

**Die Wirkung der Echinocandine
auf das respiratorische Flimmerepithel der
murinen Trachea**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sabrina Müller
aus Lahr

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter/in: Prof. Dr. Michael Henrich D. Phil.

Gutachter/in: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Tag der Disputation: 12.03.2024

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS RESPIRATORISCHE FLIMMEREPIHEL DER TRACHEA	3
1.1.1	HISTOLOGIE UND FUNKTION DES TRACHEALEPITHEL	3
1.1.2	AUFBAU, FUNKTION UND KOORDINATION DER KINOZILIE	4
1.1.3	SIGNALTRANSDUKTION IN HUMANEN TRACHEALEPITHELZELLEN UND DIE ROLLE VON CALCIUM ALS ZENTRALER MEDIATOR	6
1.2	ECHINOCANDINE: NEUE ANTIMYKOTIKA	11
1.2.1	PHARMAKODYNAMIK DER ECHINOCANDINE	11
1.2.2	EINSATZSPEKTRUM IM KLINISCHEN ALLTAG BEI ERWACHSENEN	11
1.2.3	PHARMAKOKINETISCHE EIGENSCHAFTEN DER ECHINOCANDINE	12
1.3	FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	MESSUNG DER PTG	14
2.1.1	PRÄPARATION DER MURINEN TRACHEA	14
2.1.2	HEPES-PUFFER	17
2.1.3	BESCHICHTUNG DES KULTURSCHÄLCHENS	17
2.1.4	AUFBAU DES MIKROSKOPS	18
2.1.5	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	18
2.1.6	AUSWERTUNG DER VIDEOSEQUENZEN UND DATENERHEBUNG	20
2.2	INTRAZELLULÄRE CALCIUMMESSUNG MITTELS FLUORESZENZMIKROSKOPIE	22
2.2.1	KULTIVIERUNG DER ISOLIERTEN HTE-ZELLEN	22
2.2.2	AUFBAU UND FUNKTION DES FLUORESZENZMIKROSKOPS	23
2.2.3	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG DER INTRAZELLULÄREN CALCIUMMESSUNG MIT FURA-2AM	25
2.2.4	CALCIUMIMAGING UND AUSWERTUNG DER FURA-2-SIGNALE	28
2.2.5	CALCIUMIMAGING IM ER MITTELS MAG-FLUO-4-AM	29
2.2.6	VERWENDETE PUFFERSYSTEME	29
2.3	ÜBERSICHT UND WIRKWEISE DER IN DEN VERSUCHEN EINGESETZTEN AGENZIEN.	31

2.4 STATISTIK	34
2.4.1 GRAPHISCHE DARSTELLUNGEN	34
2.4.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PTG	34
2.4.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER FLUORESZENZOPTISCHEN CALCIUMMESSUNGEN	34
3 ERGEBNISSE.....	36
3.1 DIE WIRKUNG DER ECHINOCANDINE AUF DIE PTG DES TRACHEALEN FLIMMEREPIHELIS	36
3.1.1 CASPOFUNGIN	36
3.1.2 MICAFUNGIN UND ANIDULAFUNGIN.....	40
3.2 DER EINFLUSS VON CASPOFUNGIN AUF INTRAZELLULÄRE SIGNALKASKADEN UND MEMBRANGEBUNDENE REZEPTOREN	42
3.2.1 UNTERSUCHUNG INTRAZELLULÄRER SIGNALWEGE DURCH INHIBITION DER PKA.....	42
3.2.2 UNTERSUCHUNG WEITERER MEMBRANGEBUNDENER REZEPTOREN UND SECOND MESSENGER.....	44
3.3 DIE PTG IN CALCIUMFREIEM MILIEU	46
3.3.1 DER EFFEKT VON CAS IST UNABHÄNGIG VON DER CALCIUMFREIEN UMGEBUNG	46
3.3.2 IDENTIFIZIERUNG INTRAZELLULÄRER CALCIUMSPEICHER IN TRACHEALEPITHEL-ZELLEN DURCH COFFEIN.....	47
3.4 FLUORESZENZOPTISCHE CALCIUMMESSUNG IN HTE-ZELLEN MIT FURA-2 AM UND MAG-FLUO-4.....	49
3.4.1 CASPOFUNGIN BEWIRKT IN TRACHEALEPITHELZELLEN EINEN ANSTIEG DER INTRAZELLULÄREN CALCIUMKONZENTRATION $[Ca^{2+}]_i$	50
3.4.2 DER DURCH CASPOFUNGIN INDUZIERTER ANSTIEG DER $[Ca^{2+}]_i$ IST UNABHÄNGIG VON EXTRAZELLULÄREM Ca^{2+}	51
3.4.3 BETEILIGUNG MITOCHONDRIALER CALCIUMSPEICHER AM CASPOFUNGIN- INDUZIERTEN ANSTIEG DER $[Ca^{2+}]_i$	52
3.4.4 KEIN ANSTIEG DER $[Ca^{2+}]_i$ NACH ENTLERUNG DER COFFEINSENSITIVEN CALCIUMSPEICHER UND APPLIKATION VON CASPOFUNGIN	53

3.4.5	CASPOFUNGIN BEWIRKT EINE ELEVATION DER $[Ca^{2+}]_i$ NACH BLOCKADE DER IP_3 -REZEPTOREN DURCH 2-AMINOETHOXYDIPHENYLBORAT (2-APB)	54
3.4.6	BLOCKADE DES RYANODINREZEPTORS HEMMT DIE CASPOFUNGINREAKTION	55
3.4.7	ENTLEERUNG VON ER- Ca^{2+} -SPEICHER DURCH CASPOFUNGIN.....	58
4	DISKUSSION	62
4.1	CASPOFUNGIN STIMULIERT DIE PTG.....	62
4.2	CASPOFUNGIN BEWIRKT EINE CALCIUMFREISETZUNG AUS INTRAZELLULÄREN SPEICHERN	66
4.3	LIMITATIONEN DER ARBEIT	70
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	74
6	SUMMARY	75
7	REFERENCES	76
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	91
10	TABELLENVERZEICHNIS	93
11	VERÖFFENTLICHUNGEN UND VORTRÄGE.....	94
12	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	95
13	DANKSAGUNG	96
14	TABELLARISCHER LEBENS LAUF.....	97

1 Einleitung

Der stetige medizinische Fortschritt durch neue apparative, interventionelle und medikamentöse Behandlungsstrategien ermöglicht neue Therapiewege für kritisch kranke Patienten. Dies ist aufgrund der Multimorbidität jedoch häufig mit komplizierten Verläufen verbunden. Durch prolongierte, intensivmedizinische Behandlungen mit Einsatz von Antibiotika, Chemotherapeutika und Immunsuppressiva oder in Verbindung mit einem septischen Geschehen¹ können kritisch kranke Patienten eine Immunschwäche entwickeln, welche folglich zu Infektionen mit opportunistischen Erregern führen kann, zu denen Pilze wie *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. zählen^{2,3}. Bei kritisch kranken Patienten ist eine Candidämie die häufigste invasive Mykose, welche mit einer hohen Mortalität verbunden ist^{4,5}. Invasive Mykosen entstehen primär durch Translokation von *Candida* spp. aus dem Gastrointestinaltrakt oder der Haut. Seltener ist eine pulmonale Kolonisation von Pilzen für eine invasive Mykose ursächlich³. Dennoch spielt die Funktion der Lunge und deren Abwehrfunktion bei kritisch kranken Patienten eine zentrale Rolle und sollte durch den Einsatz von Antimykotika nicht beeinträchtigt werden.

Als empfohlene Erstlinientherapie werden die Echinocandine Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin bei invasiven Candidainfektionen, Candidämien bei neutropenen Patienten, aber auch als Sekundär- oder Kombinationstherapie bei Aspergillusinfektionen eingesetzt^{5,6}. Systemisch appliziert gelangen sie über die Blutbahn zu den Organen^{7,8}, wo sie ihre Wirkung durch die Hemmung der mykotischen 1,3- β -D-Glucan-Synthase entfalten können, welche verantwortlich für die mykotische Zellwandsynthese ist^{6,9}. Trotz des günstigen Nebenwirkungsprofils im Vergleich zu Azol-Antimykotika oder Amphotericin B zeigen einige Studien einen Einfluss der Echinocandine auf das Herz-Kreislauf-System¹⁰⁻¹³. Fallberichte beschreiben nach systemischer Applikation zusätzliche Einflüsse der Echinocandine auf die Funktion einzelner Organe¹⁴. Die bisher bekannten häufigeren Nebenwirkungen von Echinocandinen stellen neben der Beeinträchtigung des Herz-Zeit-Volumens anaphylaktische Reaktionen, Diarrhoe und eine Hepatotoxizität dar^{12,15,16}. Bedeutende Auswirkungen auf die Lunge wurden bisher noch nicht festgestellt.

Auch wenn eine Schwäche der spezifischen und zellvermittelten Immunabwehr besteht, kann der Körper durch angeborene anatomische und physiologische Barrieren, vertreten durch spezialisierte Epithelien, Infektionen verhindern. Daher spielt gerade bei kritisch kranken Patienten die intakte Funktion dieser Barrieren eine wichtige Rolle. Das Trachealepithel ist auf das Einfangen von Fremdmaterial durch den Mukus im Tracheallumen und auf den Abtransport dessen durch den gerichteten Zilienschlag des Flimmerepithels in Richtung Larynx spezialisiert¹⁷. Dort angekommen kann der Mukus samt Fremdpartikel, Erreger und Pathogenen abgehustet werden. Die mukoziliäre Reinigung ist ein essentieller, jedoch auch sehr sensibler Abwehrmechanismus der tiefen Atemwege, welcher durch zahlreiche endo- und exogene Einflussfaktoren moduliert werden kann^{18,19}. Weitere Studien haben gezeigt, dass auch eine Kolonisierung mit Pilzen diesen Mechanismus stören kann und eine Candida-Besiedelung der Atemwege eine Superinfektion mit Bakterien begünstigt^{20,2}. Aufgrund dieser Zusammenhänge wird in dieser Arbeit untersucht, welche Auswirkungen Echinocandine auf die mukoziliäre Clearance und auf die Trachealepithelzellen haben.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Aufgaben, der Aufbau und die Funktion des respiratorischen Epithels der Trachea und der Trachealepithelzellen erläutert. Anschließend werden die drei Echinocandine Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin vorgestellt und deren Wirkung und Einsatzspektrum genauer beschrieben.

1.1 Das respiratorische Flimmerepithel der Trachea

Die Wand der Trachea ist mit zilientragenden, schleimbildendem Epithel ausgekleidet, welches zusammenfassend als respiratorisches Epithel bezeichnet wird, da es auch in anderen Abschnitten der Atemwege wie im Nasopharynx oder in den Bronchien vorzufinden ist¹⁷. Das respiratorische Epithel ist neben der Anfeuchtung der Atemluft hauptsächlich für die Abwehr von Pathogenen und Fremdpartikel verantwortlich, die mit der inhalierten Atemluft in die Atemwege gelangen²¹. Der Mukus und der darunter liegende periziliäre Flüssigkeitsfilm dienen als physikalische und chemische Barrieren²². Darin enthaltene Glykoproteine, Immunglobuline, Enzyme wie Lysozym und antimikrobielle Peptide wie Defensine wirken synergistisch zur Abwehr inhalierter Pathogene. Glykoproteine bewirken eine suffiziente Anhaftung der inhalierten Partikel am Mukus, Immunglobuline opsonieren Erreger für patrouillierende Immunzellen, Lysozyme und Defensine führen zur Schädigung der mikrobiellen Membran. Die Sekretion des Mukus ist zudem abhängig von Temperatur, pH, Salzkonzentration und Osmolarität^{21,23}, was eine lokale Autoregulation und Anpassung der Schutzfunktion ermöglicht. Letztlich wird der Mukus samt Fremdpartikeln, Erregern und anderen Pathogenen durch den gerichteten Zilienschlag in Richtung Larynx transportiert, wo er durch einen Hustenstoß aus den Atemwegen entfernt werden kann. Diese Reinigungsfunktion wird zusammengefasst als „Mukoziliäre Clearance“ bezeichnet²⁴ und stellt einen essentiellen Abwehrmechanismus der Lunge dar, welcher bei Verlust der Homöostase oder bei fehlerhaftem Aufbau der Kinozilien zu schwerwiegenden Erkrankungen der Lunge führen kann²⁵⁻²⁷.

