halten, um den Effekt des Photobleachings zu vermeiden. Die Belichtungszeit jeder einzelnen Aufnahme wurde deshalb auf 310 ms begrenzt. Untersucht wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop unter 480 nm Excitationswellenlänge und 520-534 nm Emissionswellenlänge.

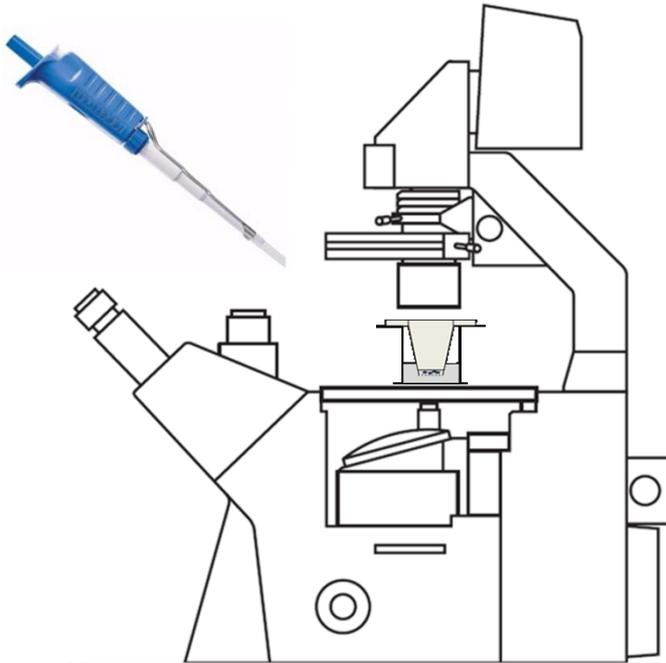


Abbildung 7: Versuchsdurchführung unter dem Fluoreszenzmikroskop

200 μl Cisplatin- bzw. Kontrolllösung wurden außen in das Well zugegeben. Das Bild wurde scharf gestellt und gleich darauf die 35-minütige Fotoserie gestartet.

Durch dieses Verfahren sollte die Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ unmittelbar nach Cisplatin Gabe, sowie bis zu 35 Minuten danach erfasst werden. Im Anschluss wurden die Spheroide für weitere 2,5 Stunden zurück in den Inkubator gestellt. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 3 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel in DMEM. Dabei wurden die Inserts abgetupft und in ein neues Well mit 50 μl frischem DMEM innen und 400 μl DMEM außen gestellt.

Teil 2:

Nach einer Erholungszeit von zirka 24 Stunden im Inkubator im Dunklen wurden die Spheroide nach bekanntem Verfahren erneut mit dem Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 AM angefärbt und ihre Fluoreszenzintensität unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Diesmal wurde jeder Spheroid in einer einzelnen Aufnahme erfasst.

2.3 Auswertung

Die Auswertung der Bilder, die während der 35 Minuten unter dem Fluoreszenzmikroskop erstellt worden sind, erfolgte mit dem frei verfügbaren Bildbearbeitungsprogramm „Image J“ (31).

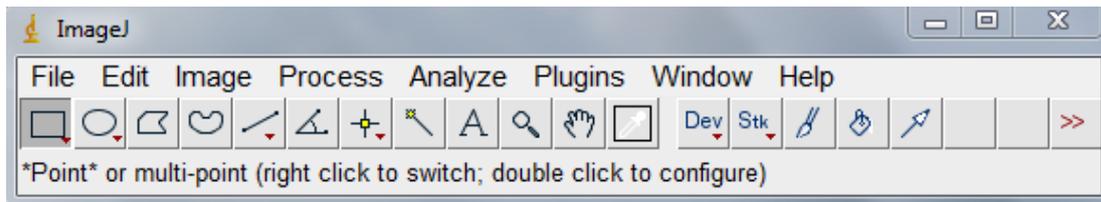


Abbildung 8: Befehlsleiste des Bildbearbeitungsprogrammes „Image J“ zur Messung der Fluoreszenzintensität

Im Durchschnitt wurden pro Insert 4 Spheroide ausgewertet. Stark rotierende Spheroide, die während der 35-minütigen Aufnahme aus dem Bild gewandert sind, konnten nicht verwertet werden. Für jeden aufgenommenen Spheroid wurden an einer möglichst gleichmäßig leuchtenden Stelle am Randbereich des Spheroids drei sogenannte regions of interest (ROI) ausgewählt und ihre Fluoreszenz gemessen.

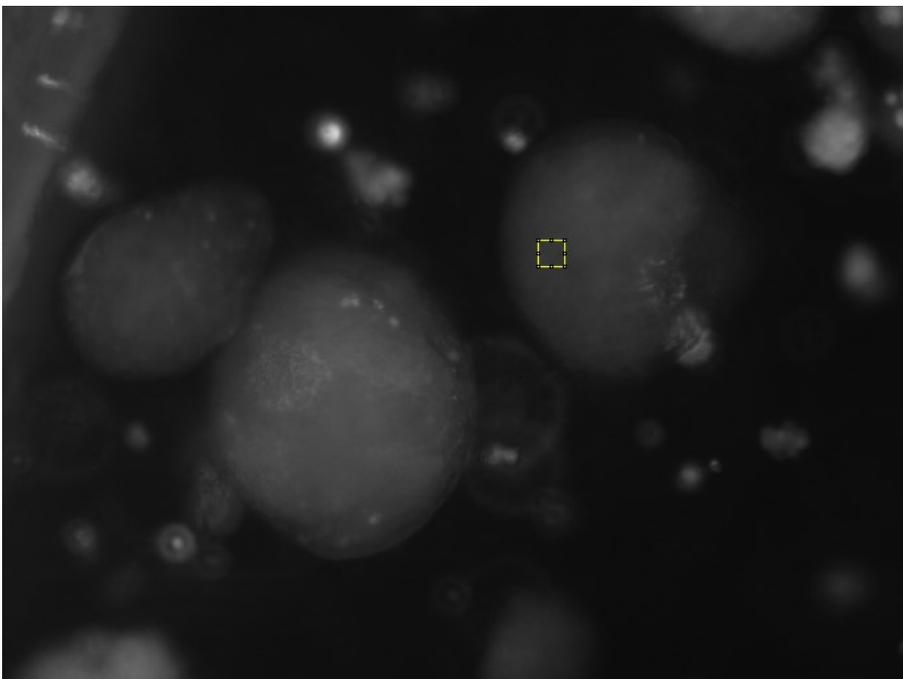


Abbildung 9: Auswahl einer ROI (region of interest) am Randbereich eines fluoreszierenden Spheroids

Die Werte wurden in Excel (Microsoft Excel 2010 Version 14.0.7109.5000 SP2 MSO 14.0.7116.5000) manuell eingetragen. Von dem Mittelwert der drei Messungen wurde die Grundfluoreszenz, eine dunkle, spheroidfreie und mukusfreie Stelle am Rand des Bildes, subtrahiert. Die Fluoreszenz-Endwerte wurden als Fluoreszenzverhältnisse ($F1/F0$), bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz $F0$, dargestellt. Dadurch wurde die relative Fluoreszenzänderung dargestellt.

Analog dazu erfolgte die Auswertung der Spheroide am 2. Tag, 24 Stunden nach der Cisplatininkubation. Hier konnten diesmal alle Spheroide eines Inserts erfasst und ihre Fluoreszenz ausgewertet werden.

2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde ein Lineares gemischtes Modell verwendet. In diesem Modell werden die Gruppen, die zeitliche Entwicklung und die individuumspezifische Variabilität berücksichtigt. Dieses Modell nutzt zur Berechnung der Signifikanz (p-Werte) den sogenannten „Wald-Test“.

Folgende Softwares wurden dabei verwendet:

Software R: R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

Paket „lme4“: Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker and Steven Walker (2012) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package, <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>

Für die Auswertungen am 2. Tag, 24 Stunden nach der Cisplatininkubation, wurde ein einfacher t-Test verwendet und die Daten mit Hilfe eines Box-Plots graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Kultur der Spherioide

Grundlage für die Erforschung der Wirkung von Cisplatin auf den Ca^{2+} -Haushalt im respiratorischen Epithel waren die Spherioide und ihre Kultivierung. Mittels Bürstenabstrich wurde aus den beiden unteren Nasengängen des jeweiligen Probanden respiratorisches Epithel gewonnen und nach einem festgelegten Verfahren wie im Methodenteil beschrieben über 3 bis 4 Tage kultiviert. Für die Versuchsreihe wurden von 7 Probanden, 4 Frauen und 3 Männer, im Alter von 23 bis 31 Jahre, nasales Epithel entnommen. Das gewonnene Material wurde jeweils auf 6 Wells gleichmäßig verteilt und kultiviert. Bei allen Probanden lagerten sich bereits nach einem Tag die respiratorischen Epithelien zu Spheroiden zusammen. Bei einem Probanden mussten alle 6 Wells verworfen werden, da die Menge an gebildeten Spheroiden für die Versuchsdurchführung nicht ausreichend war. Im Schnitt betrug am Tag 1 nach Kulturanlage die Anzahl der Spherioide pro Proband 306 ± 133 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Davon rotierten im Verlauf 11 ± 3 (Mittelwert \pm Standardabweichung) Spherioide. Der Anteil der rotierenden Spherioide in der Kultur lag also bei 3,6%.

3.2 Entwicklung des Calciumgehalts direkt nach der Cisplatingabe

Durch die Bilder und den daraus gemessenen Fluoreszenzwerten konnte nach der statistischen Auswertung auf den Ca^{2+} -Gehalt der Spherioide geschlossen werden. Die Werte F1 wurden dabei in Bezug zum Basalwert F0 gesetzt: $F1/F0$

3.2.1 Entwicklung des Calciumgehalts in den ersten 5 Minuten

In den ersten 5 Minuten erfolgte alle 10 Sekunden eine Bildaufnahme der Spherioide. In der Cisplatingruppe sowie in der Kontrollgruppe zeigten sich in diesen ersten 5 Minuten nach Cisplatin- bzw. Placebogabe eine hochsignifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität (p -Wert = 0,0000, Wald-Test). Der Abfall wurde durch die Berechnung der jeweiligen Steigungen deutlich. Die Cisplatingruppe (Steigung $m = -0,1730$) fiel etwas stärker ab als die Kontrollgruppe (Steigung $m = -0,1409$). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant bei einem p -Wert von 0,4392 (Wald-Test). Somit wurde angenommen, dass die Linien parallel verliefen und der Abfall der Fluoreszenzintensität in beiden Gruppen gleich stark war.

Ein wichtiger Unterschied bestand darin, dass die Kontrollgruppe im Schnitt 1,36 Punkte heller als die Cisplatingruppe war, bei einem p-Wert von 0,0916 (Wald-Test). Bereits bei Erstellung des ersten Fotos zum Zeitpunkt 0, war der Intercept (Anfangswert des Modells zum Zeitpunkt Null) der Cisplatingruppe ($F1/F0 = 5,58$) signifikant niedriger als in der Kontrolle ($F1/F0 = 6,94$). Da die Fotoserie zirka 10 Sekunden nach der Cisplatin- bzw. Placebogabe gestartet wurde, ist es vermutlich unmittelbar nach der Cisplatingabe zu einem Abfall der $[Ca^{2+}]_z$ gekommen.

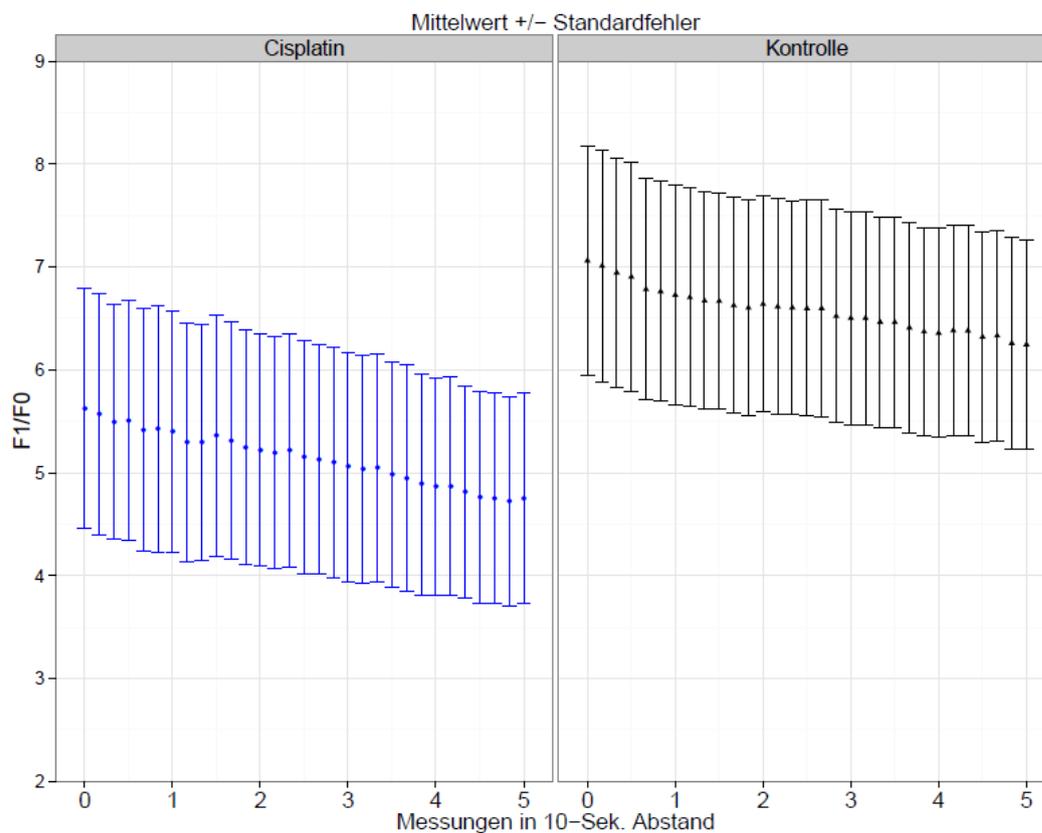


Abbildung 10: Fluoreszenzentwicklung in den ersten 5 Minuten

In den ersten 5 Minuten nach Cisplatin- bzw. Placebogabe kam es in beiden Gruppen zu einer gleichmäßigen Abnahme der Fluoreszenzintensität. Im Schnitt war die Kontrollgruppe 1,36 Punkte heller als die Cisplatingruppe. Der Intercept (Anfangswert des Modells zum Zeitpunkt Null) der Cisplatingruppe ($F1/F0=5,58$) war signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($F1/F0=6,94$).