1.1.1 Histologie und Funktion des Trachealepithels

Die Trachea ist mit einem mehrreihigen, hochprismatischen Epithel ausgekleidet. Es setzt sich aus verschiedenen Zellen zusammen, um gemeinsam als respiratorisches Epithel seine spezifischen Aufgaben erfüllen zu können¹⁷. Vorherrschend sind die zilientragenden Zellen, welche mit ihren ca. 6 µm langen Kinozilien den Transport der periziliären Flüssigkeit und der darauf liegenden hochviskösen Mukusschicht übernehmen²⁸. Der Mukus wird von Becherzellen

gebildet, die als zweithäufigster Zelltyp vorzufinden sind. Maßgebend für die Sensorik und die interzelluläre Kommunikation sind die Bürstenzellen, die neuroendokrinen Zellen und die sekretorischen Zellen²⁹. All diese Zellen entstehen aus den pluripotenten Basalzellen¹⁷. Insgesamt stellt das tracheale Flimmerepithel ein Umgebungssensor dar, welcher auf wechselnde Umwelteinflüsse reagieren kann¹⁸.

Eine zilientragende Zelle besitzt im Schnitt 200 Kinozilien, die apikal in das Lumen der unteren Atemwege ragen und von einem niedrigviskösen periziliären Flüssigkeitsfilm umgeben sind. Diesem Flüssigkeitsfilm aufgelagert befindet sich die hochvisköse Mukusschicht, welche durch die wellenförmigen Schlagbewegungen der Kinozilien Richtung Larynx transportiert wird^{24,28,30}.

1.1.2 Aufbau, Funktion und Koordination der Kinozilie

Zilien sind in zahlreichen Organen vorzufinden, wie in der Tuba uterina, in der Niere, im cerebrospinalen Liquorsystem, in Spermien, Embryos und im respiratorischen System³¹. Bewegliche Zilien wie im respiratorischen Trakt werden als Kinozilien bezeichnet. Ohne Zilientätigkeit würden grundlegende physiologische Vorgänge wie die Embryogenese, die Fertilität oder die Abwehr von Pathogenen nicht möglich sein³².

Einzelnen betrachtet besitzt jedes Kinozilium ein Zytoskelett aus Mikrotubuli. Diese sind in einem 9+2 Muster angeordnet^{28,33} (Abbildung (Abb.) 1). Die Bewegung des Kinoziliums wird durch einen äußeren und einen inneren Dynein-Arm ermöglicht, welcher durch Spaltung von ATP und folglich allosterischer Konformationsänderung an den äußeren Mikrotubulidubletten entlang gleitet^{34,35}. Durch komplexe Abfolgen dieser Interaktion entsteht ein koordinierter Zilienschlag, welcher aus einem schnellen Effektschlag und einem langsamen Erholungsschlag besteht^{28,10} (Abb. 2)^{36,37}.

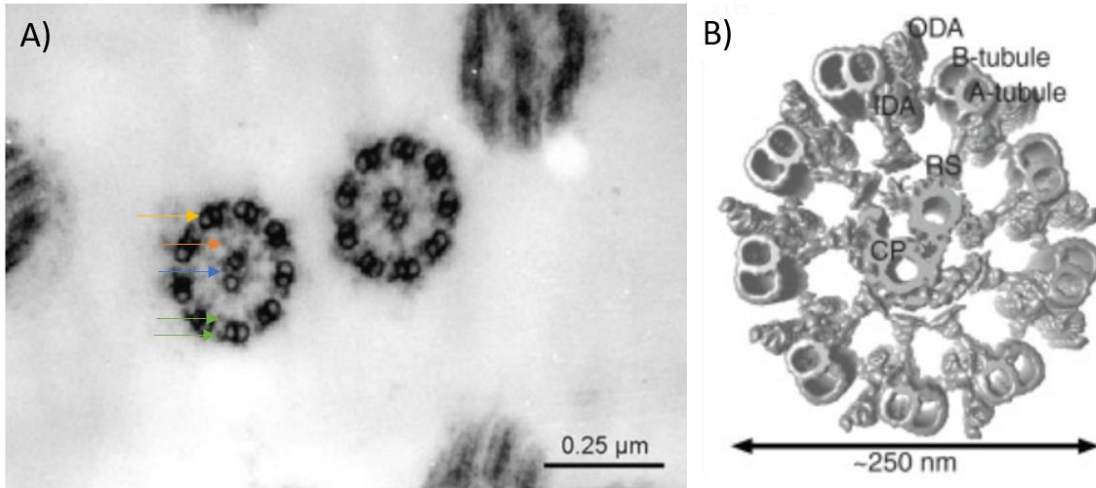


Abbildung 1: Querschnitt der Kinozilien, bestehend aus Mikrotubuli im (9+2)-Muster A) Elektronenmikroskopische Aufnahme. In der Bildmitte befinden sich zwei Kinozilien im Querschnitt, welche jeweils ein zentrales Mikrotubulipaar (blauer Pfeil) aufzeigen, umgeben von neun Mikrotubulidubletten (gelber Pfeil). Angedeutet erkennbar sind ebenfalls die Radialspeichen (oranger Pfeil), als auch die äußeren und inneren Dyneinarmen (grüne Pfeile). Die Länge des schwarzen Balkens markiert die Länge von 0,25 µm. Abbildung mit Erlaubnis von Annual Reviews Inc., Salathe et al 2007¹⁸. Copyright © Annual Reviews Inc. Alle Rechte vorbehalten. Erlaubnis vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc. B) Cryoelektronentomographie eines Kinoziliums zur detaillierten Darstellung der verschiedenen Zilienelemente: ODA = äußerer Dyneinarm, IDA = innerer Dyneinarm, RS = radiale Speiche, Mikrotubuli gekennzeichnet als A-tubule, B-tubule und CP (zentrales Paar). Abbildung mit Erlaubnis der Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ishikawa et al 2017³¹, Copyright © Cold Spring Harbor Laboratory Press. Alle Rechte vorbehalten.

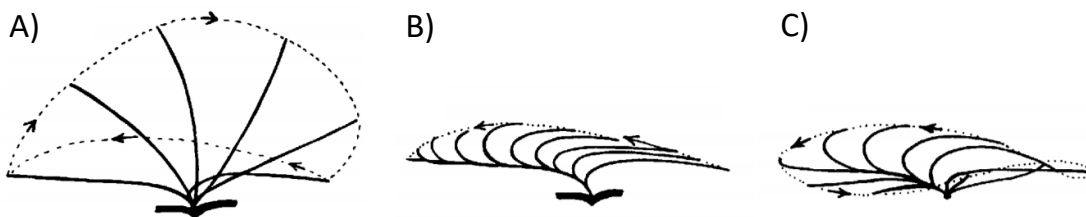


Abbildung 2: Skizze der Zilienschlagbewegung, die sich in zwei Phasen einteilen lässt. A) Der Effektivschlag in seitlicher Ansicht. In dieser Phase ragt das gestreckte Kinozilium mit seiner Spitze in die Mukusschicht hinein. B) Der Erholungsschlag in seitlicher Ansicht. In dieser Phase gleitet das gestauchte Kinozilium unterhalb der Mukusschicht im periziliären Flüssigkeitsfilm zur Ausgangsposition zurück. Profil A) und B) spiegeln gleiche Zeitintervalle wider. C) Ansicht von oben, beide Phasen zusammengefasst. Während des Erholungsschlags schwingt das Kinozilium zur Seite. Die gepunkteten Linien markieren den Verlauf der Kinozilienspitze. Diese Koordination des Zilienschlags führt zum gerichteten Transport der Mukusschicht. Abbildung mit Erlaubnis der American Thoracic Society, Sleigh et al 1988²⁸, Copyright © 2021 American Thoracic Society. Alle Rechte vorbehalten.

Von großer Bedeutung für den Transport der Mukusschicht ist die Tatsache, dass die Zilienspitze während des Effektschlags in die hochvisköse Mukusschicht eindringt, während der Erholungsschlag zur Ausgangsposition zurück durch die seitliche Abweichung im niedrigviskösen periziliären Flüssigkeitsfilm verläuft. Tracheale Kinozilien von Säugetieren schlagen *in vitro* unter Ruhebedingungen bei 37°C in einer Grundfrequenz von ungefähr 10-20 Hz^{28,30,38}. Die Schlagfrequenz kann bei Bedarf verdoppelt oder gar verdreifacht werden²⁸. Die Steigerung der Zilienschlagfrequenz (CBF) unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren wie der Temperatur, des pH-Wertes, mechanischem Stress und endokriner Stimulation, welche durch Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren eine intrazelluläre Signaltransduktion durch „second messenger“, hervorrufen^{18,39}. Dies mündet in einer gesteigerten Interaktionsrate von Dynein mit den Mikrotubuli der Kinozilien³⁴, sodass die erhöhte CBF eine Beschleunigung der Partikeltransport-geschwindigkeit (PTG) bewirkt und somit die mukoziliäre Clearance effektiv an wechselnde Umwelteinflüsse und Kontaminationen angepasst werden kann.

1.1.3 Signaltransduktion in humanen Trachealepithelzellen und die Rolle von Calcium als zentraler Mediator

Erreicht die zilientragende Trachealepithelzelle ein physiologisches Signal, werden intrazelluläre Signalkaskaden über spezifische Rezeptoren und evtl. unter Einbeziehung von Ionenkanälen der Zellmembran in Gang gesetzt, um eine Reizantwort zu generieren. Dieses Zusammenspiel der „second messenger“ ist hoch komplex und fein abgestimmt⁴⁰. Eine der wichtigsten „second messenger“ der zilientragenden Trachealepithelzelle sind Ca²⁺-Ionen, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)^{39,41,42}. Eine schematische Übersicht der Hauptsignalwege in einer kinozilientragenden Trachealepithelzelle ist in Abbildung 3 und 4 dargestellt.

Purinerge P₂Y₂-Rezeptoren^{43,44}, serotoninerge 5HT-Rezeptoren⁴⁵, muskarinerge Acetylcholinrezeptoren⁴⁶ und adrenerge β₂-Rezeptoren⁴⁷ sind G-Proteingekoppelte Rezeptoren der Zellmembran einer Trachealepithelzelle, welche zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt. Diese spaltet Phosphatidyl-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃

bindet an den IP₃-Rezeptor der Membran des Endoplasmatischen Retikulum (ER), welcher durch seine Aktivierung eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt^{18,48}. Somit kann die Ziliertätigkeit des Flimmerepithels auch über Stimulation der Serotonin-Rezeptoren, P₂Y₂-Rezeptoren, β-Adreno-Rezeptoren oder intrazellulär durch die lösliche Guanylatzyklase (sGC) gesteigert werden. Acetylcholin, Noradrenalin und ATP wirken hier als Mediatoren des autonomen Nervensystems, während Serotonin, Acetylcholin und Adrenalin als Mediatoren der humoralen Informationsübertragung dienen.

Eine Calciumfreisetzung aus dem ER wird neben dem ubiquitär vorkommenden IP₃-Rezeptor auch durch die Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors (RyR) ermöglicht, ein höchst leitfähiger Calciumkanal der ER-Membran⁴⁹. Ursprünglich angenommen, dieser komme ausschließlich in Herz- und Skelettmuskulatur vor, konnten nun einige Studien auch ein Vorkommen des RyR in Ösophagus, Magen, Darm, Niere, Pankreas, Thymus, Gehirn, Hoden, Nebenniere, Ovar und in der Lunge^{50,51} aufzeigen. Neben der namensgebenden Eigenschaft, mit einer hohen Affinität das pflanzliche Alkaloid Ryanodin zu binden, ist die Funktion des RyR von zahlreichen Mediatoren beeinflussbar. Exogene Effektoren sind Ryanodin, welches niedrigdosierte den RyR aktiviert und diesen ab Konzentrationen über 100 µM inhibiert, und Coffein, welches zur Öffnung des RyR führt⁵². Das wichtigste endogene Effektormolekül ist Calcium selbst. Zytosolische Konzentrationen im Mikromolarbereich aktivieren den RyR, höhere Konzentrationen im Millimolarbereich inhibieren ihn. Auch Magnesium und ATP sind maßgebend an der Regulation des RyR beteiligt. Weitere Modulatoren des RyR sind Calmodulin, Wasserstoffprotonen, Gluthation, NADPH, Reaktive Sauerstoffradikale (ROS), als auch Kinasen und Phosphatasen, welche durch Phosphorylierung des RyR Einfluss auf dessen Funktion nehmen können.