3.2.2 Entwicklung des Calciumgehalts über 35 Minuten

In den darauffolgenden 30 Minuten wurde nur noch alle 60 Sekunden ein Bild aufgenommen. Über die gesamten 35 Minuten kam es in der Cisplatingruppe als auch in der Kontrollgruppe zu einer kontinuierlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität (p-Wert= 0,000, Wald-Test). Hier fiel die Kontrollgruppe (Steigung $m = -0,0665$) etwas stärker ab als die Cisplatingruppe (Steigung $m = -0,0554$). Der Unterscheid der Steigungen war aber bei einem p-Wert von 0,1807 (Wald-Test) nicht signifikant, sodass auch über die 35 Minuten angenommen wird, dass beide Gruppen gleich stark an Fluoreszenzintensität verloren haben.

Entscheidend ist, dass im Schnitt die Kontrollgruppe 1,49 Punkte heller war als die Cisplatingruppe, bei einem p-Wert von 0,0506 (Wald-Test).

In beiden Gruppen zeigte sich, wahrscheinlich als Folge des Photobleachings, in den ersten 5 Minuten ein deutlich stärkerer Abfall der Fluoreszenzintensität als in den folgenden 30 Minuten. Dies wird deutlich, wenn man die jeweiligen Steigungen der Zeitabschnitte in der folgenden Graphik vergleicht.

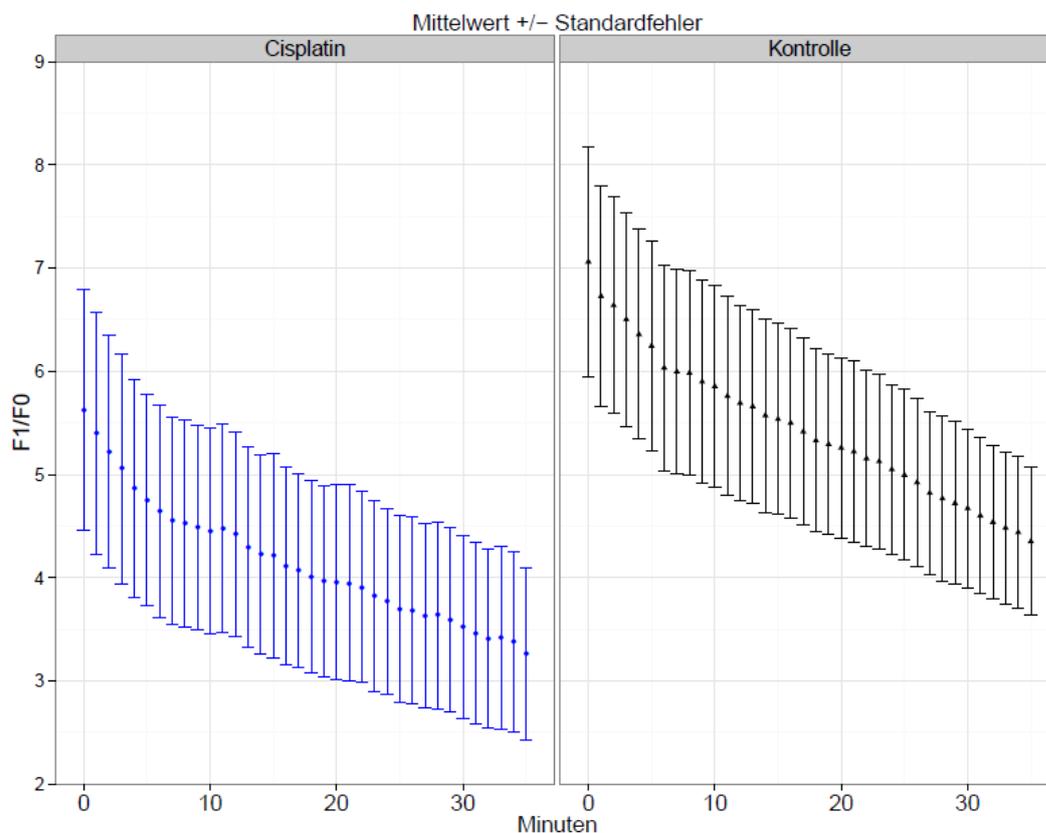


Abbildung 11: Fluoreszenzentwicklung über 35 Minuten

In den gesamten 35 Minuten nach Cisplatin- bzw. Placebogabe kam es in beiden Gruppen zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Im Schnitt war die Kontrollgruppe 1,49 Punkte heller als die Cisplatingruppe.

3.3 Entwicklung der Grundfluoreszenz über 35 Minuten

Neben der Fluoreszenzintensität der Spheroiden wurde außerdem die Entwicklung der Grundfluoreszenz in den jeweiligen Wells bzw. Bildern separat ausgewertet. Unter der Grundfluoreszenz versteht man die Hintergrundfluoreszenz, die neben den leuchtenden (fluoreszierenden) Spheroiden die Helligkeit eines Bildes mitbestimmt. Gemessen wurde die Grundfluoreszenz am Rand des Bildes, in größtmöglicher Entfernung zu den Spheroiden und an einer möglichst dunklen Stelle.

Vergleicht man die Entwicklung der Grundfluoreszenz in der Cisplatingruppe und in der Kontrollgruppe über den gesamten Zeitraum von 35 Minuten, so war die Grundfluoreszenz der Kontrollgruppe im Schnitt 0,51 Punkte dunkler als die der Cisplatingruppe. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant, da der p-Wert 0,1248 (Wald-Test) beträgt.

Zu beachten ist außerdem, dass sich in der Cisplatingruppe ein starker Ausreißer befand, der den Mittelwert in die Höhe trieb. Dieser könnte durch einen Fehler während der

Fluoreszenzfärbung, zum Beispiel durch eine zu lange Färbezeit, zu viel Farbstoff oder durch eine unzureichende Herauslösung des Mukus, entstanden sein. Entfernte man diesen, wurde der p-Wert noch unsignifikanter und die Grundfluoreszenzen der Cisplatin- und Kontrollgruppe näherten sich noch mehr an. Somit ergab sich bei den Grundfluoreszenzen kein Unterschied zwischen der Cisplatingruppe und der Kontrollgruppe. Sie waren folglich als gleich anzusehen.

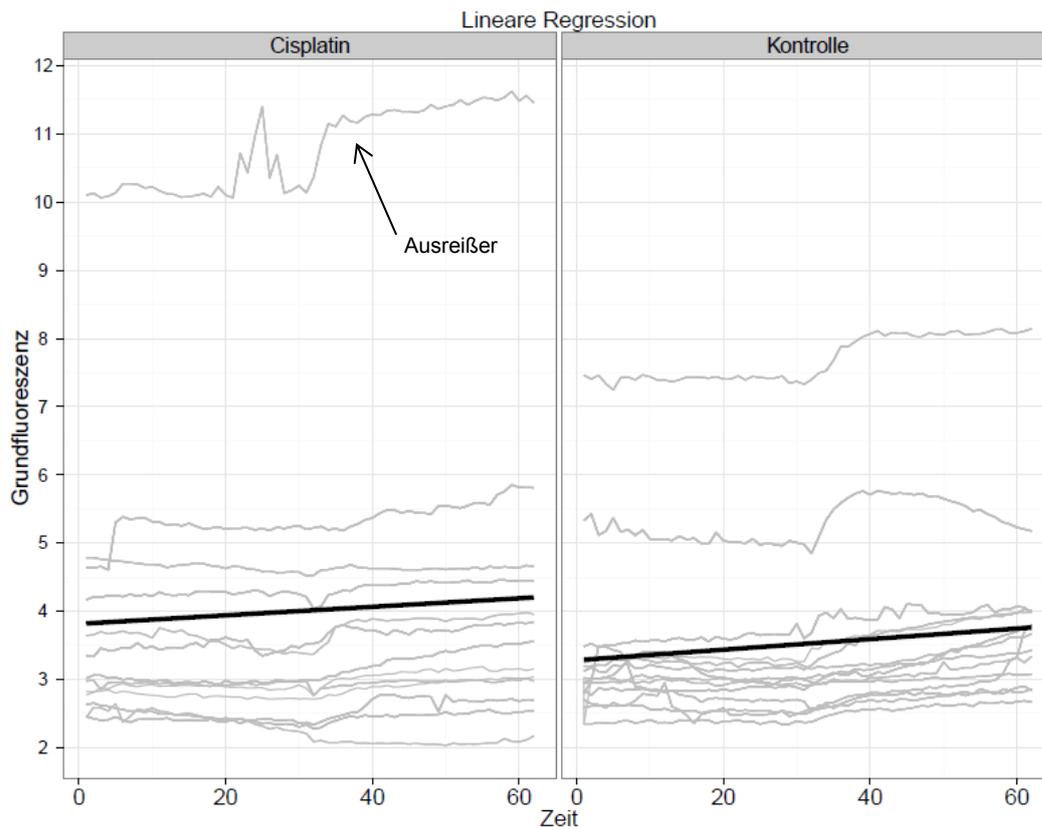


Abbildung 12: Entwicklung der Grundfluoreszenz über 35 Minuten (= 60 Bilder)

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten (schwarzer Balken) der Grundfluoreszenzen in der Cisplatin- und Kontrollgruppe. In beiden Gruppen kam es aber im Verlauf zu einem leichten Anstieg.

Bei genauerer Betrachtung der Graphen fällt auf, dass es im Verlauf, über die 35 Minuten (= 60 Bilder) in beiden Gruppen zu einem leichten Anstieg der Grundfluoreszenzen kam (p-Wert 0,0000, Wald-Test). Dies entspricht der berechneten Steigung von $m = 0,0105$ in der Cisplatingruppe und $m = 0,0133$ in der Kontrollgruppe. Auf Grund des Farbaustrittes von Fluo-4 aus den Spheroiden könnte es zu einer Anreicherung von Farbstoff im Medium gekommen sein und damit zu einem Anstieg der Hintergrundfluoreszenz.

3.4 Calciumgehalt nach 24 Stunden

24 Stunden nach der 3-stündigen Cisplatininkubation wurden die Spheroiden erneut angefärbt und die Fluoreszenz bestimmt. Die Cisplatingruppe zeigte deutlich höhere Fluoreszenzwerte als die Kontrollgruppe, welche für 3 Stunden nur mit dem Placebo DMEM inkubiert wurden.

Cisplatingruppe (n= 817): $13,58 \pm 0,45$ (Mittelwert \pm Standardfehler)

Kontrollgruppe (n= 480): $11,08 \pm 0,43$ (Mittelwert \pm Standardfehler)

Der Unterschied war hochsignifikant, bei einem p-Wert von $< 0,001$ (t-Test).