Erfolgt eine Calciumfreisetzung aus dem ER, werden die sinkenden Calciumspiegel im ER durch den intraluminalen Calciumsensor STIM1 (stromal interaction molecule 1) detektiert⁵³. STIM1 kann durch Translokation zu plasmamembrannahen ER-Abschnitten gelangen, um dort seinen zellmembranständigen Partner ORAI1 (calcium release-activated calcium channel molecule 1) zu aktivieren. ORAI1 ist ein Calciumkanal, welcher bei Stimulation öffnet und

für Calciumionen durchlässig wird, um folglich die intrazellulären Calciumvorräte wieder aufzufüllen. Dieser Mechanismus wird auch calciumvermittelter Calcium-einstrom (I_{CRAC}) oder „store-operated calcium entry“ (SOCE) genannt^{54,55}.

Physikalische Umgebungssignale vermittelt der TRPV4-Kanal (Transient receptor potential vanilloid channel subfamily V member 4) an der Zellmembran, welcher durch Konformationsänderung aufgrund Veränderungen des pH-Wertes, der Temperatur, der Viskosität des Mukus sowie durch mechanische Stimulation durchlässig für Kationen wird, was ebenfalls einen Calciuminflux bewirkt⁵⁶⁻⁵⁸.

Das im Zytosol befindliche Ca^{2+} initiiert nun als „second messenger“ die Aktivierung weiterer verschiedener Signalwege. Ein wichtiger Signalweg führt über die calciumsensitive, lösliche Adenylatcyclase (sAC), welche durch Bindung von Ca^{2+} aktiviert wird und daraufhin cAMP synthetisiert. Durch Bindung von cAMP an der Proteinkinase A (PKA) können reaktive Untereinheiten der PKA unter Spaltung von ATP die Dyneinköpfchen an den Mikrotubuli phosphorylieren, was zu einer gesteigerten Interaktionsrate von Dynein und Mikrotubuli führt und in einer Erhöhung der CBF mündet³⁸. Einen weiteren Signalweg stellt die Komplexbildung von Ca^{2+} mit Calmodulin dar⁵⁹. Nach Bindung von Calcium erfolgt eine Konformationsänderung von Calmodulin in eine aktive Form, welche die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) anregt. NO aktiviert seinerseits die lösliche Guanylatzyklase (sGC), welche cGMP bildet⁶⁰. Aktiviert durch cGMP phosphoryliert die Proteinkinase G (PKG) unter Spaltung von ATP die Dyneinköpfchen am ziliären Axon, was ebenfalls zu einer Steigerung der CBF führt. Zusätzlich ist Ca^{2+} in der Lage durch Bindung an einer aktiven Untereinheit von Dynein die CBF direkt zu beeinflussen^{36,61}.

Neben der Stimulation der Zilientätigkeit besitzt Ca^{2+} ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Vermittlung weiterer Zellsignale wie der Apoptose⁶², der Genexpression^{63,64}, der Exozytose⁶⁵, sowie bei anderen Zellarten die Koordination von Sekretion, Muskelkontraktion, Plastizität der Synapsen und zahlreiche weitere spezifische Zellfunktionen⁶⁶⁻⁷².

Als intrazellulärer Calciumspeicher dient in erster Stelle das ER, welches durch seine membranständigen Ca^{2+} -Rezeptoren wie den IP_3R und den RyR zur Calciumfreisetzung und konsekutiver Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration beiträgt^{73,74}. Mitochondrien werden bei erhöhten

intrazellulären Calciumkonzentrationen $> 400 \text{ nM}$ zusätzlich als Calciumspeicher genutzt^{75–77}, indem sie über den Ca^{2+} -Uniporter entlang des elektrochemischen Gradienten Ca^{2+} -Ionen in die Matrix transportieren und das gespeicherte Ca^{2+} nach Normalisierung der zytosolischen Calciumkonzentration wieder langsam freisetzen^{66,78–81}. ER und Mitochondrien stehen in engem Kontakt zueinander und kommunizieren über Mitochondrium-assoziierte Membranen (MAMs), welche als dynamische Plattformen angesehen werden können^{82,83}.

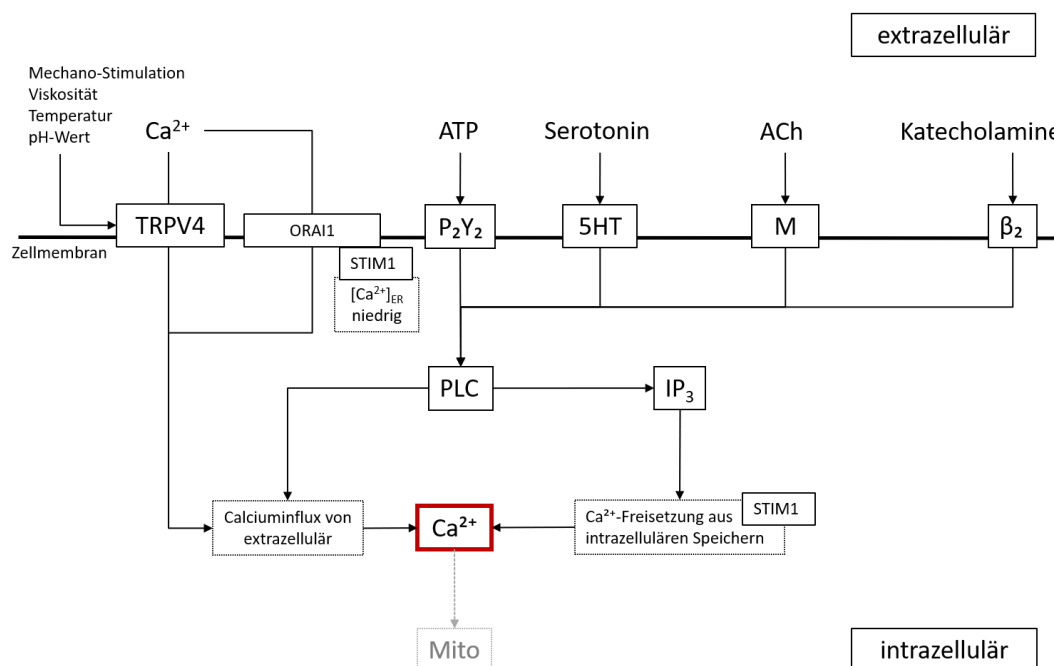


Abbildung 3: Ausschnitt der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden, die über membrangebundene Rezeptoren aktiviert werden. Dargestellt im oberen Bildabschnitt sind die an der Zellmembran lokalisierten adrenergen β_2 -Rezeptoren, muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren (M_3), serotonergen 5-HT-Rezeptoren, purinergen P_2Y_2 -Rezeptoren und die Ca^{2+} Kanäle ORA11 und TRPV4. Die Signaltransduktionskaskaden führen zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Mitochondrien puffern bei stark erhöhter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Calciumionen und nehmen somit an der Regulation der intrazellulären Calciumhomöostase teil. Die sinkende $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ wird durch STIM1 detektiert und führt durch Translokation von STIM1 zur Aktivierung des Calciumkanals ORA11 der Zellmembran. Detaillierte Erklärung der Signalwege siehe Text. Die Pfeile markieren die Aktivierungskaskaden. Abkürzungen: Ca^{2+} = Calcium, TRPV4 = transient receptor potential vanilloid 4 cation channel, ORA11 = Calcium release-activated calcium channel protein 1, P_2Y_2 = G-Protein-gekoppelter purinerges Rezeptor, 5HT = Serotonin-Rezeptor, ACh = Acetylcholin, M = muskarinerges Rezeptor, β_2 = β_2 -Rezeptor, STIM1 = Stromal interaction molecule 1, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ = Calciumkonzentration im Endoplasmatischen Retikulum, PLC = Phospholipase C, IP₃ = Inositol 1,4,5-triphosphat, Mito = Mitochondrium

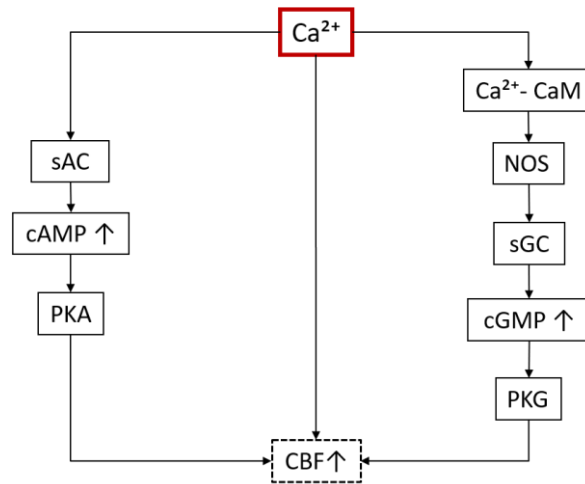


Abbildung 4: Ausschnitt der wichtigsten durch Ca^{2+} aktivierten, intrazellulären Signalkaskaden zur Aktivierung der CBF. Ca^{2+} aktiviert komplexbildend mit CaM die NOS (eNOS > nNOS > iNOS⁸⁴), was letztlich zur Aktivierung der PKG führt, welche die Dyneinköpfchen am Mikrotubuli phosphoryliert (rechter Pfad). Weiterhin aktiviert Ca^{2+} die sAC, welche durch Bildung von cAMP die PKA aktiviert. Die PKA phosphoryliert ebenfalls die Dyneinköpfchen der Mikrotubuli, was eine Stimulation der CBF zur Folge hat (linker Pfad). Zudem kann Ca^{2+} direkt am Kinozilium binden und unmittelbar zur CBF-Stimulation führen (mittlerer Pfad). Die Pfeile markieren die Aktivierungskaskaden. Abkürzungen: Ca^{2+} = Calcium, sAC = lösliche Guanylatzyklase, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, PKA = Proteinkinase A, Ca^{2+} -CaM = Calcium-Calmodulin-Komplex, NOS = Stickstoffmonoxidsynthase, eNOS = endotheliale NO-Synthase, nNOS= neuronale NO-Synthase, iNOS = induzierbare NO-Synthase, sGC = lösliche Guanylatzyklase, cGMP = zyklisches Guanosenmonophosphat, PKG = Proteinkinase G, CBF = Zilienschlagfrequenz.

1.2 Echinocandine: neue Antimykotika

Die drei Echinocandine Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin stellen die neueste Generation von Antimykotika dar. Seit der Erstzulassung im Jahre 2005 für Caspofungin und 2006 für Micafungin und Anidulafungin haben sich die Echinocandine zur Erstlinientherapie für invasive Mykosen etabliert. Durch die Eigenschaft der hohen Spezifität zur Pilzzellwand, diese und nicht die Zellwand von Säugetieren zu schädigen, sind weniger Nebenwirkungen zu beobachten als bei Azol-Antimykotika oder Amphotericin B⁸⁵.

1.2.1 Pharmakodynamik der Echinocandine

Die Pilzzellwand besteht zu 30-60 % aus β -(1,3)-D-Glucan, welches enzymatisch von der β -(1,3)-D-Glucansynthase polymerisiert wird⁸⁶. Echinocandine sind semisynthetische, hydrophile Lipopeptide und nicht-kompetitive Bindungspartner der pilzwandständigen β -(1,3)-D-Glucansynthase. So wird die Synthese von β -(1,3)-D-Glucan verhindert und die Pilzzellwand wird angegriffen. Durch den hohen β -(1,3)-D-Glucan-Gehalt bei *Candida* spp. wird die Zellwand so durchlässig, dass der erhöhte osmotische Druck intrazellulär zur Lyse der Pilzzelle führt. Somit ist die Wirkung in *Candida* spp. fungizid. Da bei *Aspergillus* spp. der β -(1,3)-D-Glucan-Gehalt der Pilzzellwand niedriger ist, verändert sich die Pilzzelle durch die Zellwandschädigung lediglich morphologisch, wird jedoch nicht lysiert. Deshalb wirken Echinocandine hier fungistatisch, da das Wachstum der Hyphen durch die veränderte Hyphenform stagniert¹⁵.