Die Graphische Darstellung erfolgte in einem Box-Plot Diagramm:

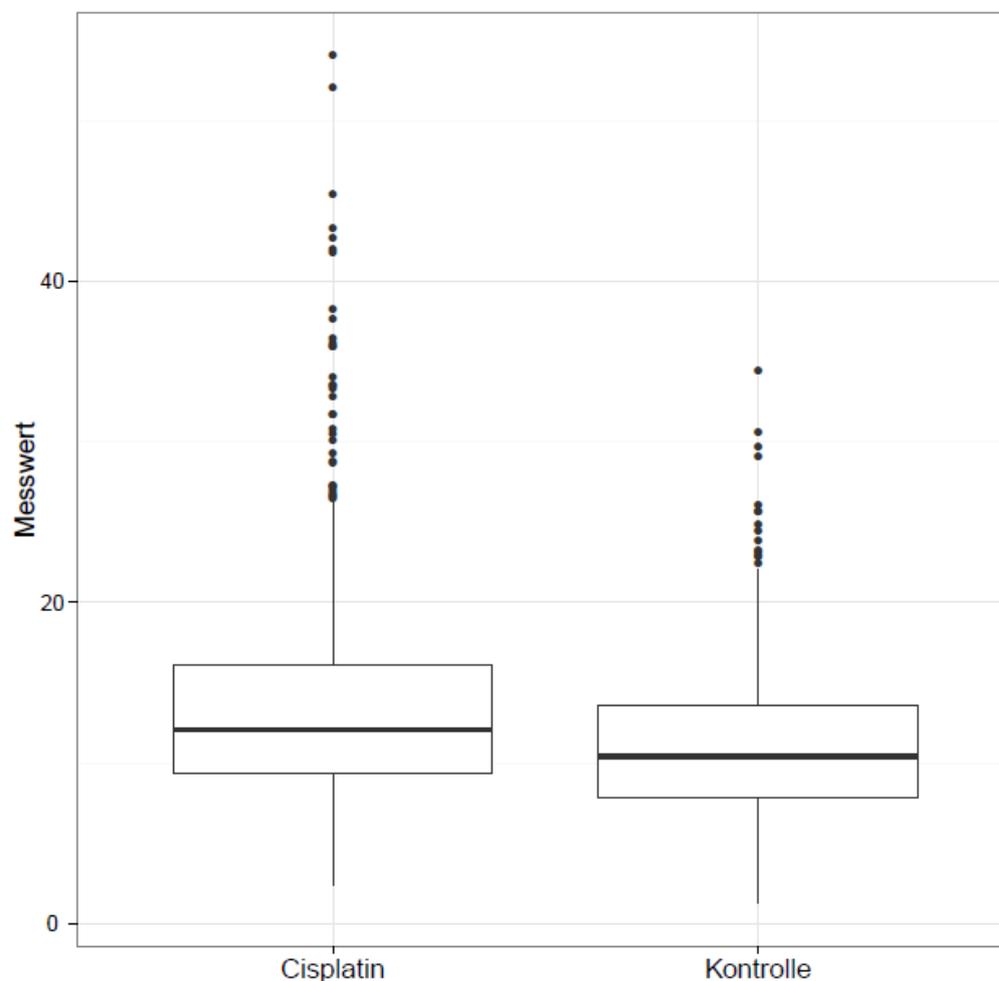


Abbildung 13: Box-Plot Diagramm

24 Stunden nach der 3-stündigen Inkubation mit Cisplatin bzw. mit dem Placebo zeigte die Cisplatingruppe (Mittelwert 13,58) deutlich höhere Fluoreszenzwerte als die Kontrollgruppe (Mittelwert 11,08). Der Unterschied war hochsignifikant.

4 Diskussion

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Die Spheroid-Methode

Schon seit Jahrzehnten ist die Verwendung von dreidimensionalen Zellkultursystemen in der medizinischen Forschung weit verbreitet. Die Kultivierung dreidimensionaler Zellaggregate, sogenannter Spheroiden, bildet die Grundlage für zahlreiche Studien. So führten Sutherland et al. in den 70er Jahren die multizellulären Tumorspheroiden als *in vitro* Modell zur Untersuchung von Tumorzellen ein und legten damit eine wichtige Grundlage für weitere Forschungsarbeiten zu Themen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelltod, Angiogenese oder Immunantwort (32). Auch für die Kultivierung von respiratorischem Epithel stellen die Spheroiden eine sehr gute, nicht adhärenz, dreidimensionale Form der Zellkultur dar.

1956 wurde durch das "Tissue Culture Laboratory" der Universität von Texas erstmalig erfolgreich menschliches Epithel aus Trachea und Bronchien kultiviert (33). Corssen und Allen nutzten diese Methode, um den Effekt von Lokalanästhetika auf respiratorisches Flimmerepithel zu untersuchen (34). Sie beschrieben 1958 wie sich bei gleichbleibender Elektrolytzusammensetzung unter konstanten osmotischen Bedingungen menschliches respiratorisches Flimmerepithel über mehrere Tage kultivieren ließ. Kurz nach Entnahme lagerten sich Fragmente des Epithels zu kleinen Kugeln, sogenannten „little globes“, zusammen. Aufgrund der schlagenden Zilien, die sich an der äußeren Oberfläche anordneten, fingen die Kugeln an zu rotieren. Der Zilienschlag konnte über mehrere Tage aufrecht erhalten werden und diente ihnen als Index für die Zellaktivität (34).

Mit Hilfe des nasalen Bürstenabstriches nach der Methode von Rutland und Cole (35) gelang es schließlich Bridges et al. multizelluläre Spheroiden aus menschlichem nasalem Epithel zu gewinnen und zu kultivieren (36). Die Probengewinnung mittels Bürstenabstrich war leicht und komplikationslos durchzuführen und wurde von den Probanden gut toleriert. Bridges et al. beschrieben die Spheroiden als zystische Gebilde, die durch die Zusammenlagerung der gewonnenen Epithelzellen entstehen und einen Durchmesser zwischen 50-700µm haben. Sie berichteten von einer morphologischen Polarität und von junctionalen Komplexen der Epithelzellen. Durch die Einfachheit ihrer Gewinnung und Kultivierung betrachteten die Autoren die Spheroid-Methode als ideal, um Elektrolyt- und Flüssigkeitstransporte, den

zellulären Stoffwechsel, sowie Medikamentenwirkungen im menschlichen respiratorischen Flimmerepithel genauer zu erforschen (36).

Viele verschiedene Arbeitsgruppen nutzten daraufhin diese Spheroid-Methode zur Kultivierung von respiratorischem Epithel aus der Nase. Jorissen et al. untersuchten die Ultrastruktur der Zilien (37), Pedersen et al. den Ionen- und Flüssigkeitstransport (38, 39) und Neugebauer et al. die Ziliogenese (40). Gamarra et al. entwickelten dieses Spheroid-Modell weiter und bestimmten über die Rotationsfrequenz der Spheroide die mukoziliäre Transportgeschwindigkeit des nasalen und bronchialen Flimmerepithels. Dabei war vor allem der Einfluss der Temperatur auf die Rotationsfrequenz der Spheroide, sowie die Wirkung von Isoproterenol von Interesse (41).

Vergleicht man die Zellmorphologie und die Zilienfunktion des respiratorischen Epithels aus Nase und Bronchien in vitro, ergeben sich keine großen Unterschiede (42). Beide Zellkulturen sind sich sehr ähnlich, jedoch stellt die Einfachheit der Gewinnung von nasalem Epithel mittels Bürstenabstrich einen großen Vorteil dar, verglichen mit der aufwendigen Gewinnung von Bronchialepithel während einer Bronchoskopie. Die Entnahme von nasalem Epithel durch einen einfachen Bürstenabstrich ist risikoarm und es stehen sehr viele Probanden zur Verfügung. So bewährte sich diese Methode auch in der hier durchgeführten Versuchsreihe.

4.1.2 Kultivierbarkeit der nasalen Spheroide

In der vorliegenden Arbeit verlief die Kultivierung der Spheroide aus dem nasalen Epithel stets problemlos. In allen Kulturen der 7 Probanden lagerten sich die entnommenen Epithelstreifen innerhalb eines Tages zu Spheroïden zusammen. Lediglich von einem Probanden musste die Kultur verworfen werden, da sich in allen 6 Wells zu wenig Spheroide für die Versuchsdurchführung bildeten. Der Anteil der rotierenden Spheroide lag im Mittel bei 3,6%. Kontaminationen während der Kultivierung, wie in früheren Studien bei Proben von Mukoviszidose-Patienten beschrieben, traten hier nicht auf. Für die Versuche hier wurden ausschließlich Probanden ohne Vorerkrankungen rekrutiert.

4.1.3 Technik der Kulturanlage

Das durch den Bürstenabstrich gewonnene Material wurde zunächst in 3 mit AECGM Medium gefüllte Petrischalen gewaschen. Dabei war darauf zu achten, möglichst viel Material, bestehend aus einzelnen Epithelzellen, Epithelstreifen und Schleim, mit der Pipette aufzunehmen und in die nächste Schale zu befördern. Mögliche Verunreinigungen, wie

Staubpartikel und Haare, sollten dabei nicht weiterpipettiert werden. Dieser dreimalige Waschvorgang ermöglichte eine weitgehend reine Kulturanlage von nasalen Epithelzellen. Das Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECGM), angereichert mit NCS, diente als Trägersubstanz der Kultur. Dieses serumfreie Medium wurde speziell für die *in vitro* Kultivierung von Epithelzellen der großen Atemwege, wie Nase, Bronchien und Trachea, optimiert (43). Zur Verhinderung einer Kontamination der Kultur, wurden dem Medium auch noch das Antimykotikum Amphotericin B und eine Antibiotikakombination aus Penicillin/Steptomycin zugefügt. In früheren Versuchsreihen unsere Arbeitsgruppe mit Kulturen von Mukoviszidose Patienten waren bei dieser Antibiotikakombination gehäuft Kontaminationen mit Bakterien aufgetreten (44). Für die Kultivierung von nasalen Spheroide gesunder Spender scheint die Penicillin/Streptomycin Antibiotikakombination ausreichend zu sein, denn es traten im Verlauf bei keiner der hier angelegten Kulturen Kontaminationen mit Bakterien auf.

Nach dem Waschvorgang wurde das Material auf 6 Inserts aufgeteilt. Die Inserts wurden in die oberste Reihe einer 24-Loch-Multiwellplatte gestellt. Der Boden der Inserts besteht aus Kernspurmembranen, sogenannten Track-Etch-Membranen, hergestellt aus dem Kunststoff Polyethylenterephthalat (PET). Durch ihre Transparenz sind sie besonders für das Fluoreszenzmikroskop geeignet (45). Sie sind außerdem sehr stabil und ermöglichen durch ihre durchlässigen Poren die Diffusion von Molekülen und Nährstoffen, sodass auch AECG-Medium aus dem Well in die Inserts diffundieren konnte. Die Spheroide ordneten sich relativ oberflächennah an und kamen mit relativ wenig Medium aus. Unter täglicher mikroskopischer Kontrolle wurde nur bei Bedarf 20-50 µl frisches Medium zugegeben, um einer Austrocknung entgegenzuwirken. Diese Kulturtechnik wird als „air liquid interface“ Kultur bezeichnet und schafft für das nasale Epithel möglichst physiologische Bedingungen (46). Jeweils am zweiten Tag nach Kulturanlage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das Nährstoffangebot und den pH-Wert konstant zu halten. Dieses Vorgehen hat sich bei früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe bewährt.

Der Schleim, auch Mukus genannt, der beim Bürstenabstrich der Nase automatisch an den Epithelzellen haftet, scheint unserer Erfahrung nach für die Zusammenlagerung der nasalen Epithelzellen und für ihre Entwicklung zu rotationsfähigen Spheroide eine wichtige Rolle zu spielen. Deshalb wurde dieser auch bei der Zellkultivierung nicht entfernt. Jedoch stellte der Mukus nach Anfärben der Spheroide mit dem Calciumindikator Fluo-4 AM, vor allem während der Beobachtung der Spheroide unter dem Fluoreszenzmikroskop, einen entscheidenden Störfaktor dar. Deshalb wurde der Schleim mittels DTT am 3. bzw. 4. Tag der Kultivierung kurz vor der Fluo-4 AM Färbung entfernt. Dafür wurde die Kultur für 8

Minuten mit einer 5 mM DTT-Lösung inkubiert. Durch Abtupfen der Inserts auf einer sterilen Kompresse und durch einmaliges Waschen mit dem AECG-Medium konnte der Schleim entfernt werden. DL-Dithiothreitol (DTT) löste den Schleim durch Reduktion seiner Disulfidbrücken und verbesserte dadurch die Versuchsbedingungen (47). Die angefärbten Spheroide waren so unter dem Fluoreszenzmikroskop klar voneinander abzugrenzen und wurden nicht durch Schleim verdeckt.

4.1.4 Arbeit am Fluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine effektive Methode der Lichtmikroskopie zur Lokalisierung von Proteinen, die mit fluoreszierenden Substanzen markiert wurden, innerhalb einer Zelle. Aber auch Messungen, wie die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, können am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt werden. Fluoreszierende Stoffe werden durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt, sodass Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Unter Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge erreichen die angeregten Elektronen wieder ihr ursprüngliches Energieniveau. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um bestimmte Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen (48).

Da die zytosolische Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_z$) in den Zellen nur 0,1 μM beträgt (49), erfordert die Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ hoch sensitive Messmethoden. Im Laufe der Jahre hat sich die Verwendung von fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatoren am Fluoreszenzmikroskop zur Quantifizierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration etabliert. Die Ca^{2+} -Indikatoren interagieren nur mit freiem, nicht gebundenen Ca^{2+} . Durch die Bindung an Ca^{2+} ändern diese fluoreszierenden Substanzen ihre Eigenschaften, was unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann (50). In unserer Arbeitsgruppe verwenden wir vor allem Fura-2 und Fluo-4. Fluo-4 ist eine Weiterentwicklung des weit verbreiteten Ca^{2+} -Indikators Fluo-3 zur Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ zwischen 100nM und 1 μM (51-54). Fluo-4 kann schnell geladen werden und bietet mit seiner Absorptionswelllänge von 488nm auch eine stärkere Fluoreszenz Emission als Fluo-3, sodass bereits geringe, weniger phototoxische Fluo-4 Konzentrationen intrazelluläres Ca^{2+} sehr gut markieren (52). Steigende $[\text{Ca}^{2+}]_z$ gehen mit steigender Fluoreszenzemission einher, weshalb sich Fluo-4 für die Beobachtung von Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ sehr gut eignet. Fluo-4 wird meist als Fluo-4-Acetoxymethyl(AM)-Ester zubereitet verwendet. Durch die Modifikation der Carboxylgruppen mit Acetoxymethyl-Ester Gruppen entstehen ungeladene Fluo-4 Moleküle, welche die Zellmembran leicht durchdringen können. Einmal in der Zelle, werden die Acetoxymethylgruppen von

unspezifischen Esterasen wieder abgespalten, neue Fluo-4 Molekülen können nachdiffundieren und eine intrazelluläre Anreicherung wird möglich gemacht (55).