1.2.2 Einsatzspektrum im klinischen Alltag bei Erwachsenen

Caspofungin wirkt exzellent fungizid gegen diverse *Candida* spp. und fungistatisch gegen *Aspergillus* spp., deshalb wird Caspofungin bei invasiven Candidämien, invasiven Aspergillosen, Ösophagus candidosen und bei febriler Neutropenie eingesetzt⁸⁷. Bei Caspofungin bedarf es einer Initialdosis von 70 mg und einer anschließenden Erhaltungsdosis von 50 mg. Micafungin hat sich besonders zur Prophylaxe von Pilzinfektionen bei Patienten nach Stammzelltransplantation bewährt. Dies erfolgt in einer Dosis von 50 mg.

Ösophagus Candidosen werden mit 100 mg und invasive Candidämien mit 150 mg Micafungin behandelt. Anidulafungin wird bisher nur bei Patienten mit invasiven Candidämien und Ösophagus Candidosen verabreicht. Die Therapie erfolgt durch eine Initialgabe von 200 mg und einer Erhaltungsdosis von 100 mg. Die Dosisangaben beziehen sich auf adulte Patienten. Die Therapie sollte je nach Pilzkrankung mindestens 14 Tage dauern und richtet sich nach dem letzten positiven Pilznachweis¹⁵.

1.2.3 Pharmakokinetische Eigenschaften der Echinocandine

Die Minimale Inhibitorische Konzentration (MIC) beschreibt die Dosis, welche zur 50-, 80- oder 90-%igen Reduktion der Pilzlast benötigt wird. Die MIC₉₀ der Echinocandine für verschiedene *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. sind sehr ähnlich und variieren zwischen 0,008 und 4 µg/ml^{88,89}. Für die meisten *Candida* spp. liegt die MIC deutlich unter 2 µg/ml. Bei *Candida parapsilosis* und *Candida guilliermondii* liegt sie jedoch bei 1-4 µg/ml⁸⁹.

Invasiv appliziert verteilen sich die Echinocandine schnell in den Organen, insbesondere in der Leber. Aufgrund der hohen Bindung an Proteine können nach invasiver Gabe der Echinocandine die Plasmakonzentration und die Konzentration in den unterschiedlichen Organen stark variieren. In Gewebeproben von Ratten konnten die höchsten Konzentrationen von Caspofungin zwischen 5-9 µg/g in Leber, Niere, Lunge und Milz festgestellt werden⁹⁰. Die durchschnittliche maximale Plasmakonzentration (C_{MAX}) liegt bei Caspofungin durchschnittlich bei 2-10 µg/ml, bei Micafungin bei 18-22 µg/ml und bei Anidulafungin bei 7 µg/ml. Die Plasmakonzentration ist stark vom Körpergewicht, vom Serum-Albumin-Spiegel und von der Schwere der Erkrankung abhängig^{7,12,91,92}.

Caspofungin zeigte in weiteren Untersuchungen einen Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System¹⁴, wobei hier der Wirkung auf das Herz und auf die Herzmuskelzelle eine besondere Bedeutung zukommt¹¹⁻¹³. Die Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors durch Caspofungin könnte auch die Zellfunktionen anderer Gewebe und Organe modulieren^{93,94}, was zu einer genaueren Untersuchung von Caspofungin anregt.

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die mukoziliäre Clearance beschreibt den koordinierten Transport von Fremdmaterial durch den Zilienschlag des Trachealepithels in Richtung Larynx und stellt einen essentiellen Abwehrmechanismus gegen Kontamination durch Fremdstoffe und Krankheitserreger der unteren Atemwege dar. Dieser sensible Mechanismus kann durch viele exo- und endogene Einflussfaktoren verändert oder gestört werden. Veränderungen der Temperatur⁹⁵, des pH-Wertes¹⁸, der Rheologie des Mukus⁹⁶ und auch die Ausschüttung humoraler oder neuronaler Botenstoffe unter Einbeziehung zellulärer „second messenger“^{42,97} können die Aktivität des Flimmerepithels beeinflussen. So ist im Rahmen der Intensivmedizin die Funktion dieser angeborenen Immunabwehr von besonderer Bedeutung und ist gerade bei diesen kritisch Kranken zahlreichen Einflussfaktoren ausgesetzt. Da der Einsatz von Echinocandinen eine neue und immer häufiger eingesetzte Behandlungsstrategie in der Intensivmedizin darstellt und bereits Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem festgestellt wurden¹¹⁻¹⁴, wurde nun der Fokus auf die Auswirkungen von Echinocandinen auf das respiratorische Flimmerepithel gerichtet.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von Echinocandinen auf die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) des intakten trachealen Flimmerepithels der Maus und auf die Calciumhomöostase in isolierten humanen Trachealepithelzellen. Folgende Fragestellungen werden bearbeitet:

1. Haben Echinocandine Auswirkungen auf die PTG des respiratorischen Flimmerepithels und auf die Zellfunktion von Trachealepithelzellen?
2. Verändern Echinocandine intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden der Kinozilien-tragenden Trachealepithelzellen?
3. Beeinflussen Echinocandine die Calciumhomöostase in humanen Trachealepithelzellen?
4. Verändern Echinocandine spezifische Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktionskaskaden in humanen Trachealepithelzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Messung der PTG

Zur Vorbereitung der Messung der PTG erfolgte stets die Bereitstellung des Zellpuffers, der zu applizierenden Agenzien und des Kulturschälchens sowie die korrekte Einstellung des Mikroskops und der Computersoftware. Der Versuch startete mit der Präparation der murinen Trachea. Im Folgenden werden die verschiedenen Schritte des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung zur Messung der PTG beschrieben.

2.1.1 Präparation der murinen Trachea

Für alle Versuche wurden männliche C57Bl/6N-Mäuse vom Wildtyp mit einem Gewicht von 18–20 g und im durchschnittlichen Alter von 15-18 Wochen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, DE) verwendet. Die Durchführung von Versuchen an entnommenen Organen von Wirbeltieren nach §6 Abs. 1 Nr. 4 TierschG wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und unter dem Geschäftszeichen V 54 – 19 c 20 15 h 02 GI20/26 Nr. A 26/2013 geführt.

Die Tötung der Mäuse zu Beginn jedes individuellen Versuchs erfolgte mittels Überdosis Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, DE) durch zweiminütige Inhalation eines 5-7 %igen Gasgemisches in einem Inkubator. Daraufhin wurde die Maus auf einem Präpariertisch in Rückenlage fixiert. Unmittelbar nach Eröffnung des Bauchraumes wurde durch einen Schnitt die Aorta abdominalis durchtrennt. Dieser Schritt wurde als Beginn des Messprotokolls mit dem Messzeitpunkt $t = 0$ festgelegt.

Nach Beseitigung der Haut und Entfernung der Schilddrüse wurde das Diaphragma von den Rippen abgesetzt, sodass sich durch die Eröffnung des Pleuraspalts beide Lungenflügel von der Pleura parietalis lösten. So konnten lateral auf beiden Seiten die Rippen und die Claviculae durchtrennt und anschließend der ventrale Brustkorb samt Thymus abgesetzt werden. Es präsentierten sich nun beide Lungenflügel und das Mediastinum. Kranial des Herzens stellte sich die Trachea dar, welche nun mit einer 85 mm Vannas

Federschere (F.S.T., Heidelberg, DE) von den umgebenden Strukturen wie der infrahyoidalen Muskulatur, den Gefäß- und Nervenstraßen sowie vom Ösophagus freipräpariert wurde. Anschließend konnte die Trachea unterhalb des Schildknorpels und oberhalb der Bifurkation abgetrennt werden ($t = 12$ min).

Die isolierte Trachea wurde nun umgehend in ein silikonbeschichtetes (SYLGARD® 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning GmbH, Wiesbaden, DE, Herstellung siehe unten), beheizbares Delta-T-Kulturschälchen (Bioptechs, Butler, PA, USA) überführt, wobei die dorsale Wand der Trachea (Pariet membranaceus) mit dem Musculus trachealis nach oben zeigte. In dieser Position wurde die Trachea nun mit Minutien (Ento Sphinx, stainless steel No.15, Pardubice, CZ) in ihrer physiologischen Ausgangslänge mittig im Schälchen fixiert und mit HEPES-Puffer mit pH-Wert 7,4 bei einer Temperatur von 30 °C einmalig vorsichtig gespült und mit frischem HEPES-Puffer (30 °C) bedeckt. Bei der anschließenden Feinpräparation wurde die Trachea nun unter einem Auflichtmikroskop (Zeiss, Jena, DE) mit der Federschere und einer feinen Pinzette (F.S.T., Heidelberg, DE) vom verbleibenden Bindegewebe befreit und entlang des Musculus trachealis der Länge nach aufgeschnitten. Durch die elastische Rückstellkraft der Knorpelspannen eröffnete sich die Trachea an der Schnittstelle und nahm die Form einer Halbröhre an, sodass man nun einen direkten Blick auf das Zilien tragende Epithel der Trachea hatte. Der HEPES-Puffer wurde nach Abschluss der Feinpräparation nochmals vorsichtig ausgetauscht. Nun wurden 2 ml HEPES-Puffer der Temperatur von 30 °C zugefügt und das Kulturschälchen in die Messeinheit des Lichtmikroskops (BX51WI, Olympus, Tokio, JPN) eingespannt. Dieser Handlungsschritt sollte bis $t = 25$ min erfolgt sein, um eine Ruhephase ohne Manipulation am Trachealepithel bis zum ersten Messzeitpunkt in der 30. Minute zu gewährleisten. Die Fortführung der konstanten Temperatur von 30 °C im Organbad ermöglichte die in der Messeinheit integrierte Heizeinheit (Bioptechs Delta T, Butler, Pennsylvania, USA).

Zur Visualisierung der PTG wurden anschließend 3 μ l Polymerpartikel (Dynabeads, Life Technologies, Oslo, NO) zu dem HEPES-Puffer im Schälchen appliziert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Diese künstlich hergestellten Partikel eignen sich durch ihre einheitliche Form mit einem

Durchmesser von 2,5 μm den Partikeltransport zu untersuchen. Es wurde das Objektiv mit 20-facher Vergrößerung (20x/0,5 LUMPlanF1, Olympus, Tokio, JPN) gewählt, ein Trachealabschnitt in der Mitte der entnommenen Trachea zwischen zwei Knorpelspangen eingestellt und die Partikel unmittelbar über dem zilien-tragenden Epithel fokussiert. Der gewählte Trachealabschnitt sollte keine defekten Areale aufweisen und die Partikel sollten einheitlich über das Epithel transportiert werden. Das ausgewählte Areal wurde im Versuch nicht mehr verändert. Nun erfolgte eine kurze Ruhephase von mindestens 4 Minuten bis zum Start der Messung ($t = 30 \text{ min}$). Eine Minute vor jeder Messung wurden die Partikel mit der Pipette vorsichtig aufgewirbelt, um ein Absetzen und Verklumpen zu verhindern. Um das Verdunsten des Puffers während der Versuchszeit zu minimieren, wurde eine an das Mikroskop angepasste Schutzkammer um die Messeinheit angebracht. In der folgenden Abbildung 5 ist die aufgeschnittene Trachea in der beschriebenen Halbröhrenform, mittig im beheizbaren Kulturschälchen fixiert, zu erkennen. So konnte man anschließend das Objektiv in das Medium eintauchen und die Flimmerepithelzellen fokussieren.

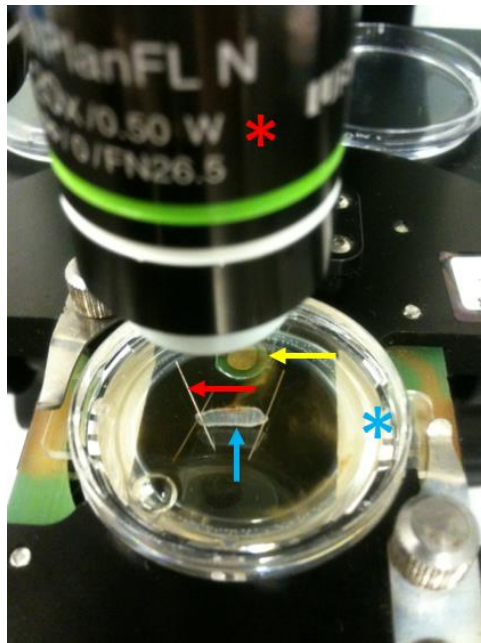


Abbildung 5: Die isolierte Trachea (blauer Pfeil) ist mit Minutien (roter Pfeil) in der aufgeschnittenen Halbröhrenform im silikonbeschichteten Delta-T-Kulturschälchen in der Messeinheit fixiert (blauer Stern). Das Objektiv des Mikroskops (roter Stern) ist zur besseren Übersicht in diesem Bild noch nicht endgültig über der Trachea im Puffer positioniert. Die Heizelektrode (gelber Pfeil) hält die Temperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ im Schälchen während der gesamten Versuchszeit konstant.

2.1.2 HEPES-Puffer

Die Herstellung des HEPES-Puffers erfolgte mit den in Tabelle 1 aufgelisteten Agenzien. Nach sorgfältigem Einwiegen der Chemikalien und Lösung in 1000 ml bidestilliertem Wasser wurde der Puffer durch Titration einer 1-molaren Natriumhydroxid-Lösung bei 30 °C auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Bei Experimenten in calciumfreiem Milieu wurde im HEPES-Puffer auf die Zugabe von Calciumchlorid verzichtet und 1 mM des Chelators EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure, Roth, Karlsruhe, DE) zugesetzt, um kleinste Spuren von Calcium zu entfernen.

Tabelle 1: Agenzien zur Herstellung des Zellpuffers für die Messung der PTG von murinen Tracheen. Alle Produkte von Roth, Karlsruhe, DE.

Reagenz	Stoffmenge
KCl	5,9 mM
NaCl	136,4 mM
Glucose	11 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 mM
CaCl ₂	2,2 mM
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	10 mM

2.1.3 Beschichtung des Kulturschälchens

Um die Trachea in der Messeinheit mit Minutien fixieren zu können, wurde das beheizbare Delta-T-Kulturschälchen (Bioptechs, Butler, PA, USA) mit 1,5 ml Silikonelastomer (SYLGARD® 184, Dow Corning GmbH, Wiesbaden, DE) beschichtet. Dazu wurden 9 Teile des Silikonelastomers und ein Teil des Härtungsmittels in einem Becherglas, ausgestattet mit einem Rührfisch, eingewogen. Nun wurde die Lösung auf einer Rührplatte zwei Stunden vorsichtig gemischt und die entstandenen Luftblasen anschließend in einem Desiccator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durch ein Vakuum herausgesogen. Anschließend wurden jeweils 1,5 ml des klaren, zähflüssigen Silikongels in die Delta-T-Kulturschalen pipettiert. Einzelne durch das Pipettieren entstandene Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze manuell entfernt. Bei 60 °C im Wärmeschrank konnte die Beschichtung im Kulturschälchen über Nacht polymerisieren. Durch die veränderte Bodendicke des beheizbaren

Kulturschälchens musste die Temperatur des Heizsystems in der Messeinheit adjustiert werden. Dies gelang durch ein externes digitales Thermometer (Dostmann electronic GmbH, Wertheim, DE), welches in der Mitte des mit 2 ml HEPES-Puffer befüllten Schälchens eingespannt in der Messeinheit des Mikroskops, angebracht wurde. Der Thermostat der Heizeinheit des Mikroskops wurde so lange reguliert, bis das externe Thermometer in der Mitte des Schälchens 30 °C anzeigte und diese Temperatur auch eine Minute nach dem Mischen des Puffers zum eigentlichen Messzeitpunkt aufrechterhalten wurde. Die eingestellte Temperatur wurde am Thermostat abgelesen und am Außenrand des Schälchens mit einem Permanentmarker vermerkt. Diese Temperatur wurde nun stets bei der Verwendung dieses Delta-T-Kulturschälchens am Thermostat eingestellt.

2.1.4 Aufbau des Mikroskops

Für die Messung der PTG diente ein Olympus BX51WI Lichtmikroskop (Olympus, Tokio, JPN) und ein LUMPlanF1 Hellfeld-Transmissionsobjektiv 20x/0,50 (Olympus, Tokio, JPN). Die im Mikroskop integrierte Streampix 4 Single Kamera (Norpix Inc., Quebec, CA) war mit einem Computer verbunden und filmte im Strahlengang des Objektivs zu definierten Messzeitpunkten während der Beobachtungsphase des Versuchs das Flimmerepithel. So konnten die angefertigten Videosequenzen von jeweils 16,726 s Dauer in die Videoauswertungssoftware Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, USA) übertragen und im Anschluss *offline* ausgewertet werden.

2.1.5 Versuchsdurchführung

Um eine präzise und valide Untersuchung des Partikeltransports zu gewährleisten, wurden die Zeitpunkte der Versuchsabschnitte streng nach Protokoll eingehalten, welches in Abbildung 6 skizziert ist. Die gesamte Versuchszeit betrug 140 Minuten, der eigentliche Beobachtungszeitraum 110 Minuten, da die Präparation der Trachea und die Vorbereitung des Messstandes 30 Minuten Zeit in Anspruch nahm. Der Startzeitpunkt eines Experiments $t = 0$ wurde mit Beginn der Präparation gesetzt. Nach Beginn der Beobachtungszeit

ab der 30. Minute wurden Filmsequenzen vom Verlauf der Partikel auf dem Flimmerepithel erstellt und zur späteren Auswertung der PTG auf dem Computer gespeichert. So wurden in der Ruhephase von Minute 30 bis Minute 60 in fünfminütigem Abstand und in der Versuchsphase ab Minute 60 bis Minute 132 in dreiminütigem Abstand Videoaufnahmen angefertigt. Am Versuchsende nach Minute 132 erfolgte eine ATP-Stimulation (100 μ M, Sigma Aldrich, Hilden, DE), die der Vitalitätsprüfung diente. Es wurden alle Experimente zur Auswertung eingeschlossen, welche nach ATP-Gabe ($t = 132-140$ min) einen Anstieg der PTG über 50% der normierten PTG ($t = 60$ min) zeigten. In dieser letzten Phase von Minute 132 bis 140 wurden alle zwei Minuten Videoaufnahmen erstellt.

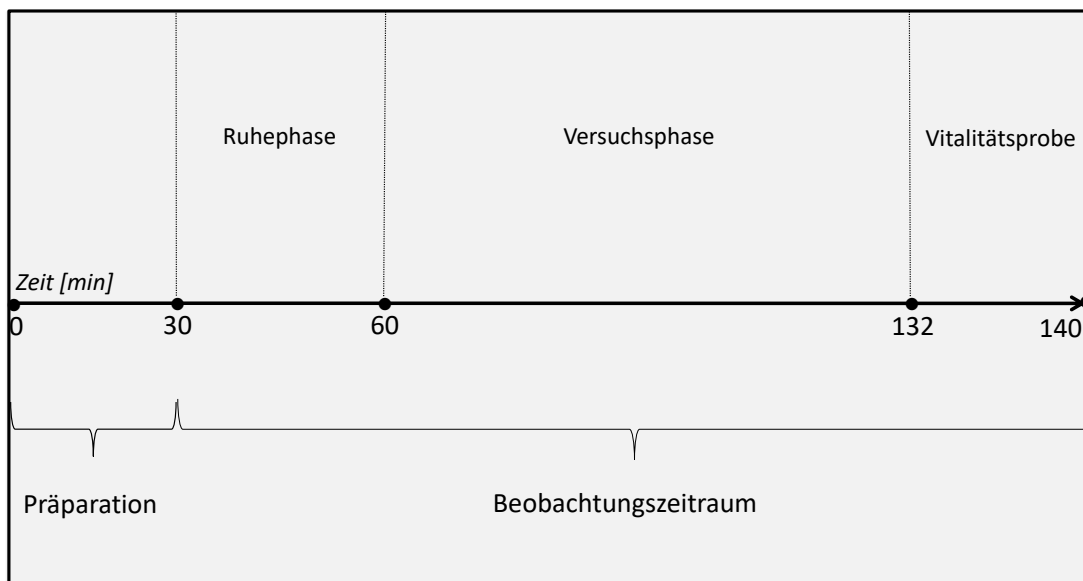


Abbildung 6: Schematischer Versuchsablauf: Die gesamte Versuchszeit betrug 140 min: 30 min Präparation der Trachea, 30 min Ruhephase unter dem Mikroskop, 72 min Versuchsphase und 8 min Vitalitätsprobe durch 100 μ M ATP. Die gestrichelten vertikalen Linien kennzeichnen die bedeutenden Zeitpunkte. Der Pfeil stellt die Zeitachse des gesamten Versuchs von 0 bis 140 Minuten dar. Die Klammern markieren die Präparationsphase und den Beobachtungszeitraum.

Die Echinocandine Caspofungin (Cancidas[®], Merck, New Jersey, USA), Micafungin (Mycamine[®], Astellas Pharma, Leiden, NL) und Anidulafungin

(Ecalta[®], Pfizer Limited, Sandwich, UK) wurden zunächst nach der Videoaufnahme in der 60. Minute hinzugegeben. Sollte ein weiteres Agens, zum Beispiel zur Inhibition von Signalwegen, appliziert werden, erfolgte dies in der 60. Minute. Das Echinocandin wurde dann in der 90. Minute nach 30-minütiger Inkubationszeit des Agens appliziert.

So wurden die Proteinkinase A (PKA) durch H-89 (10 μ M), die 5-HT₂-Rezeptoren durch Cyproheptadin (14 μ M) und Methysergide (100 μ M), 5-HT₃-Rezeptoren durch WAY-100635 (10 μ M), die sGC durch ODQ (10 μ M), die β -Adreno-Rezeptoren durch ICI 118,551 (100 μ M) und die muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren durch Atropin (1 μ M, 10 μ M) inhibiert (alle Reagenzien von Sigma Aldrich, Hilden, DE) und anschließend der Konzentration von 50 μ g/ml Caspofungin ausgesetzt.

Bei den Untersuchungen im calciumfreien Milieu wurden dem calciumfreien HEPES-Puffer 1 mM EGTA (Sigma Aldrich, Hilden, DE) als extrazellulärer Calciumchelator zugegeben. BAPTA-AM (100 μ M, Sigma Aldrich, Hilden, DE) wurde dann zugefügt, wenn auch intrazellulär das Calcium gepuffert werden sollte. Zur Entleerung coffeinsensitiver Calciumspeicher wurde zusätzlich 30 mM Coffein (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) appliziert. Alle genannten Agenzien wurden bei diesen Versuchen in calciumfreiem Milieu bereits in der 30. Minute hinzugegeben, um eine ausreichend lange Inkubations- als auch Beobachtungszeit zu gewährleisten.

In Kontrollversuchen wurde die basale PTG ohne Applikation von Substanzen aufgezeichnet. Es wurden stattdessen 100 μ l Aqua dest. bei $t = 60$ min hinzu pipettiert und die Vitalitätsprobe durch Zugabe von 100 μ M ATP bei Minute 132 durchgeführt. In den Versuchsgruppen verblieben die applizierten Substanzen während der gesamten Beobachtungszeit im Medium und wurden nicht ausgewaschen. Eine Übersicht der in den Versuchen eingesetzten Pharmaka und Agenzien ist in Tabelle 3 am Ende des Kapitels dargestellt.

2.1.6 Auswertung der Videosequenzen und Datenerhebung

Die Videoaufzeichnungen wurden während des Versuchs auf dem Computer gespeichert und im Anschluss *offline* mit der Software Image Pro Plus 7.0

ausgewertet. Zunächst wurde das angefertigte Video eines Messzeitpunktes (200 Bilder in 16,726 s) aufgerufen und von einer 12 Bit in eine 8 Bit Graustufe umgewandelt. Daraufhin wurde ein Durchschnittsbild des Hintergrundes der gesamten Videosequenz erstellt. Dieses Durchschnittsbild wurde von jeder einzelnen Bildsequenz subtrahiert, sodass die Partikel hervorgehoben in einem binären Bild dargestellt werden konnten. Nach Markierung der Partikel in Rot wurde deren Bewegungsbahn ermittelt und mit der Formel $v = d / (t_2 - t_1)$ die PTG errechnet. Pro Aufnahme wurde die Geschwindigkeit von mindestens 60 Partikeln berechnet. Es wurden nur Partikel mit einer lateralen Abweichung unter 15 % in die Berechnung eingeschlossen. Die beschriebenen Bearbeitungsschritte wurden in folgender Abbildung 7 visualisiert.