Das Beladen der Spheroiden erfolgte nach einem festgelegten Schema, wie im Material und Methoden Teil beschrieben. Nach der 45-minütigen Inkubationszeit mit der Fluo-4 AM Lösung, wurde die Kultur zur Erholung in eine sHBSS Lösung für weitere 45 Minuten gestellt. Während der Erholungszeit erfolgte die Deesterifizierung des Farbstoffes. Wie oben beschrieben wird durch diese Abspaltung der Acetoxymethylgruppen mittels unspezifischer Esterasen der Farbaustritt aus den Zellen verhindert.

4.1.5 Photobleaching

Bei der Arbeit mit fluoreszierenden Farbstoffen darf das Problem des Photobleachings nicht außer Acht gelassen werden. Unter Photobleaching versteht man einen dynamischen Prozess, der für die Abnahme des Fluoreszenzsignals verantwortlich ist. Fluorophor-Moleküle werden durch das Anregungslicht photochemisch zerstört und verlieren dadurch ihre Fähigkeit zur Fluoreszenz (56). Das Fluoreszenzsignal ist dann nicht so hell wie eigentlich erwartet. So führt die starke Illumination abhängig von der Belichtungszeit und der Belichtungsintensität zu einem Abfall der Signalstärke des fluoreszierenden Calciumindikators Fluo-4 AM (57). Zur Minimierung des Einflusses von Photobleaching ist es von Bedeutung, die fluoreszierenden Farbstoffe, hier das Fluo-4 AM, bei Nichtgebrauch im Dunkeln aufzubewahren. Reagenzgläser und Platten, die das Fluo-4 AM oder photosensible Spheroiden enthielten, wurden jeweils von lichtundurchlässiger Alufolie umwickelt. Auch während des Färbevorgangs und während der Versuchsdurchführung am Fluoreszenzmikroskop war stets darauf zu achten, in einem abgedunkelten Raum zu arbeiten. Besonders wichtig war es, nur so viel Licht zu benutzen, wie absolut notwendig (58). Deshalb wurde die Belichtungszeit während der 35-minütigen Fotoserie auf jeweils 310ms pro Bild begrenzt.

Auch in diesen Versuchen war der Einfluss der Belichtungszeit deutlich zu erkennen. In der Cisplatingruppe sowie in der Kontrollgruppe kam es während der Beobachtungszeit von 35 Minuten zu einer kontinuierlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität. Um zu klären, ob der Abfall der Fluoreszenzintensität über die 35 Minuten in beiden Gruppen gleich stark war, haben wir die Steigung der Cisplatingruppe mit der Steigung in der Kontrollgruppe verglichen:

Cisplatingruppe: Steigung $m = -0,0553$

Kontrollgruppe: Steigung $m = -0,0665$

Der Unterschied zwischen den beiden Steigungen war tatsächlich nicht signifikant (p-Wert= 0,1807). Es wurde daher angenommen, dass die zwei Linien parallel verlaufen. Das bedeutet, dass der Abfall der Fluoreszenzintensität in beiden Gruppen gleich stark war. Der Abfall beruhte hier also nicht auf einer Abnahme der $[Ca^{2+}]_z$ als Reaktion auf die Inkubation mit Cisplatin, sondern war auf eine abnehmende Signalstärke des fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikators Fluo-4 AM während der Belichtungszeit, das sogenannte Photobleaching, zurückzuführen.

Diskutiert werden muss aber auch die Möglichkeit, dass der Farbstoff Fluo-4 während der Versuchsdurchführung aus den Spheroiden ausgetreten und es dadurch zur Abnahme der Fluoreszenzintensität in beiden Gruppen gekommen ist. Laut Produktinformation von Fluo-4 AM ist bekannt, dass kontinuierlich ein bisschen Farbstoff aus den Zellen austritt und auch in dem Review von Takahashi et al. wird dieses Problem aufgegriffen (55, 57). Auch Ca^{2+} selbst könnte während der Versuche aus den Zellen ausgetreten sein und so zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität im Zytoplasma der Spheroide geführt haben. Für den Transport von Ca^{2+} nach Extrazellulär gibt es plasmamembranständige Transporter wie die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA), den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) und den $Na^+/Ca^{2+}-K^+$ -Austauscher (NCKX) (59). Diese könnten für den Austritt von Ca^{2+} nach Extrazellulär verantwortlich sein und zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität der Spheroide in beiden Gruppen über die 35 Minuten geführt haben.

Zu beiden Theorien passt die Entwicklung der Grundfluoreszenz des Mediums. Hier konnten wir in beiden Gruppen einen leichten Anstieg über 35 Minuten nachweisen. Einen Unterschied zwischen der Cisplatingruppe und der Kontrollgruppe zeigte sich allerdings nicht, sodass Cisplatin auf die Entwicklung der Grundfluoreszenz keinen Einfluss zu haben scheint.

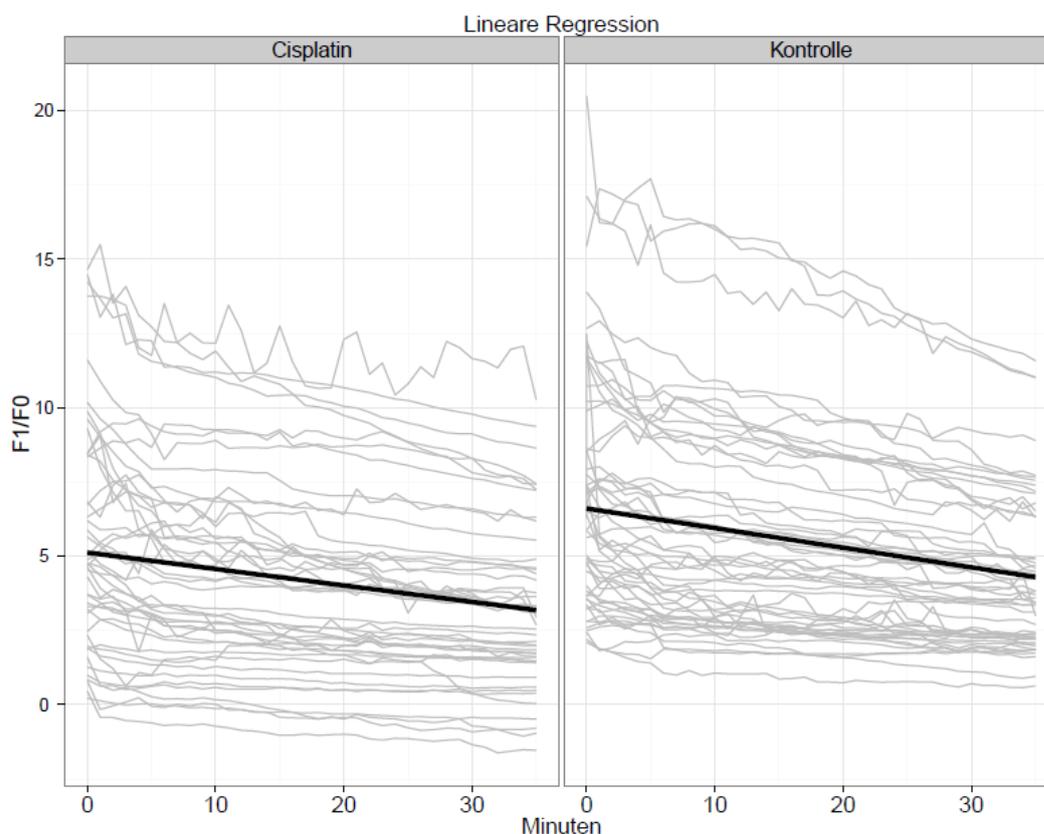


Abbildung 14: Der Effekt des Photobleachings

In der Cisplatingruppe und in der Kontrollgruppe kam es während der 35 Minuten Beobachtungszeit zu einem kontinuierlichen Abfall der Fluoreszenzintensität. Der Unterschied zwischen den zwei Steigungen war nicht signifikant, d.h. beide Gruppen verloren gleich schnell an Fluoreszenzintensität.

Aus unseren Beobachtungen geht jedoch hervor, dass der Effekt des Photobleachings den weitaus größeren Anteil daran hat, warum die Fluoreszenzintensität in beiden Gruppen kontinuierlich abfiel. Dies wird besonders deutlich, wenn man den Kurvenverlauf in den ersten 5 Minuten mit dem Kurvenverlauf in den darauffolgenden 30 Minuten vergleicht. In den ersten 5 Minuten, in denen die Spheroide alle 10 Sekunden zur Erstellung einer Bilderserie belichtet wurden, zeigte sich in beiden Gruppen ein viel stärkerer Abfall als in den darauffolgenden 30 Minuten, in denen nur noch alle 60 Sekunden ein Bild erstellt wurde. So waren auch die negativen Steigungen der Kurven in den ersten 5 Minuten (Cisplatingruppe $m = -0,1730$; Kontrollgruppe $m = -0,1409$) viel größer als die negativen Steigungen in den darauffolgenden 30 Minuten (Cisplatingruppe $m = -0,0554$; Kontrollgruppe $m = -0,0665$). Es wird somit deutlich, dass je häufiger die Spheroide belichtet wurden, desto stärker fielen die Kurven auch ab und die Spheroide verloren dementsprechend an Leuchtkraft. Die Fluoreszenzintensität korreliert also mit der Belichtungszeit.

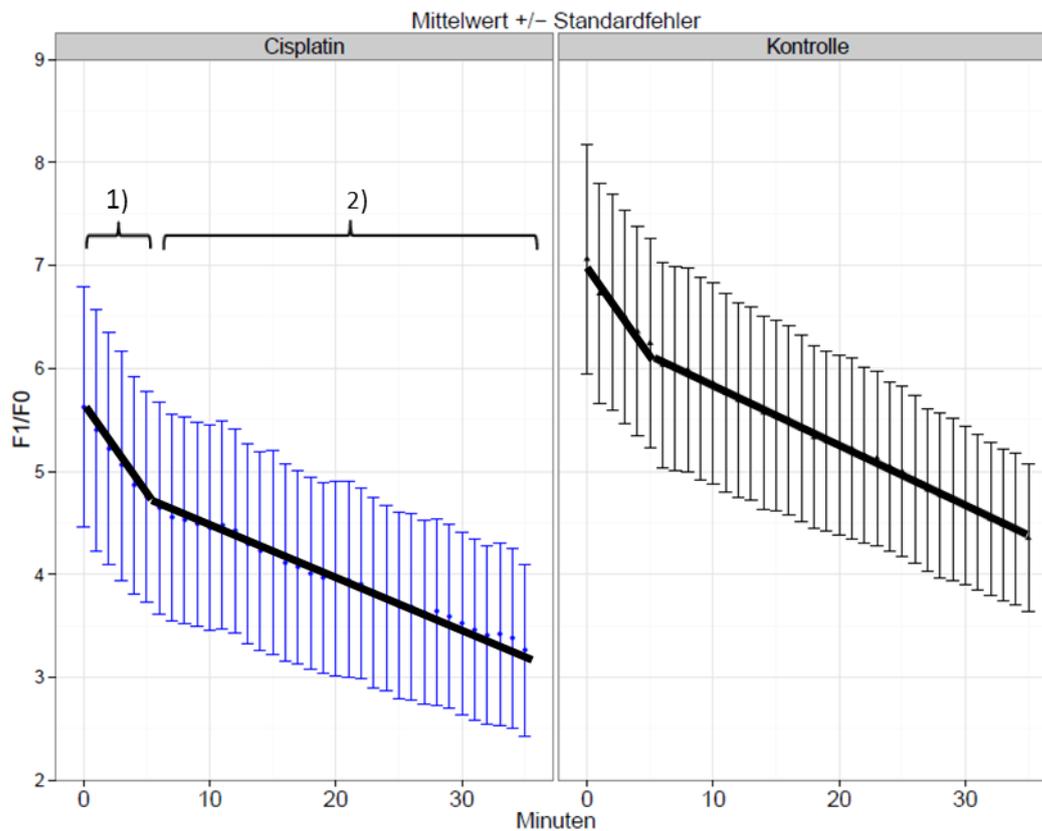


Abbildung 15: Der Effekt des Photobleachings mit Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit

1) In den ersten 5 Minuten: Belichtung der Spheroide alle 10 Sekunden

2) In den darauffolgenden 30 Minuten: Belichtung der Spheroide alle 60 Sekunden

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität korrelierte mit der Belichtungszeit. Der Effekt des Photobleachings war in beiden Gruppen gleich. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Steigungen der Cisplatingruppe und Kontrollgruppe.

4.1.6 Austritt von Farbstoff

Bei der Auswertung der Grundfluoreszenz im Medium fiel auf, dass es im Verlauf über die 35 Minuten in beiden Gruppen zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenzintensitäten kam. Die berechnete Steigung war $m = 0,0105$ in der Cisplatingruppe und $m = 0,0133$ in der Kontrollgruppe. Die Entwicklung der Grundfluoreszenzen war in beiden Gruppen gleich, da der Unterschied der jeweiligen Steigungen nicht signifikant war. Wie ist nun diese Zunahme der Fluoreszenzintensität im Medium um die Spheroide herum zu erklären? Eigentlich müsste es auf Grund des Photobleachings zu einer Abnahme der Grundfluoreszenz kommen. Wir nehmen an, dass es aufgrund eines Farbaustrittes von Fluo-4 AM aus den Spheroide zu einer Anreicherung von Farbstoff im Medium gekommen ist und damit zu einem Anstieg der Hintergrundfluoreszenz. Das Problem mit dem Austritt von Farbstoff nach

Anfärben der Zellen ist bekannt und wird auch in den Review von Takahashi et al. diskutiert (57). Gee et al. konnten zeigen, dass der Farbaustritt von Fluo-4 ungefähr vergleichbar ist mit der Rate an Farbaustritt, wie er auch beim Fluo-3 schon beobachtet wurde (52).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Calcium – der Second Messenger

Calcium (Ca^{2+}) gilt als eines der wichtigsten und vielfältigsten Signalmoleküle der Zelle (24, 25, 60). Es ist als intrazellulärer Botenstoff (second messenger) allgegenwärtig und an einer Vielzahl von zellulären Signalwegen beteiligt. Abhängig vom räumlich-zeitlichen Muster der zytosolischen Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_z$), sowie von der Geschwindigkeit und Amplitude der Konzentrationsänderungen, steuert Ca^{2+} die unterschiedlichsten zellulären Prozesse. Durch seine Vielseitigkeit wird Ca^{2+} auch gerne als „universal“ bezeichnet (25). So spielt es eine wichtige Rolle bei der Transmitterfreisetzung neuronaler Synapsen, bei der Muskelkontraktion, bei der Transkription von Genen, sowie bei der Zelldifferenzierung und -proliferation (24, 25, 59). Viele verschiedene Autoren haben sich schon mit der Frage beschäftigt, wie dieses einfache zweiwertige Ion so viele verschiedene Prozesse innerhalb einer Zelle vermitteln kann (24, 60, 61).

Viele Signalwege konnten schon entschlüsselt werden und die Art und Weise, wie Ca^{2+} in der Zelle interagiert, wird immer besser verstanden. Dennoch bleiben bei diesem sehr komplexen Themengebiet noch viele Fragen offen.

Bekannt ist, dass Ca^{2+} auch bei der Einleitung der Apoptose eine wichtige Rolle spielt, und dass Chemotherapeutika wie Cisplatin über die Veränderung des Ca^{2+} -Haushaltes in der Zelle ihre Wirkung entfalten (19, 62-64). So wollten wir mit unseren Versuchen herausfinden, welche Wirkung Cisplatin auf gesunde Zellen des respiratorischen Epithels hat und wie es in den Ca^{2+} -Haushalt eingreift. Dazu müssen folgende pathophysiologische Zusammenhänge verstanden werden:

Über Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ werden in der Zelle Informationen weitergeleitet und ein sogenanntes Ca^{2+} -Signal erzeugt. Berridge und Kollegen verwenden zur Beschreibung des Ca^{2+} -Systems gerne den Begriff „ Ca^{2+} -Signaling-Toolkit“. Dieses „Toolkit“ beschreibt das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten (Ionenkanäle, Pumpen, Ionenaustauscher) in einer Zelle zur Erzeugung dieser Ca^{2+} -Signale (25). In der Plasmamembran gibt es dafür eine Vielzahl an verschiedenen Ca^{2+} -Kanälen, welche mechanisch, spannungsabhängig, von Liganden oder über den Füllungsstatus intrazellulärer Speicher gesteuert werden (24, 61). Dabei können diese Kanäle innerhalb von Millisekunden die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ auf das Zehnfache ansteigen lassen (60). Auch wir haben in

unseren Versuchen beobachtet, dass sich Konzentrationsänderungen der $[Ca^{2+}]_z$ innerhalb von Millisekunden ereignen und diese schwer messtechnisch einzufangen sind. Schon bevor wir am Fluoreszenzmikroskop mit der ersten Messung starteten, war die $[Ca^{2+}]_z$ in der Cisplatingruppe schon signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In Ruhe liegt die $[Ca^{2+}]_z$ im Bereich von 100nM. Die Zelle versucht die $[Ca^{2+}]_z$ auf diesem Niveau zu halten. Dafür werden intrazelluläre Speicher wie das ER oder die Mitochondrien genutzt, Ca^{2+} -bindende Proteine in Anspruch genommen oder Ca^{2+} nach extrazellulär gepumpt (27). Wird die Zelle durch Depolarisation, einen mechanischen Reiz oder durch hormonelle Stimulation aktiviert, führt der „on“-Mechanismus zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_z$ auf über 1 μ M (24). Das Ca^{2+} stammt entweder aus intrazellulären Speichern oder gelangt über Ionenkanäle auf der Plasmamembran aus dem extrazellulären Medium ins Innere (60).

Der wichtigste intrazelluläre Speicher von Ca^{2+} ist das Endoplasmatische Retikulum (ER) bzw. in Muskelzellen das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) (61). Die Freisetzung von Ca^{2+} aus diesen Speichern wird entweder durch Ca^{2+} selbst oder durch verschiedene Botenstoffe wie Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3), zyklische ADP-Ribose (cADPR), Nikotinsäureadeninucleotidphosphat (NAADP) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) kontrolliert. Das ER gibt daraufhin große Mengen an Ca^{2+} ins Zytosol frei und die $[Ca^{2+}]_z$ erhöht sich von 100nM auf 1 μ M (61). Am besten untersucht sind die IP_3 -Rezeptoren. Sie benötigen zur Öffnung IP_3 , werden aber zugleich durch die vorherrschende $[Ca^{2+}]_z$ reguliert (24).

Um ein genaues Ca^{2+} -Signal zu generieren und die Zelle schnell wieder in ihren Ruhezustand zu bringen, muss Ca^{2+} auch wieder aus dem Zytosol entfernt werden. Um den $[Ca^{2+}]_z$ wieder auf 100nM zu senken, werden verschiedene Pumpen und Austauscher benötigt. Zurück ins ER gelangt Ca^{2+} im Rahmen dieses „off“-Mechanismus über einen speziellen Transporter: die Sarco/Endoplasmatic-Reticulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) Pumpe. Sie pumpt Ca^{2+} unter ATP Verbrauch wieder ins Lumen des ER (65). Daneben gibt es für den Transport von Ca^{2+} nach Extrazellulär plasmamembranständige Transporter wie die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA), den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) und den Na^+/Ca^{2+} - K^+ -Austauscher (NCKX) (60). Das Zusammenspiel dieser Pumpen ist maßgeblich am Verlauf des Ca^{2+} -Signals beteiligt (59).

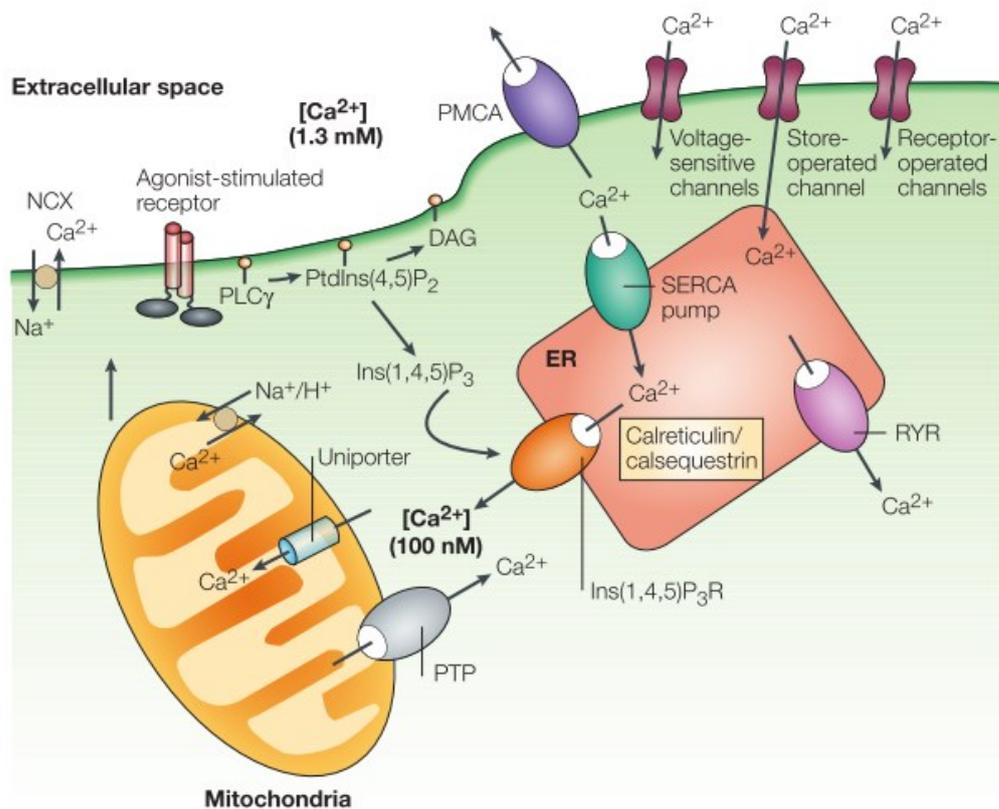


Abbildung 16: Das Zusammenspiel der verschiedenen Ca^{2+} -Kompartimente

Die Aufnahme von Ca^{2+} über die Plasmamembran erfolgt durch receptor-operated, store-operated oder voltage-operated Kanäle. In der Zelle bindet Ca^{2+} entweder an Ca^{2+} -bindende Proteine oder wird vom ER oder Mitochondrien aufgenommen. Im ER werden die Ca^{2+} -Spiegel von der Verteilung der SERCA Pumpe, den IP₃-Rezeptoren und den Ryanodin-Rezeptoren bestimmt, als auch von dem Gehalt an Ca^{2+} -bindenden Proteinen (Calreticulin, Calsequestrin) im ER. Die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ von 100nM in Ruhe wird durch Ca^{2+} -Aufnahme in das ER und durch die Ausschleusung nach Extrazellulär über die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) aufrechterhalten. Auch der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) transportiert Ca^{2+} nach Extrazellulär. Die Bildung von IP₃ führt zur Ca^{2+} -Ausschüttung des ER. Die Mitochondrien nehmen Ca^{2+} über einen Uniporter auf und können es über drei verschiedene Wege wieder loswerden: durch die Umkehr des Uniporters, $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+\text{H}^+$ -Austauscher oder über die Öffnung der Permeabilitäts-Transitions-Pore (PTP).

(aus Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nature reviews Molecular cell biology. 2003;4(7):552-65)

4.2.2 Der Einfluss von Cisplatin auf die Calcium-Homöostase in den ersten 35 Minuten

Viele verschiedene Metalle und Metallverbindungen, wie auch das Cisplatin, nehmen Einfluss auf dieses intrazelluläre Ca^{2+} -Signaling und können darüber den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten. Im Gegensatz zur Nekrose, unterliegt die Apoptose einer strengen Kontrolle. Sie spielt eine Rolle bei physiologischen Vorgängen, aber auch bei Entzündungen, bei malignen Tumoren, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Prozessen. Eine fehlerhafte Apoptose führt zu unkontrolliertem Zellwachstum, während die Induktion der Apoptose ausschlaggebend ist für den Erfolg einer Chemotherapie (64).

Daher ist dem genauen Verständnis, wie Cisplatin den Ca^{2+} -Haushalt der Zelle beeinflusst und darüber die Apoptose einleitet, eine große Bedeutung zuzuschreiben. Wie verändert sich die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ im respiratorischen Epithel während und nach der Inkubation mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin?

Bekannt ist, dass Cisplatin an Sulfhydryl-Gruppen von Proteinen bindet, welche Bestandteil von Kanälen und Pumpen sind. Über Konformationsänderungen wird deren Funktion beeinträchtigt und somit Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase genommen (64). Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ durch Cisplatin konnten bereits von zahlreichen Autoren nachgewiesen werden. Meist wird dabei eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ beschrieben (62, 63, 66). Deshalb haben auch wir bei unseren Versuchen mit den Sphroiden einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ während der Cisplatinexposition erwartet. Spletstoesser et al. wiesen eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ 15-35 Minuten nach der Cisplatin Exposition ihrer HeLa-S3 (human cervix adenocarcinoma) Zellen nach. Dagegen zeigte die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ in den ebenfalls untersuchten U2-OS (human osteosarcoma) Zellen nach Cisplatinbehandlung keine Veränderung (63). Tachikawa et al. wiederum beobachteten eine anhaltende Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ in ihren Epidermoid Tumorzellen während der Inkubation mit Cisplatin (66). Auch bei Kawai et al. zeigte sich in den untersuchten Nierenepithelzellen eine signifikante Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ ca. eine Stunde nach Cisplatininkubation (62).