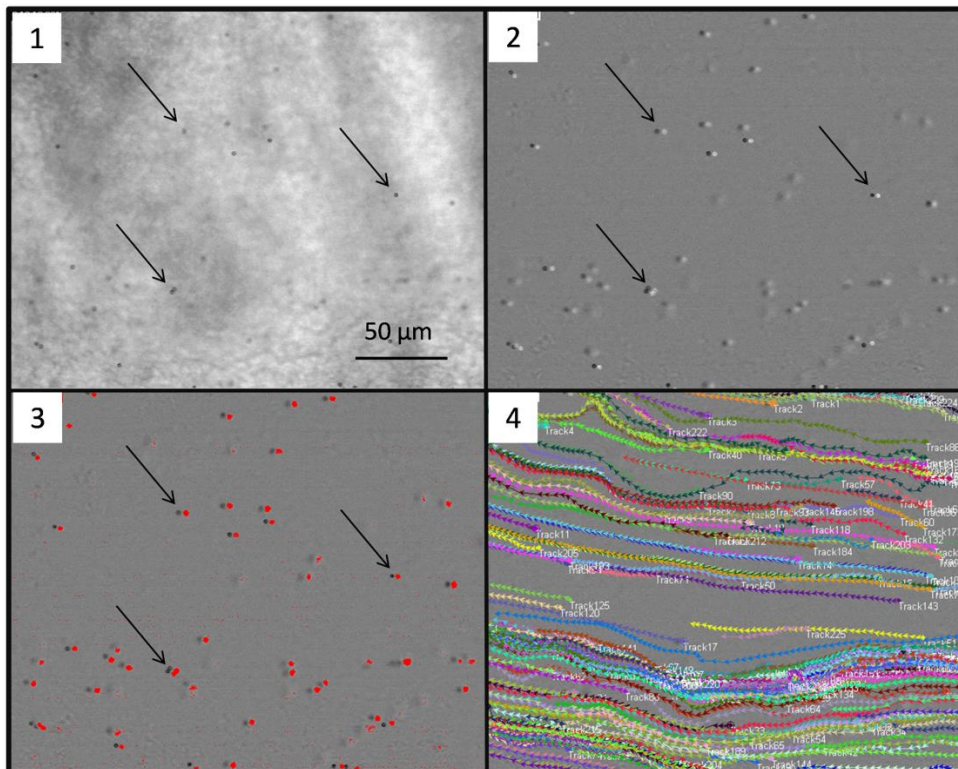


Abbildung 7: Schrittweise Auswertung der PTG 1) Unbearbeitete Originalaufnahme des Flimmerepithels zwischen zwei Trachealspangen (nicht im Bild) unter 20-facher Vergrößerung 2) Bildaufnahme nach Einstellen der Graustufe von 12-bit auf 8-bit und Errechnen der Kontrastunterschiede. 3) Hervorheben der Partikel durch Anfärbung in Rot 4) Errechnete Bewegungsbahn der Partikel eines Videos (200 Bilder in 16,726 s). Pro Aufnahme wurde die Geschwindigkeit von mindestens 60 Partikel berechnet.

2.2 Intrazelluläre Calciummessung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration erforderte die Kultivierung von humanen Trachealepithelzellen (HTE-Zellen), die Bereitstellung von Zellpuffer und den verschiedenen Agenzien, die Inkubation der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM und die korrekte Einstellung des Fluoreszenzmikroskops und der Computersoftware. In den folgenden Abschnitten werden Aufbau und Ablauf der Versuche zum Calciumimaging sowie deren Auswertung detailliert erläutert.

2.2.1 Kultivierung der isolierten HTE-Zellen

Um die Calciumhomöostase in den einzelnen Zellen beobachten zu können, wurden für die fluoreszenzoptischen Calciummessungen kultivierte Trachealepithelzellen auf mit Laminin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Es wurden humane Trachealepithelzellen der Reihe C-12644 der Firma PromoCell (Heidelberg, DE) verwendet. Geliefert wurde die Zellreihe als Passage 2 (P2). Für die Versuche wurden Passagen 3-6 verwendet.

Die Zellen wurden einmal pro Woche gesplittet unter Verwendung des DetachKits C-41210 inklusive Supplement (Promos, Heidelberg, DE). Es wurden rund 8000 HTE-Zellen in 100 µl Medium auf ein mit Gibco™ Laminin Mouse Protein (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) beschichtetes Deckglas ausgesät und mindestens 2 Stunden im Wärmeschrank inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen auf dem Deckglas zu gewährleisten. Anschließend wurde 1 ml Airway Epithelial Cell Growth Medium (C-21160, PromoCell, Heidelberg, DE) dazugegeben und die Zellen für mindestens 12 Stunden in den Wärmeschrank gestellt, bevor sie für einen Versuch verwendet wurden. Zellen, die länger als 3 Tage auf den Deckgläschen ausplattiert waren, wurden nicht mehr verwendet.

2.2.2 Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Für das Calciumimaging diente ein Epifluoreszenzmikroskop (Olympus, Tokio, JPN), dessen schematischer Aufbau in der Abbildung 8 dargestellt ist. Das Mikroskop war mit einer 75 W Xenon-Lampe zur Erzeugung des Anregungslichtes ausgestattet. Durch den Monochromator (Polychrome V, TILL Photonics GmbH, Graefelfing, DE), ausgestattet mit spezifischem Filter (Multi-Bandpass 340/380 nm \pm 8 nm), wurde das Licht der benötigten Wellenlänge für die Exzitation von Fura-2 AM generiert. Der Strahlengang wurde am dichroischen Strahlteiler (dichroitischer Langpass-Filter 400 nm) durch das Objektiv auf die Zellprobe, welche mit Fura-2-AM (Biotum, Fremont, CA, USA) beladen wurde, gelenkt. Das von Fura-2-AM emittierte Licht der Wellenlänge 510 nm gelangte durch den dichroischen Strahlteiler und den Emissionsfilter (Bandpass 510 nm \pm 20 nm) und konnte anschließend von einer EMCCD-Kamera (SensiCam, PCO, Kelheim, DE) detektiert und am Computer mithilfe der Software TILLvision (TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, DE) digitalisiert und visualisiert werden.

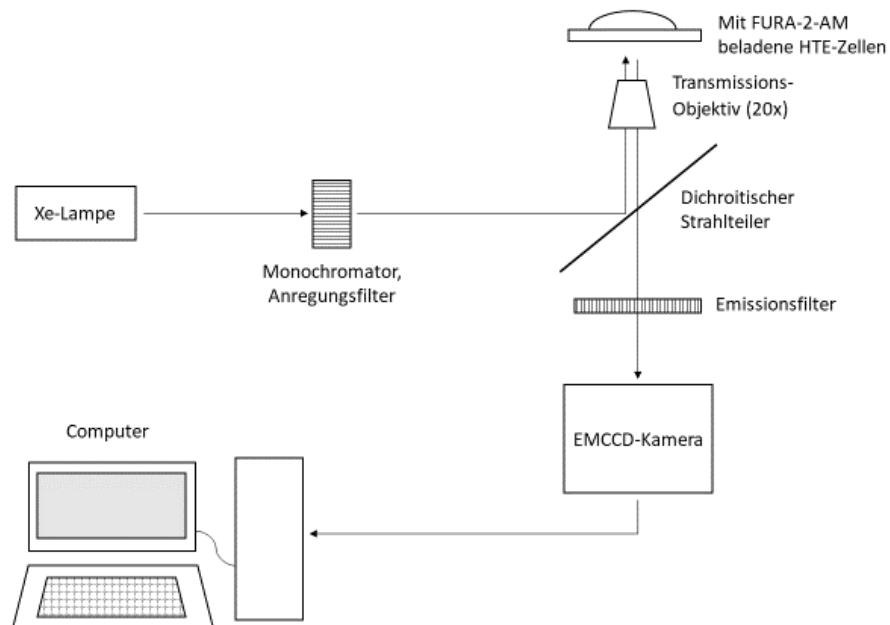


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzmikroskops. Die Pfeile markieren den Strahlengang des Lichts. Ausgangspunkt stellte die Xenon-Lampe (Xe-Lampe) dar, welche zur Erzeugung des Anregungslichts diente. Die zur Anregung benötigten Wellenlängen wurden durch den Monochromator mit spezifischem Anregungsfilter erzeugt und am dichroitischen Strahlteiler auf das Präparat gelenkt. Durch das Transmissionsobjektiv 20-fach vergrößert, passierten die emittierten Strahlen des Präparats den dichroitischen Strahlteiler und den Emissionsfilter und wurden von der EMCCD-Kamera detektiert. Durch die Computersoftware TILLvisION konnte die erzeugte Fluoreszenz letztlich verarbeitet und dargestellt werden.

2.2.3 Versuchsdurchführung der intrazellulären Calciummessung mit Fura-2AM

Für die Beladung der Zellen mit Fura-2 AM wurde eine Konzentration von 2,5 μM verwendet. Das Deckglas mit den kultivierten HTE-Zellen wurde in HEPES-Puffer der Temperatur von 37 °C platziert und 45 min bei ebenfalls 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ein beheizbares Kulturschälchen überführt, in welchem sich 2 ml HEPES-Puffer der Temperatur von 37 °C befand. Sämtliche Lichtquellen im Raum wurden hierbei auf ein Minimum reduziert. Das Deckglas wurde mit einem Metallring aus Edelstahl beschwert und dadurch im Kulturschälchen fixiert. Daraufhin wurde das Kulturschälchen in das Fluoreszenzmikroskop eingespannt. Die Temperatur des Puffers von 37 °C im Kulturschälchen wurde weiterhin durch eine integrierte Heizeinheit (Bioprotech Delta T, Butler, Pennsylvania, USA) im Mikroskop aufrechterhalten. Nun folgte eine Ruhezeit von 10 min, um die Abspaltung der AM-Gruppe von Fura-2 zu gewährleisten. In dieser Zeit wurde das Objektiv (Olympus, Tokio, JPN) mit 20-facher Vergrößerung gewählt und im Puffer eingetaucht, um die Zellen via Okular grob zu fokussieren. Die für die Fokussierung der Zellen benötigte Belichtungszeit wurde so kurz wie möglich gehalten. Anschließend wurde die Fluoreszenzmessung am PC vorbereitet. Der Monochromator und die EMCCD-Kamera wurden eingeschaltet und das Programm TILLVISION wurde aufgerufen. Die fluoreszierenden Zellen wurden nun im Live-Modus auf dem Bildschirm des PCs genau fokussiert. Die Messung startete nach insgesamt 55 Minuten Vorbereitungszeit (45 min Inkubation von Fura-2 AM und 10 min Ruhezeit). Die Fluoreszenz wurde über 1000 Sekunden jede Sekunde gemessen. In Abbildung 9 ist der Versuchsaufbau der Versuchsgruppe von Caspofungin zur Übersicht schematisch dargestellt. Caspofungin wurde regelhaft zur 100. Sekunde in das Kulturschälchen pipettiert. Am Ende eines jeden Versuches erfolgte eine Funktionskontrolle der Zellen durch Applikation von 200 mM Kaliumchlorid (KCl, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE). Dies bewirkte eine Depolarisation der Zellmembran und folglich einen Calciumeinstrom von extrazellulär, wodurch im Falle einer intakten Zellmembran intrazellulär ein Anstieg der Fluoreszenz gemessen wurde. Es wurden somit nur Calciummessungen von Zellen verwendet, die diese Vitalitätsprobe bestanden.

Als Einschlusskriterium galt eine Steigerung der normierten Fluoreszenzratio nach KCl-Gabe um 50%.