Die Beobachtungen, die wir in unseren Versuchen in den ersten 35 Minuten nach Cisplatingabe gemacht haben, stehen zunächst einmal im Kontrast zu den oben aufgeführten Ergebnissen der anderen Autoren. Wir konnten einen Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ unmittelbar nach Cisplatingabe nachweisen. Bereits bei Erstellung des ersten Fotos war der Anfangswert der Cisplatingruppe ($F1/F0 = 5,58$) signifikant niedriger als in der Kontrolle ($F1/F0 = 6,94$). Im Schnitt zeigte sich die Kontrollgruppe 1.36 Punkte heller als die

Cisplatingruppe. Da die Fotoserien aus technischen Gründen immer erst zirka 10 Sekunden nach der Cisplatin- bzw. Placebogabe gestartet wurden, muss es unmittelbar nach der Cisplatingabe zu einem Abfall der $[Ca^{2+}]_z$ gekommen sein. Doch wie ist dieser rasante Abfall der $[Ca^{2+}]_z$ zu erklären?

Wir führen den schnellen initialen Abfall von $[Ca^{2+}]_z$ in unseren Versuchen auf eine Ca^{2+} -Aufnahme ins Mitochondrium zurück. Mitochondrien spielen bei der Speicherung von Ca^{2+} eine wichtige Rolle (67, 68). Mitochondrien besitzen einen schnellen Uniporter mit einer geringen Affinität, aber einer hohen Kapazität für Ca^{2+} und können signifikant die $[Ca^{2+}]_z$ senken. Trotz der geringen Affinität des Transporters, unter physiologischen Bedingungen Ca^{2+} aufzunehmen, können sich unter pathophysiologischen Bedingungen, wie beim einem plötzlichen Anstieg der $[Ca^{2+}]_z$, große Mengen an Ca^{2+} in den Mitochondrien ansammeln (26).

Wir nehmen an, dass Cisplatin als zytotoxischen Agens in der frühen Phase der Apoptose zur Freisetzung geringer Mengen des pro-apoptischen Proteins Cytochrom c aus den Mitochondrien führt. Cytochrom c bindet an den IP_3 -Rezeptor des ER, worauf große Mengen Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol freigesetzt werden (69, 70). Als Reaktion auf diese Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und bedingt durch den engen räumlichen Kontakt zum ER (71), nehmen die benachbarten Mitochondrien kompensatorisch Ca^{2+} auf und es kommt zu einem Ca^{2+} -Overload in den Mitochondrien (68-70, 72, 73). Zu diesem Zeitpunkt messen wir in unseren Versuchen eine erniedrigte $[Ca^{2+}]_z$.

In der Studie von Chandra wurden die frühen zytotoxischen Reaktionen von Nierenepithelzellen auf das Chemotherapeutikum Cisplatin untersucht (74). Hier kam es, wie auch in unseren Versuchen, in einigen Zellreihen zu einem Absinken der $[Ca^{2+}]_z$. Chandra nimmt an, dass die Zellen als Schutzmechanismus gegen Cisplatin initial die $[Ca^{2+}]_z$ durch einen kompensatorischen Ca^{2+} -Einstrom in die Mitochondrien reduzieren (74). Diese kompensatorische Ca^{2+} -Aufnahme ins Mitochondrium wäre auch eine Erklärung für den schnellen initialen Abfall von $[Ca^{2+}]_z$ in unseren Versuchen.

Viele Jahre dachte man, dass die schnelle mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme eine Art Sicherheitsmaßnahme sei, um die Zelle vor einem Ca^{2+} -Overload zu schützen (26). Mittlerweile jedoch weiß man, dass diese Ca^{2+} -Flüsse an der mitochondrialen Membran zum Ca^{2+} -Signaling gehören. Über die Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien werden Ca^{2+} -Signale aus dem Zytoplasma abgeschwächt oder es werden Ca^{2+} -sensitive Dehydrogenasen aktiviert, welche zur Stimulation der Atmungskette führen (24, 26). Eine dauerhafte Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien führt jedoch dazu, dass sich die sogenannten mitochondrialen Permeability-Transition-Poren (PTP) öffnen, die Mitochondrien anschwellen

und das pro-apoptische Protein Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt wird. Cytochrom c bindet an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (APAF-1), welcher über eine Konformationsänderung die Caspase-9 aktiviert. Über Caspase-9 werden Effektorcaspasen aktiviert (Caspase-3 und-7), die Caspase-Kaskade wird in Gang gesetzt und die Apoptose nimmt ihren Lauf (26, 69).

In Zusammenschau der Ergebnisse aus unseren Versuchen und aus der Literatur wird deutlich, dass Mitochondrien als Ca^{2+} -Puffer im Rahmen des Ca^{2+} -Signaling dienen. Sie können schnell auf Ca^{2+} -Anstiege reagieren, indem sie entweder das Energieangebot über die Atmungskette erhöhen oder mittels Apoptose den Zelltod einleiten (75).

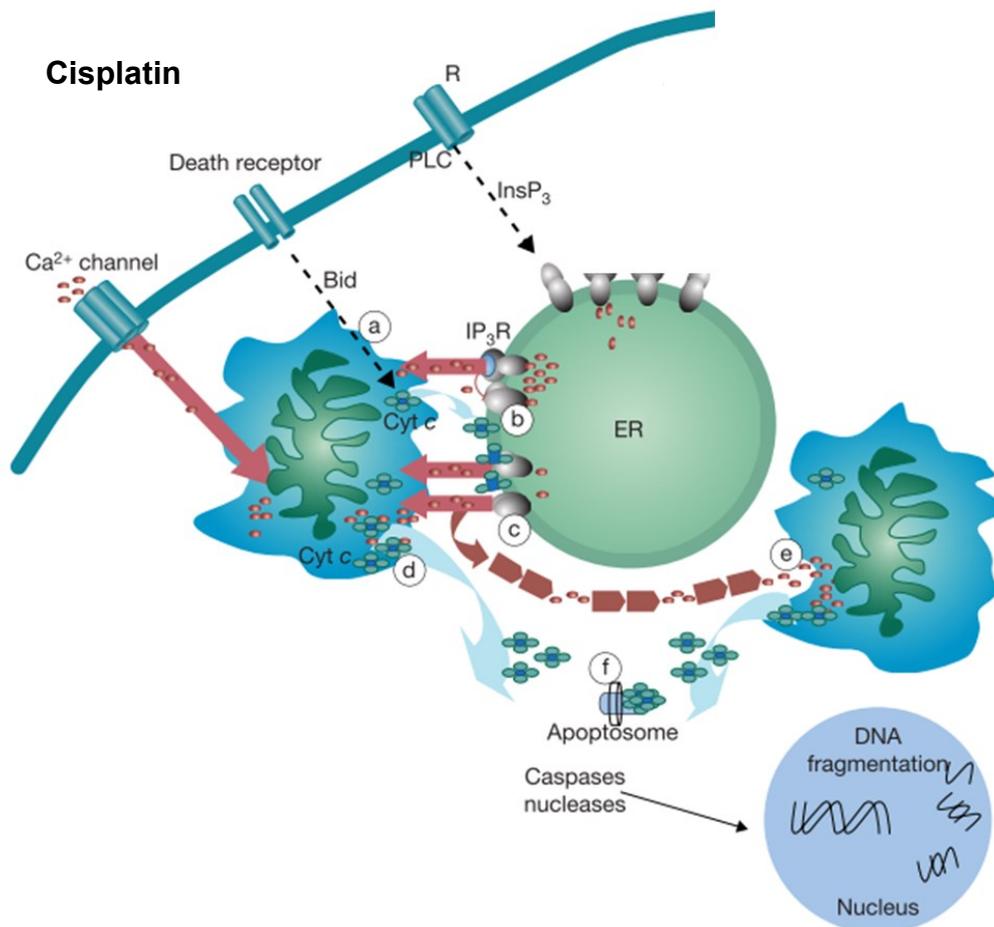


Abbildung 17: Ca²⁺ als Initiator der Apoptose

Die Zelle wird initial einem pro-apoptotischem Stimulus (z.B. Cisplatin) ausgesetzt. Stimuli hier im Bild: Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran und die Aktivierung des Todesrezeptors

a) Das einströmende Ca²⁺ oder das pro-apoptotische Protein Bid führen zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien.

b) Cytochrom c diffundiert zum benachbarten ER und bindet an den IP₃-Rezeptor.

c) Ca²⁺ wird aus dem ER freigesetzt.

d) und e) Die Erhöhung der [Ca²⁺]_z führt zur Ca²⁺-Aufnahme in die Mitochondrien. Der mitochondriale Ca²⁺-Overload triggert die Freisetzung von Cytochrom c.

f) Cytochrom c führt zur Bildung des Apoptosoms und zur Aktivierung der Caspasen.

Caspasen und Nucleasen führen über die Zersetzung des Kerns zum Zelltod.

(aus Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. Nature cell biology. 2003;5(12):1041-3.)

4.2.3 Calcium erhöht nach 24 Stunden

Konnten wir direkt nach Cisplatingabe noch einen Abfall der $[Ca^{2+}]_z$ in den Spheroiden nachweisen, so erhielten wir am darauffolgenden Tag ein ganz anderes Ergebnis. 18-24 Stunden nach der 3-stündigen Cisplatininkubation wurden die Spheroiden erneut mit Fluo-4 angefärbt und die Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dabei waren die Fluoreszenzwerte in der Cisplatingruppe (Mittelwert 13,58) deutlich höher als in der Kontrollgruppe (Mittelwert 11,08). 24 Stunden nach der Cisplatininkubation kommt es also zu einem signifikanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_z$ in den Spheroiden.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten, die im Rahmen der Dissertationsarbeit von Robinzonov in unserer Arbeitsgruppe erhoben wurden (76). Auch da konnte ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_z$ 24 Stunden nach einer 3-stündigen Inkubation von Spheroiden mit Cisplatin nachgewiesen werden. Eine Verbesserung der ziliären Schlagfrequenz durch die Cisplatininduzierte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_z$ konnte in den Versuchen von Robinzonov nicht beobachtet werden. Die schädigenden Einflüsse des Cisplatins überwogen, sodass trotz des Ca^{2+} -Anstiegs in den cisplatininkubierten Spheroiden die mukoziliäre Funktion der Spheroiden abnahm (76).

In der Literatur finden sich zahlreiche weitere Hinweise darauf, dass das Ca^{2+} , welches durch Cisplatin ins Zytoplasma freigesetzt wird, eine schädigende Wirkung auf die Zellen hat. Orrenius et al. beschreiben in ihrem Review ganz ausführlich die enge Verknüpfung zwischen Ca^{2+} und den verschiedenen Mechanismen der Apoptose (26). Mandic et al. untersuchten dazu die Wirkung des Chemotherapeutikums Cisplatin in ihren Versuchen mit humanen Melanomzellen (19, 77). Sie wiesen eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_z$ eine Stunde nach der Cisplatininkubation, sowie eine beginnende Apoptose nach. Sie konnten erstmals zeigen, dass Cisplatin über den Ca^{2+} -Anstieg im Zytoplasma die Ca^{2+} -abhängige Protease Calpain aktiviert. Calpain wiederum führt zur Aktivierung der im ER lokalisierten Caspase-12 und leitet die Apoptose ein (19, 77). Splettstoesser et al. berichten in ihren Versuchen mit HeLa-S3 Zellen (human cervix adenocarcinoma) ebenfalls von einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_z$ nach der Cisplatininkubation und von einer Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der Protease Calpain, welche ein Schlüsselprotein für die Triggerung der Apoptose darstellt (63).

Wir gehen davon aus, dass auch in unseren Versuchen mit den Spheroiden die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_z$ 24 Stunden nach Cisplatininkubation auf eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase hindeutet und die beginnende Apoptose anzeigt. Das Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum oder freigesetzt aus dem ER könnte dabei zu einem Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -

Konzentration führen, was wiederum die Öffnung der Permeability-Transition-Poren (PTP) und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien initiiert. Cytochrom c verstärkt die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER und aktiviert über Caspase-9 die Apoptose (26, 70).

Messverfahren zur Apoptosedetektion wurden bei unseren Versuchen mit den Spheroiden nicht angewandt. In zukünftigen Arbeiten wäre z.B. die Apoptosedetektion mittels Annexin V eine Möglichkeit, unsere pathophysiologischen Überlegungen zur cisplatininduzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ und gleichzeitiger Apoptoseinduktion noch zu untermauern.

Die Datenlage bezüglich der Frage, woher das Ca^{2+} stammt, das wir nach der Cisplatinbehandlung im Zytoplasma der Spheroide nachwiesen, ist noch uneinheitlich. Versuche zur direkten oder indirekten Erfassung der $[\text{Ca}^{2+}]$ im ER nach Cisplatinexposition führten wir im Rahmen dieser Arbeit nicht durch. Kawai et al. führten den Ca^{2+} -Anstieg in den Nierenepithelzellen eine Stunde nach Cisplatinbehandlung auf eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zurück (62). Zhang et al. und Kim et al. untersuchten die Wirkung von Cisplatin auf Zellen der Nierenrinde von Ratten bzw. Hasen. Sie kamen, wie auch Kawai et al., zu dem Ergebnis, dass der extrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt keinen Einfluss auf die Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ hat. Eine Erhöhung des extrazellulären Ca^{2+} im Medium, eine Pufferung des extrazellulären Ca^{2+} mittels EGTA oder der Einsatz von Ca^{2+} -Kanal Blockern beeinträchtigte die Cisplatinwirkung in der Zelle nicht. Dagegen konnte eine reduzierte Cisplatinwirkung nachgewiesen werden, wenn der Gehalt von $[\text{Ca}^{2+}]_z$ erniedrigt war oder seine Freisetzung aus intrazellulären Speichern blockiert wurde (78, 79). Auch Splettstoesser et al. konnten eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ nach Cisplatinexposition in ihren HeLa-S3 (human cervix adenocarcinoma) Zellen nachweisen. Jedoch halten sie eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern für unwahrscheinlich, sondern machten einen Ca^{2+} -Einstrom von Extrazellulär dafür verantwortlich (63). Ebenso hebt Florea et al. in ihrem Review den Cisplatin-getriggerten Ca^{2+} -Einstrom von Extrazellulär hervor (64). Es wird deutlich, dass zur Klärung der Frage, woher das Ca^{2+} stammt, das zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ nach Cisplatinexposition führt, noch weiter geforscht werden muss. Die Ergebnisse, die unsere Arbeitsgruppe in den letzten Jahren zu diesem Thema präsentierte, sprechen jedoch für eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER als Hauptquelle für $[\text{Ca}^{2+}]_z$ (72, 80). So konnte in der Arbeit von Schroedl et al. gezeigt werden, dass der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase in den untersuchten kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen nur eine untergeordnete Rolle spielt (72). Deshalb gehen auch wir in unseren Versuchen davon aus, dass die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, wie dem ER, für den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ 24 Stunden nach Cisplatininkubation verantwortlich ist.

Tian et al. untersuchten zu diesem Thema den Hedgehog Signalweg Hemmstoff GDC-0449 in naiven und Cisplatin-resistenten Lungenkrebszellen (80). Eine Dysregulation dieses Signalwegs wurde bereits in verschiedenen Krebszellen gefunden. Sie konnten in ihren Versuchen nachweisen, dass GDC-0449 die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase störte und dadurch das Zellwachstum in Lungenkrebszellen, sowie in Cisplatin-resistenten Zellen, verhindert wurde (80). Auch in ihren Versuchen war die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ der Lungenkrebszellen HCC (adenocarcinoma of the lung) und H1339 (small cell lung carcinoma) nach Exposition zu Cisplatin deutlich erhöht. Dagegen war die $[\text{Ca}^{2+}]$ im ER deutlich erniedrigt, sodass von einer Freisetzung von Ca^{2+} ausgegangen wurde. Die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_z$ leitet über einen mitochondrialen Ca^{2+} -Overload die Apoptose ein. In Cisplatin-resistenten Zellen dagegen hatte Cisplatin fast keinen Effekt auf die Ca^{2+} -Homöostase (80). Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen von Schrödel et al. In den von ihnen untersuchten kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass sich Cisplatin-resistente Zellklone durch einen verminderten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -Gehalt vor der Apoptose schützen (72).

Zusammengefasst wird durch all diese Daten deutlich, dass Cisplatin einen entscheidenden Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt in den verschiedensten Zelllinien nimmt. Die Ergebnisse dieser hier vorliegenden Arbeit weisen die Cisplatinwirkung in Zellen des respiratorischen Epithels von gesunden Probanden nach. Über einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]$ im Zytoplasma reagieren die Zellen auf das Chemotherapeutikum Cisplatin und es werden Signalwege wie die Apoptose eingeleitet.

4.2.4 Rolle von Calcium in der Resistenzentwicklung und Tumortherapie

2003 stellten Mandic et al. ihre Studie über die DNA- unabhängige Wirkung von Cisplatin vor. Sie berichteten, dass Cisplatin auch in kernlosen Tumorzellen, über eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$, die Apoptose einleiten konnte (19). Seitdem wird dem Calcium-Signaling in der Tumortherapie eine immer größere Bedeutung zugeschrieben und neue molekulare Wirkstoffe werden entwickelt. Wie z.B. der Wirkstoff Thapsigargin, der über eine Blockade der SERCA die Ca^{2+} -Aufnahme ins ER verhindert und so den Zelltod in Tumorzellen der Prostata einleitet (81). Ein großes Problem in der Tumortherapie ist die Chemotherapie Resistenz einiger Tumorzellen. Sie sprechen auf die Behandlung der Chemotherapeutika nicht an, proliferieren weiter und limitieren die Lebenserwartung der Patienten entscheidend (27). Auch hier konnten viele Autoren die Rolle von Ca^{2+} in der Resistenzentstehung nachweisen. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch Schrödl et al gezeigt werden, dass durch Pufferung des intrazellulären Ca^{2+} mit Hilfe des Ca^{2+} -Chelators BAPTA-AM eine

relative Resistenzentwicklung in Lungenkarzinomzellen nachgeahmt werden kann. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass Ca^{2+} an der Resistenzentwicklung sowohl kleinzelliger, als auch nicht-kleinzelliger Lungenkarzinomzellen beteiligt ist (72). Liang et al. untersuchten in ihren Versuchen die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ in humanen bronchialen Adenokarzinomzellen der Linie A₅₄₉. In den Cisplatin-resistenten Tumorzellen war die $[\text{Ca}^{2+}]_z$ um das Dreifache erniedrigt als in den Cisplatin-sensitiven Zellen. Die Autoren vermuteten, dass die verminderte $[\text{Ca}^{2+}]_z$ die Aktivität des P-Glykoproteins stimulierte und das Cisplatin aus der Zelle gepumpt wurde (82). Tsunoda et al. untersuchten Cisplatin-sensitive und Cisplatin-resistente Tumorzellen der Blase und legten ihr Augenmerk auf den IP₃-Rezeptor. Sie zeigten, dass sowohl in den Cisplatin-resistenten Tumorzellen als auch in den eigentlich Cisplatin-sensitiven Tumorzellen nach der Cisplatinbehandlung die Expression des IP₃ Rezeptors herunterreguliert wurde, wodurch weniger Ca^{2+} aus dem ER ins Zytoplasma gelang (83). Auch Splettstoesser et al. konnten den Einfluss des IP₃-Rezeptors auf die Wirkung von Cisplatin in ihren Studien nachweisen. In Hela-S3 Zellen führte Cisplatin zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ und darüber zur Einleitung der Apoptose. Wurde jedoch der IP₃-Rezeptor durch einen Antagonisten geblockt, fiel der Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_z$ weg und die Apoptose wurde nicht getriggert (63). Bereits diese Studie legt nahe, welche Rolle das ER bei der Entstehung von Cisplatinresistenzen spielt. Durch Schrödl et al. konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sich in Cisplatin-behandelten Lungenzellkarzinomzellen ein verminderter Ca^{2+} -Gehalt im ER einstellte und es dadurch zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin kam. Beobachtet wurde dabei jedoch eine Hochregulation des IP₃-Rezeptors und eine verminderte Expression der SERCA, was zu einem verminderten Ca^{2+} -Gehalt im ER führte (72). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Studie von Chen et al., die bei mehrfach medikamentenresistenten MCR-7 Tumorzellen der Brust einen Defekt der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, wie z.B. dem ER, nachweisen konnten (84). Normalerweise schädigen die Chemotherapeutika das ER und führen über eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ zur Apoptose. Ein defektes ER mit folglich verminderter $[\text{Ca}^{2+}]_z$ jedoch scheint die Zelle vor dem Zelltod zu beschützen und führt zur Resistenz. Der Ca^{2+} -Gehalt des ERs spielt also für die Effektivität einer Tumorthherapie eine wichtige Rolle (27). Obwohl Tachikawa et al. eine anhaltende Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_z$ in ihren Epidermoid Tumorzellen während der Inkubation mit Cisplatin beobachteten, kommen auch sie zu dem Ergebnis, dass die Ca^{2+} -Homöostase an der Resistenzentwicklung beteiligt ist (66). Über welche weitere Mechanismen die Chemotherapeutika den Ca^{2+} -Gehalt im ER beeinflussen und wie es dadurch zur Resistenzentstehung kommt, ist noch Gegenstand der Forschung (27).

4.3 Ausblick auf zukünftige Fragestellungen

Aus den Ergebnissen, die in dieser Arbeit erhoben worden sind, lassen sich neue Fragestellungen für zukünftige Arbeiten ableiten.

Zur Klärung der Frage, woher das Calcium stammt, das 24 Stunden nach Cisplatininkubation zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_z$ führt, könnten noch weitere Versuche durchgeführt werden. Wir schlossen anhand bereits erhobener Daten aus unserer Arbeitsgruppe und der Literatur darauf, dass das ER die Hauptquelle für das freigesetzte Ca^{2+} darstellt. Zur sicheren Unterscheidung, ob der Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum wirklich keine Rolle spielt, könnten Versuche analog zu unseren mit bzw. ohne extrazellulären Ca^{2+} durchgeführt werden. So könnten z.B. durch mehrfache Spülung der Zellen mit 0,02% EDTA/PBS Lösung Reste von extrazellulärem Ca^{2+} entfernt werden (81).

Zur Bestätigung der These, dass der Calciumanstieg 24 Stunden nach Cisplatinbehandlung auch wirklich die beginnende Apoptose anzeigt, könnten die Spheroiden auf Apoptosezeichen untersucht werden. Eine Möglichkeit wäre die Apoptosedetektion mittels Annexin V.

Interessant wäre auch zu erfahren, nach wie vielen Stunden genau die Calciumkonzentration im Zytosol der Spheroiden zu steigen beginnt. Hier wurden Messungen in einem Zeitraum zwischen 18 und 24 Stunden nach Cisplatinbehandlung durchgeführt. So wäre ein erneutes Anfärben 4, 8 und 12 Stunden nach Cisplatinkontakt zur besseren Abschätzung des Apoptosebeginns denkbar.

Sind die Ergebnisse auf andere Zellen übertragbar? Analoge Versuche mit anderen Zellen als den Spheroiden, z. B. mit Tumorzelllinien aus der Lunge, wären möglich.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die frühen Wirkungen von Cisplatin auf die zytoplasmatische Calciumkonzentration im respiratorischen Epithel zu erforschen. Cisplatin ist ein sehr effektives und weit verbreitetes Chemotherapeutikum für die Behandlung von soliden Tumoren, eingesetzt auch in der Therapie des Bronchialkarzinoms. Leider ist es auch für seine schweren nephrotoxischen, ototoxischen und neurotoxischen Nebenwirkungen bekannt. Viele Jahre wurde angenommen, dass Cisplatin vor allem über die Quervernetzung von DNA-Strängen seine zytotoxische Wirkung entfaltet. Mittlerweile weisen aber viele Studien darauf hin, dass es DNA-unabhängige Wirkmechanismen von Cisplatin gibt. Dabei rückte unter anderem das Signalmolekül Calcium in den Focus. Es wurde nachgewiesen, dass Calcium nicht nur eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Cisplatin-induzierten Apoptose spielt, sondern auch bei der Entstehung von Resistenzmechanismen. Zur Erforschung, wie Cisplatin auf gesunde Zellen wirkt, und wie es in die Calciumhomöostase eingreift, verwendeten wir ein dreidimensionales Kulturmodell. Mit Hilfe eines nasalen Bürstenabstriches wurde von gesunden Probanden respiratorisches Oberflächenepithel gewonnen und in einem flüssigen Medium kultiviert. Innerhalb weniger Tage lagerten sich die Epithelstreifen zu kugeligen Gebilden zusammen und bildeten sogenannte Spheroiden. Zur Markierung der Calciummoleküle im Zytoplasma der Spheroiden verwendeten wir den fluoreszierenden Farbstoff Fluo-4 AM. Dieser Calcium-Indikator interagiert nur mit freiem, nicht gebundenem Calcium und ändert durch Bindung an Calcium seine Eigenschaft. Steigende Calciumkonzentrationen im Zytoplasma gehen mit steigenden Fluoreszenzwerten einher, was unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann. Nach einem festgelegten Schema wurden die Spheroiden mit Fluo-4 AM angefärbt. Anschließend folgte eine 3-stündige Inkubation der Spheroiden mit Cisplatin. Eine Kontrollgruppe wurde unter gleichen Bedingungen mit einem Placebo, einer Cisplatin-freien Lösung, inkubiert. Unmittelbar nach Zugabe der Cisplatin- bzw. der Placebolösung wurde die Aufnahme einer 35-minütigen Bilderserie unter dem Fluoreszenzmikroskop gestartet. Anhand dieser Bilder konnte die Entwicklung der Calciumkonzentration in der Cisplatingruppe bzw. Kontrollgruppe ermittelt werden. Nach der 3-stündigen Inkubation und einer Erholungszeit von 24 Stunden wurden die Spheroiden erneut mit Fluo-4 AM angefärbt und ihre Calciumkonzentration bestimmt. Die Auswertung der Bilder brachte folgende Ergebnisse: In beiden Gruppen kam es während der ersten 35-minütigen Beobachtungszeit, in Abhängigkeit von der

Belichtungszeit, zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität. Dies ist als Folge des Photobleachingeffektes zu sehen. Unmittelbar nach Zugabe der Cisplatinlösung zeigte sich in der Cisplatingruppe allerdings eine signifikant niedrigere Fluoreszenzintensität, sodass die Kontrollgruppe im Schnitt um 1,49 Punkte heller war. Wir nehmen an, dass es durch das Cisplatin sehr früh zu einer Störung der Calciumhomöostase kommt und ein zytosolischer Calciumanstieg über eine kompensatorische Calciumaufnahme ins Mitochondrium abgefangen wird. Zu diesem Zeitpunkt messen wir eine erniedrigte Calciumkonzentration in den Cisplatin-behandelten Spheroiden. 24 Stunden nach der Cisplatininkubation ist schließlich eine deutlich erhöhte Calciumkonzentration im Zytosol nachweisbar. Dies deutet auf die beginnende Apoptose hin.