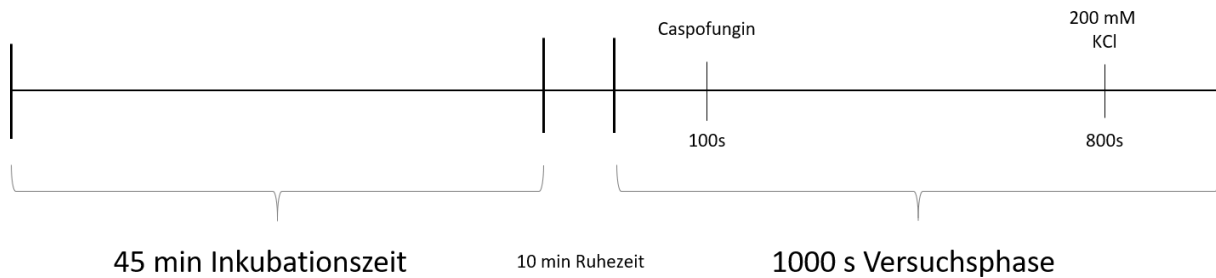


Abbildung 9: Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus. Das Experiment gliedert sich in eine 45-minütige Inkubationszeit, gefolgt von einer 10-minütigen Ruhephase, welcher sich die eigentliche Versuchsphase anschließt, in der die Calciummessungen mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. In dieser Versuchsphase werden bei Sekunde 100 Caspofungin und bei Sekunde 800 Kaliumchlorid appliziert, dargestellt durch die schmalen vertikalen Markierungen.

Als Standard wurde ein Zellpuffer ohne Calcium angesetzt. Sollten die Zellen in calciumhaltigem Puffer beobachtet werden, fügte man dem Puffer 2,5 mM Calciumchlorid hinzu. Bei Versuchen in calciumfreiem Milieu wurde dem Puffer 1 mM EGTA als extrazellulärer Calciumchelator zugefügt. Zur Vitalitätskontrolle in Versuchen mit calciumfreiem Puffer musste der KCl-Lösung, um eine Reaktion der Zellen hervorzurufen, 2,5 mM Calciumchlorid hinzugefügt werden.

Bei Versuchen unter Verwendung von Coffein (30 mM), Nickelchlorid (NiCl_2 , 50 μM , Sigma Aldrich, Hilden, DE) und 2,4-Dinitrophenol (DNP, 25 μM , Sigma Aldrich, Hilden, DE) wurde das betreffende Agens aus einer Stammlösung in der 100. Sekunde und Caspofungin in der 200. Sekunde der Messung hinzu pipettiert.

Ryanodin (40 μM , Tocris Bioscience, Bristol, UK) und 2-APB (40 μM , Tocris Bioscience, Bristol, UK) wurden bereits vor dem Messstart und somit schon während der Beladung mit Fura-2 AM zum Zeitpunkt $t = 35$ min zum Puffer hinzugegeben, da diese beiden Agenzien eine Inkubationszeit von 20 Minuten benötigten. Folglich musste beim zwischenzeitlichen Überführen in das Kulturschälchen darauf geachtet werden, dass Ryanodin und 2-APB weiterhin in entsprechender Konzentration für die Inkubation der Zellen zur Verfügung gestellt wurden. Aufgrund dessen wurde dem HEPES-Puffer im Kulturschälchen ebenfalls 40 μM Ryanodin oder 40 μM 2-APB zugefügt. In folgender Abbildung

10 ist als Beispiel der Versuchsaufbau der Versuchsgruppe von Ryanodin und Caspofungin schematisch dargestellt. Daraufhin fügt sich eine Liste aller Substanzen an, die während den fluoreszenzoptischen Calciummessungen eingesetzt wurden.

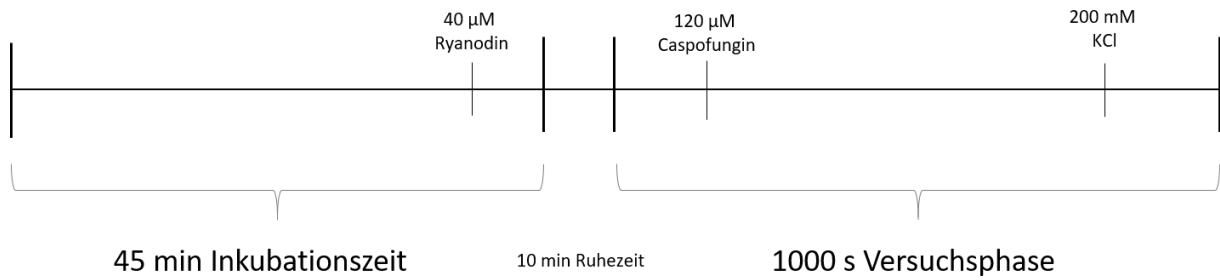


Abbildung 10: Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus unter Einsatz von Ryanodin, dessen Applikation 20 min vor Versuchsstart innerhalb der Inkubationszeit von Fura-2 AM erfolgte. Nach der 10-minütigen Ruhezeit folgte die Versuchsphase von 1000 s. Caspofungin-Applikation bei 100 s nach Versuchsstart, KCl-Applikation 800 s nach Versuchsstart, markiert durch die schmalen vertikalen Linien.

2.2.4 Calciumimaging und Auswertung der FURA-2-Signale

Die mit Fura-2 AM beladenen HTE-Zellen wurden alternierend den Exzitationwellenlängen von 340 nm und 380 nm exponiert. Die Exposition erfolgte 30 ms lang und in einer Frequenz von 1 Hz. Die Emissionswellenlängen von $510 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ wurden durch die Kamera aufgenommen und verarbeitet, während die Integrationszeit der Signale 0,5 ms betrug. Am Computer erfolgte die visuelle Darstellung der Zellen durch die Software TILLVISION. Nach Erstellung der Bildsequenz von 1000 s wurden nun 10 Zellen als „Region of interest“ (ROI) definiert. Es wurden nur morphologisch unauffällige und homogen angefärbte Zellen ausgewählt, da diese Eigenschaften als Zeichen für eine regelrechte Zellfunktion galten (Abb. 11). Die gemessenen Fluoreszenzwerte der $\text{ROI}_{340\text{nm}}$ wurden durch die Werte der $\text{ROI}_{380\text{nm}}$ dividiert und ergaben so das Fluoreszenzverhältnis, im Graphen Fluoreszenzratio genannt. Die Fluoreszenzratio wurde daraufhin bei $t = 0$ auf 100 % normiert und in einem Graphen zur Zeitachse aufgetragen.

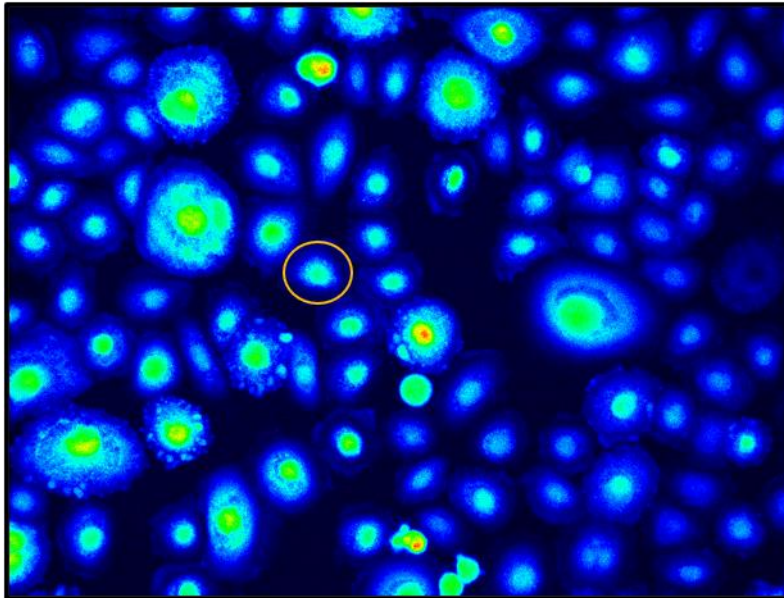


Abbildung 11: Humane Trachealepithelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop im Ruhezustand, angefärbt mit FURA-2 AM und unter Exzitation mit einer Wellenlänge von 380 nm. Der orange Kreis kennzeichnet beispielhaft eine Zelle, welche im Versuch als ROI ausgewählt wurde.

2.2.5 Calciumimaging im ER mittels Mag-Fluo-4-AM

Für Calciummessungen im ER humaner Tracheaepithelzellen (HTEpC-c, C12644, PromoCell, Heidelberg, DE) wurden die Zellen auf mit Laminin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Für die Messung von intraluminalen Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) wurden die Zellen mit dem Calcium-Indikator Mag-Fluo-4 AM ($K_d = 22 \mu\text{M}$, Invitrogen, Paisley, UK) in Dunkelheit bei 37°C für 60 Minuten geladen. Nach dieser Ladeperiode wurden die Zellen für 20 Minuten in HEPES-Puffer gewaschen und direkt anschließend in die Versuchskammer (gefüllt mit 2 ml HEPES, pH 7,4) des Fluoreszenzmikroskops (BX50 WI, Olympus, Hamburg, DE) transferiert, das mit einem 20fach Immersionsobjektiv ausgestattet ist. Die danach durchgeführten Experimente wurden in Ca^{2+} -haltigen und Ca^{2+} -freien HEPES-Pufferlösungen durchgeführt, pH 7,4, letztere enthielten stets 1 mM EGTA (siehe Tabelle 2). Da Mag-Fluo-4 AM ein Indikator mit nur einer Exzitations- und einer Emissionswellenlänge ist, wurden Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ als normalisierte Ratio von F/F_0 dargestellt. Mag-Fluo-4 wurde mit einer Exzitationswellenlänge von 490 nm (± 10 nm) angeregt und die emittierte Fluoreszenz wurde durch einen dichromatischen Kurzpass Filter von 560 nm geleitet und über einen Bandpassfilter von 510 nm registriert. Die weitere Auswertung der Mag-Fluo-4 Fluoreszenz erfolgte analog zu den Messungen mit FURA-2-Signalen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (siehe Abschnitt 2.2.4).

2.2.6 Verwendete Puffersysteme

Die Herstellung des HEPES-Puffers erfolgte mit den in Tabelle 2 aufgelisteten Agenzien. Nach sorgfältigem Einwiegen der Chemikalien und Lösung in 1000 ml bidestilliertem Wasser wurde der Puffer durch Titration einer 1-molaren Natriumhydroxid-Lösung bei 37°C auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Wurden Versuche in calciumfreiem Milieu angestrebt, wurde anstatt 2,5 mM Calciumchlorid 1 mM EGTA verwendet.

Tabelle 2: Reagenzien zur Herstellung des Zellpuffers für die Messung von Calcium in HTE-Zellen. Alle Produkte von Roth, Karlsruhe, DE.

Reagenz	Stoffmenge
NaCl	125 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
EGTA	1 mM
CaCl ₂	2,5 mM
NaOH zur pH-Einstellung	Titration bis pH = 7,4

2.3 Übersicht und Wirkweise der in den Versuchen eingesetzten Agenzien

In der folgenden Tabelle 3 sind alle Agenzien, Lösungsmittel, eingesetzte Konzentrationen und Wirkweisen aufgeführt, welche in den Versuchen zur PTG-Messung als auch in den Versuchen zur fluoreszenzoptischen Calciummessung verwendet wurden. Bei Verwendung von DMSO wurde darauf geachtet, dass eine Menge von 1 mM nicht überschritten wurde um einen Eigeneffekt auf das tracheale Flimmerepithel auszuschließen. Der Eigeneffekt von DMSO wurde in einer anderen Arbeit innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe (Promotion von Claudio Marquardt aus Würzburg 2015 mit dem Titel „Funktionsuntersuchung von Temperatur auf den ziliären Transport in der Trachea von Mäusen“) untersucht. Die Publikation der Daten ist zum aktuellen Zeitpunkt noch ausstehend. Diese Versuche zeigten ab 10 mM DMSO einen PTG-hemmenden Effekt, weshalb hier nur 1/10 dieser Konzentration verwendet wurde, um einen Eigeneffekt auszuschließen.

Tabelle 3: Übersicht der in den Experimenten eingesetzten Agenzien. Das zur Lösung eingesetzte DMSO überschritt die Menge von 2,5 µl nicht, um einen Eigeneffekt auf das tracheale Flimmerepithel auszuschließen. Die weitere Verdünnung nach Lösung in DMSO erfolgte stets mit Aqua dest.

Reagenz	Lösungsmittel	Konzentration	Wirkweise
Caspofungin	Aqua dest.	9,2 – 120 µM (10 – 130 µg/ml)	
Micafungin	Aqua dest.	40 µM (50 µg/ml)	
Anidulafungin	Aqua dest.	44 µM (50 µg/ml)	
Adenosintriphosphat (ATP)	Aqua dest.	100 µM	Energieträger, Co-Substrat von Kinasen
H-89	Aqua dest.	10 µM	PKA-Antagonist
Methysergide	DMSO	100 µM	5-HT ₂ -Antagonist
N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexancarboxamid Maleatsalz (WAY-100635)	Aqua dest.	20 µM	5-HT ₃ -Antagonist
Cyproheptadin	DMSO	2,5 µg/ml	5-HT ₂ -Antagonist
3-(Isopropylamino)-1-[(7-methyl-4-indanyl)oxy]butan-2-ol (ICI 188,551)	Aqua dest.	100 µM	β ₂ -Adrenozeptor-Antagonist

Atropin	Aqua dest.	10 µM	muskarinerner Acetylcholin-Rezeptor-Antagonist
1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on (ODQ)	DMSO	10 µM	Antagonist der löslichen Guanylatzyklase
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Aqua dest.	1 mM	extrazellulärer Calciumchelator
BAPTA-AM	DMSO	100 µM	intrazellulärer Calciumchelator
Coffein	Aqua dest.	30 mM	Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher
2,4-Dinitrophenol (DNP)	DMSO	25 µM	Protonenionophor zwischen Intermembranraum und der Matrix des Mitochondriums
Cyclopiazonsäure (CPA)	DMSO	50 µM	Inhibitor der Ca ²⁺ -ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums
Fura-2 AM	Aqua dest.	2,5 µM	
Mag-Fluo-4 AM	Aqua dest.	5 µM	
Kaliumchlorid (KCl)	Aqua dest.	200 mM	Depolarisation der Zellmembran
Nickelchlorid (NiCl ₂)	Aqua dest.	50 µM	Nicht-selektiver Calciumkanalblocker
Ryanodin	DMSO	40 µM	Ryanodinrezeptor-Antagonist (> 20 mM)
2-Aminoethoxydiphenyl borat (2-APB)	DMSO	40 µM	Inhibitor des IP ₃ -Rezeptors

H-89 wirkt als selektiver Antagonist der Proteinkinase A (PKA). Methysergide, und Cyproheptadin werden als 5-HT₂-Antagonisten, WAY-100635 als 5-HT₃-Antagonist eingesetzt. Durch ICI 188,551 wird selektiv der β₂-Adrenozeptor und durch Atropin muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren blockiert. ODQ wirkt intrazellulär als Antagonist der löslichen Guanylatzyklase. EGTA als extrazellulärer Calciumchelator und BAPTA-AM als intrazellulärer Calciumchelator werden eingesetzt um freie Calciumionen zu binden. Mit dem Einsatz von Coffein werden intrazelluläre Calciumspeicher entleert. 2,4-Dinitrophenol (DNP) wirkt als Protonenionophor⁹⁹ dem Gradienten zwischen dem

Intermembranraum und der Matrix des Mitochondriums entgegen, entkoppelt somit die Atmungskette und bewirkt folglich die Entleerung des mitochondrialen Calciumspeichers. Cyclopiazonsäure (CPA) blockiert die Ca^{2+} -ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums. KCl führt zu einer Depolarisation der Zellmembran. NiCl_2 wird als nicht-selektiver Calciumkanalblocker eingesetzt. Ryanodin wirkt in geringen Konzentrationen als Ryanodinrezeptoragonist, in höheren Dosen ab $20 \mu\text{M}$ als selektiver Ryanodinrezeptorantagonist⁵¹. In diesen Experimenten wurde Ryanodin als selektiver Ryanodinrezeptorantagonist zur Inhibierung des Ryanodinrezeptors in einer Konzentration von $40 \mu\text{M}$ verwendet. 2-APB wurde zur Inhibition des IP_3 -Rezeptors am ER eingesetzt.

2.4 Statistik

2.4.1 Graphische Darstellungen

Die in den Graphen dargestellten Boxplots zeigen den Median, die 25. und die 75. Perzentile als auch den maximalen und minimalen Messwert. In den Verlaufplots ist pro Messzeitpunkt der Mittelwert (MW) und der Standardfehler (SEM) abgebildet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Boston, MA, USA).

2.4.2 Statistische Auswertung der PTG

Pro Versuchsgruppe wurden in der Regel 5 Tracheen untersucht und statistisch ausgewertet. Kleinere Versuchsgruppen wurden zur deskriptiven Darstellung verwendet. Als Einschlusskriterium galt ein PTG-Anstieg nach ATP-Gabe (Vitalitätstest) um mindestens 50%.

Während der Versuchsphase wurden pro Aufnahme mindestens 60 Partikelbewegungen gemessen. Pro Versuch und Messzeitpunkt wurde ein Mittelwert der errechneten PTG von mindestens 60 Partikeln gebildet und die PTG bei $t = 60$ min auf 100% normiert. Unter Verwendung des Mann-Whitney-U Tests als verteilungsfreiem Test bei zwei unabhängigen Variablen wurde die Gesamtverteilung einer Versuchsgruppe mit der Gesamtverteilung der Kontrollgruppe verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt und bei multiplem Testen eine alpha-Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Somit wurde bei dreimaligem Testen gegen die Kontrolle das Signifikanzniveau auf $p = 0,0167$ und bei zweimaligem Testen gegen die Kontrolle auf $p = 0,025$ angehoben.

2.4.3 Statistische Auswertung der fluoreszenzoptischen Calciummessungen

Zur Auswertung der fluoreszenzoptischen Calciummessungen wurde die Fluoreszenzratio von 340/380 zu Beginn der Messung auf 100% normiert. Für Mag-Fluo-4 wurde die initiale Fluoreszenz auf 100% normiert und gegen die Fluoreszenz der einzelnen späteren Messzeitpunkte ins Verhältnis gesetzt.

Insgesamt wurden pro Versuchsreihe drei Versuche durchgeführt (1 Versuch = 1 Deckgläschen mit 10 Zellen) und pro Versuch zehn Zellen eines Deckgläschens ausgewertet, sodass die Anzahl der gemessenen Zellen pro Versuchsgruppe $n = 30$ betrug. In fünf Versuchsreihen musste von der standardisierten Auswertung abgewichen werden, da hier weniger Zellen in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. Bei den betreffenden Versuchen wird die entsprechende Anzahl der Zellen pro Deckgläschen in den Legenden explizit erläutert. Die Zellen stammten aus den Passagen 3-6. Da die Messung der Fluoreszenz jede Sekunde erfolgte und die Versuchszeit 1000 s betrug, wurden 1000 Fluoreszenzwerte pro Zelle und pro Versuch gemessen. Zur Analyse der Fluoreszenzunterschiede zwischen einer Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe wurden die 10 größten Messwerte eines Versuchs im Zeitraum 100 s-800 s ausgewählt und mittels Mann-Whitney-U Test mit den 10 höchsten Messwerten der Kontrollgruppe, ebenfalls vor der Kaliumgabe und im gleichen Zeitraum, verglichen. Bei multiplen Testen wurde hier ebenfalls eine alpha-Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Als Einschlusskriterium der Versuche für die anschließende statistische Auswertung galt ein Anstieg der Fluoreszenzratio nach KCl-Gabe (Vitalitätstest) um 50%.

3 Ergebnisse

3.1 Die Wirkung der Echinocandine auf die PTG des trachealen Flimmerepithels

3.1.1 Caspofungin

Der Einfluss von Caspofungin auf die PTG des trachealen Flimmerepithels der Maus wurde in den Konzentrationen von 10 µg/ml (9,2 µM), 50 µg/ml (46 µM) und 100 µg/ml (92 µM) geprüft. In den Kontrollen wurde die basale PTG ohne Zugabe eines Agens ermittelt. Die Ergebnisse zeigen bei Gabe von Caspofungin eine von der Konzentration abhängige Beschleunigung der PTG, welche in Abb. 12 zu sehen ist. Nach Applikation von 10 µg/ml Caspofungin blieb die PTG zunächst unbeeinflusst und zeigte im späteren Verlauf einen moderaten Anstieg der PTG, wobei dieser Anstieg statistisch nicht signifikant war (9 Minuten nach CAS-Applikation $p = 0,7489$, siehe Abb. 13; 30 Minuten nach Caspofungin-Applikation $p = 0,5253$, siehe Abb. 14). Die ATP-Stimulation am Versuchsende war in dieser Versuchsgruppe stets positiv und unterschied sich nicht von der Vitalitätsprobe der Kontrollen (Abb. 15). Eine signifikante PTG-Beschleunigung erfolgte in den Konzentrationen von 50 µg/ml und 100 µg/ml unmittelbar nach Applikation von Caspofungin ($p < 0,01$) (Abb. 13). Diese Erhöhung der PTG wurde in der Konzentration von 50 µg/ml Caspofungin über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu konstant aufrechterhalten. In der Versuchsgruppe von 50 µg/ml Caspofungin konnte das Flimmerepithel am Versuchsende erfolgreich mit 100 µM ATP stimuliert werden und unterschied sich nicht von der Vitalitätsprobe der Kontrolle (Abb. 15). Unmittelbar nach Applikation der höchsten Konzentration von 100 µg/ml Caspofungin erfolgte ein initialer Anstieg der PTG. Darauf folgte eine Plateauphase von ca. 15 Minuten, an welche sich ein nahezu linearer Abfall der PTG anschloss. Dieser Abfall der PTG hielt über den weiteren Beobachtungszeitraum an. Am Versuchsende konnte die PTG in der Versuchsgruppe von 100 µg/ml Caspofungin nicht mehr durch Applikation von 100 µM ATP stimuliert werden und verlief während der Vitalitätsprobe signifikant ($p < 0,01$) unterhalb des Niveaus der Kontroll-PTG (Abb. 15). Die Dosis-Wirkungskurve von Caspofungin in den Konzentrationen von 9,2 -92 µM

(Abb. 16) ergab eine mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) von $13,4 \mu\text{M}$ nach Anwendung der Hill-Gleichung. Abkürzungen in den Abbildungen: CAS = Caspofungin, CTRL = Kontrolle.

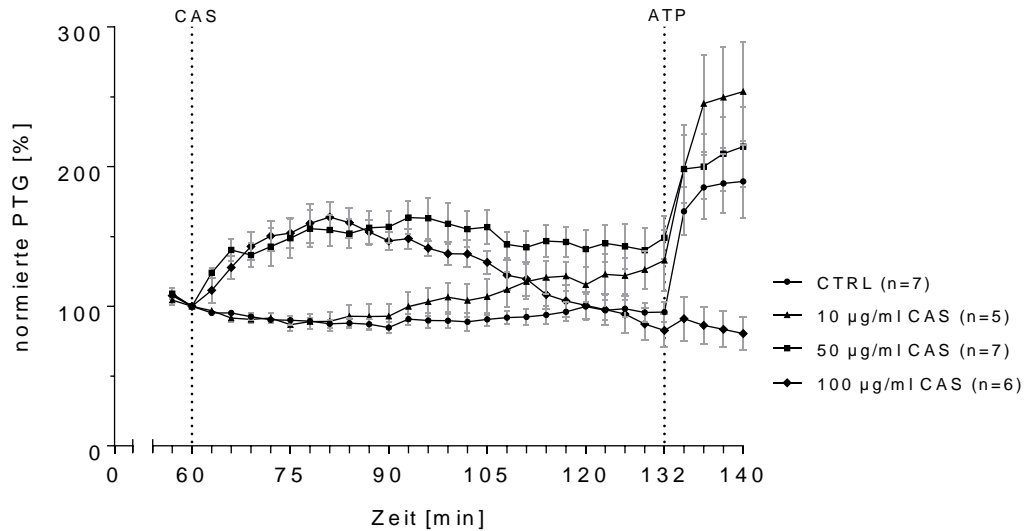


Abbildung 12: Caspofungin (CAS) steigert konzentrationsabhängig die PTG. Versuchsverlauf der Kontrolle (CTRL) und von CAS in den Konzentrationen von $10 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$ und $100 \mu\text{g/ml}$ im Standard-HEPES-Puffer. Dargestellt sind