Durch unsere Versuche konnten wir bestätigen, dass Cisplatin Einfluss auf den Calcium-Haushalt in Zellen des respiratorischen Epithels nimmt. Über den Abfall und Anstieg der Calciumkonzentration im Zytoplasma reagieren die Zellen auf zytotoxische Substanzen und es werden Signalwege, wie die Apoptose, eingeleitet. Ein besseres Verständnis der biochemischen Wirkmechanismen von Cisplatin in gesunden Zellen, sowie in Tumorzellen, könnte dazu beitragen, neue nebenwirkungsärmere und effizientere Platinderivate für die Tumorthherapie zu entwickeln. Resistenzentwicklungen könnten verhindert und so die Lebenserwartung von Krebspatienten erhöht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965;205:698-9.
2. Florea AM, Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011;3(1):1351-71.
3. Dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, Dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Archives of toxicology*. 2012.
4. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of nucleic acids*. 2010;2010.
5. MEDAC. Fachinformation, Cisplatin 0,5mg/ml Lösung, http://www.medac.de/medac_international/data/doc/SPC_Cisplatin.pdf, Stand: 14.01.2014.
6. Braun J, Dalhoff K, Reck M. Bronchialkarzinom aktuell, Medikamente "Cisplatin", <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/index.php?id=162>, Stand: 14.01.2014.
7. MEDSAFE. Information for Health Professionals. Data Sheet "Cisplatin", <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/c/Cisplatinmaynepharmainj.pdf>, Stand: 14.01.2014.
8. de Jongh FE, Verweij J, Loos WJ, de Wit R, de Jonge MJ, Planting AS, et al. Body-surface area-based dosing does not increase accuracy of predicting cisplatin exposure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(17):3733-9.
9. Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Pulheim*2010. 942 p.
10. Casares C, Ramirez-Camacho R, Trinidad A, Roldan A, Jorge E, Garcia-Berrocal JR. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2012.
11. Hyppolito MA, de Oliveira JA, Rossato M. Cisplatin ototoxicity and otoprotection with sodium salicylate. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2006;263(9):798-803.
12. van der Hoop RG, van der Burg ME, ten Bokkel Huinink WW, van Houwelingen C, Neijt JP. Incidence of neuropathy in 395 patients with ovarian cancer treated with or without cisplatin. *Cancer*. 1990;66(8):1697-702.

13. Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Molecular pharmacology*. 2010;77(6):887-94.
14. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular pharmacology*. 2001;59(4):657-63.
15. Rasso J, Hauser K, Netzger R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006. 526 p.
16. Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Moon SI, Yoo DH, Lee HC, et al. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. *International journal of oncology*. 2006;28(1):119-25.
17. Yu F, Megyesi J, Price PM. Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;295(1):F44-52.
18. Burger H, Nooter K, Boersma AW, Kortland CJ, Stoter G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1997;73(4):592-9.
19. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(11):9100-6.
20. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical reviews in toxicology*. 2010;40(4):347-59.
21. Berndtsson M, Hagg M, Panaretakis T, Havelka AM, Shoshan MC, Linder S. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120(1):175-80.
22. Santos NA, Catao CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Archives of toxicology*. 2007;81(7):495-504.
23. Lee EL, Hasegawa Y, Shimizu T, Okada Y. IK1 channel activity contributes to cisplatin sensitivity of human epidermoid cancer cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;294(6):C1398-406.
24. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling--an overview. *Seminars in cell & developmental biology*. 2001;12(1):3-10.
25. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(1):11-21.
26. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(7):552-65.

27. Bergner A, Huber RM. Regulation of the endoplasmic reticulum Ca(2+)-store in cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2008;8(7):705-9.
28. Bergner A, Kellner J, Silva AK, Gamarra F, Huber RM. Ca²⁺-signaling in airway smooth muscle cells is altered in T-bet knock-out mice. *Respiratory research*. 2006;7:33.
29. Fleckenstein A, Janke J, Doring HJ, Leder O. Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*. 1974;4:563-80.
30. Bergner A, Kellner J, Tufman A, Huber RM. Endoplasmic reticulum Ca²⁺-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2009;28:25.
31. Rasband W. ImageJ-Webseite: <http://rsb.info.nih.gov/ij>, Stand: 01.06.2011.
32. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *The American journal of physiology*. 1997;273(4 Pt 1):C1109-23.
33. Corssen G, Allen CR. Cultured human respiratory epithelium: its use in the comparison of the cytotoxic properties of local anesthetics. *Anesthesiology*. 1960;21:237-43.
34. Corssen G, Allen CR. A comparison of the toxic effects of various local anesthetic drugs on human ciliated epithelium in vitro. *Texas reports on biology and medicine*. 1958;16(2):194-202.
35. Rutland J, Dewar A, Cox T, Cole P. Nasal brushing for the study of ciliary ultrastructure. *Journal of clinical pathology*. 1982;35(3):357-9.
36. Bridges MA, Walker DC, Harris RA, Wilson BR, Davidson AG. Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polar cyst-like model tissues. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 1991;69(2-3):102-8.
37. Jorissen M, Van der Schueren B, Tyberghein J, Van der Berghe H, Cassiman JJ. Ciliogenesis and coordinated ciliary beating in human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Acta oto-rhino-laryngologica Belgica*. 1989;43(1):67-73.
38. Pedersen PS, Frederiksen O, Holstein-Rathlou NH, Larsen PL, Qvortrup K. Ion transport in epithelial spheroids derived from human airway cells. *The American journal of physiology*. 1999;276(1 Pt 1):L75-80.
39. Pedersen PS, Holstein-Rathlou NH, Larsen PL, Qvortrup K, Frederiksen O. Fluid absorption related to ion transport in human airway epithelial spheroids. *The American journal of physiology*. 1999;277(6 Pt 1):L1096-103.
40. Neugebauer P, Endepols H, Mickenhagen A, Walger M. Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2003;260(6):325-30.

41. Gamarra F, Bergner A, Stauss E, Stocker I, Grundler S, Huber RM. Rotation frequency of human bronchial and nasal epithelial spheroids as an indicator of mucociliary function. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2006;73(5):664-72.
42. Devalia JL, Sapsford RJ, Wells CW, Richman P, Davies RJ. Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells in vitro. *Respiratory medicine*. 1990;84(4):303-12.
43. Produktinformation. <http://www.promocell.com/fileadmin/promocell/PDF/C-39160.pdf#page=1&zoom=auto,0,849>, Stand: 08.01.2014.
44. Kellermann C. Vergleich zweier Antibiotika-Kombinationen bei der Kultivierung humaner Nasalepithel-Sphäroide von Probanden mit Mukoviszidose, Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München 2010.
45. Produktinformation. <http://shop.ys-bio.com/images/upload/pdf/51909ccda9730.pdf>, Stand: 08.01.2014.
46. Mueller L, Brighton LE, Carson JL, Fischer li WA, Jaspers I. Culturing of Human Nasal Epithelial Cells at the Air Liquid Interface. 2013(80):e50646.
47. Produktinformation. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d0632?lang=de®ion=DE>. Stand 09.01.2014.
48. Heisel S, Habel N, Meese E. Praktikumsskript: Fluoreszenzmikroskopie und Zellaufbau http://www.uni-saarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/GrundPraktikum_Bioinf/V2_Meese_GP_Fluoreszenz.pdf, Stand: 13.01.2014.
49. Laporte R, Hui A, Laher I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacological reviews*. 2004;56(4):439-513.
50. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods*. 2008;46(3):143-51.
51. Perez-Terzic C, Stehno-Bittel L, Clapham DE. Nucleoplasmic and cytoplasmic differences in the fluorescence properties of the calcium indicator Fluo-3. *Cell calcium*. 1997;21(4):275-82.
52. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell calcium*. 2000;27(2):97-106.
53. Murphy JA, Criddle DN, Sherwood M, Chvanov M, Mukherjee R, McLaughlin E, et al. Direct activation of cytosolic Ca²⁺ signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 2008;135(2):632-41.
54. Singh S, Chitnis CE. Flow cytometry-based methods for measurement of cytosolic calcium and surface protein expression in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2013;923:281-90.

55. Produktinformation. <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/g002.pdf>, Stand: 13.01.2014.
56. Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke HJ. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal*. 1995;68(6):2588-600.
57. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews*. 1999;79(4):1089-125.
58. Praktikumsunterlagen. Fluoreszenzmikroskopie: <http://www.uni-marburg.de/fb20/cyto/lehre/praktikumsunterlagen/vl/fluoreszens>, Stand: 18.02.2014.
59. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(7):517-29.
60. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047-58.
61. Berridge M, Lipp P, Bootman M. Calcium signalling. *Current biology : CB*. 1999;9(5):R157-9.
62. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *Journal of pharmacological sciences*. 2006;100(1):65-72.
63. Splettstoesser F, Florea AM, Busselberg D. IP(3) receptor antagonist, 2-APB, attenuates cisplatin induced Ca²⁺-influx in HeLa-S3 cells and prevents activation of calpain and induction of apoptosis. *British journal of pharmacology*. 2007;151(8):1176-86.
64. Florea AM, Busselberg D. Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *Neurotoxicology*. 2009;30(5):803-10.
65. Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell calcium*. 2002;32(5-6):279-305.
66. Tachikawa T, Kumazawa H, Hori Y, Harada N, Sai S, Yamashita T, et al. Intracellular calcium changes and chemosensitivities of human epidermoid carcinoma cell lines after exposure to cisplatin. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. 1998;107(7):611-8.
67. Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B. Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *The Journal of cell biology*. 1997;136(4):833-44.
68. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, et al. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nature cell biology*. 2000;2(2):57-61.
69. Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature cell biology*. 2003;5(12):1051-61.
70. Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nature cell biology*. 2003;5(12):1041-3.

71. Hajnoczky G, Csordas G, Madesh M, Pacher P. Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell calcium*. 2000;28(5-6):349-63.
72. Schrodli K, Oelmez H, Edelmann M, Huber RM, Bergner A. Altered Ca²⁺-homeostasis of cisplatin-treated and low level resistant non-small-cell and small-cell lung cancer cells. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology*. 2009;31(4):301-15.
73. Hajnoczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, et al. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell calcium*. 2006;40(5-6):553-60.
74. Chandra S. Quantitative imaging of chemical composition in single cells by secondary ion mass spectrometry: cisplatin affects calcium stores in renal epithelial cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;656:113-30.
75. Santo-Domingo J, Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1797(6-7):907-12.
76. Robinzonow M. Der Einfluss von Cisplatin auf die mukoziliäre Funktion von gesunden Probanden. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität zu München. München 2014.
77. Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, et al. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(9):3003-13.
78. Zhang JG, Lindup WE. Role of calcium in cisplatin-induced cell toxicity in rat renal cortical slices. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 1996;10(2):205-9.
79. Kim YK, Jung JS, Lee SH, Kim YW. Effects of antioxidants and Ca²⁺ in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. *Toxicology and applied pharmacology*. 1997;146(2):261-9.
80. Tian F, Schrodli K, Kiefl R, Huber RM, Bergner A. The hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 alters intracellular Ca²⁺ homeostasis and inhibits cell growth in cisplatin-resistant lung cancer cells. *Anticancer research*. 2012;32(1):89-94.
81. Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(7):519-30.
82. Liang X, Huang Y. Intracellular free calcium concentration and cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Bioscience reports*. 2000;20(3):129-38.
83. Tsunoda T, Koga H, Yokomizo A, Tatsugami K, Eto M, Inokuchi J, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. *Oncogene*. 2005;24(8):1396-402.
84. Chen JS, Agarwal N, Mehta K. Multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells contain deficient intracellular calcium pools. *Breast cancer research and treatment*. 2002;71(3):237-47.

7 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. M. Huber, Leiter der Abteilung Pneumologie der Medizinische Klinik Innenstadt der LMU München, für die freundliche Aufnahme als Doktorandin und das interessante Thema.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Fernando Gamarra für die hervorragende Betreuung bei dieser Arbeit. Herr Dr. Fernando Gamarra unterstützte mich bei allen Fragen, theoretischen und technischen Problemen und gab stets neue Ideen und Anregungen. Seine angenehme Art erleichterte die Zusammenarbeit sehr.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der pneumologischen Abteilung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich dabei Rosemarie Kiefl, Fei Tian und Milena Robinzonov für die Einarbeitung in verschiedene Labortechniken und für die stets kollegiale und freundliche Zusammenarbeit.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. S. Endres, Leiter der Abteilung für klinische Pharmakologie der Medizinischen Klinik, sowie dessen Mitarbeitern für die Mitbenutzung der Räumlichkeiten und der Laborgeräte.

Herzlichen Dank an Dr. Nikolay Robinzonov für die großartige Hilfe bei allen statistischen Fragen.

Ebenfalls danke ich noch allen Probanden und Freunden, die mir Proben ihrer Nasenschleimhaut für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Familie und bei meinem Freund für die Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg bedanken. Ohne sie wäre die Fertigstellung dieser Arbeit neben dem Studium und dann während meiner Zeit als Assistenzärztin nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Versicherung

Penger, Andrea

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss des Chemotherapeutikums Cisplatin auf die Calcium Konzentration in Zellen des respiratorischen Epithels

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Moosburg, 12.1.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand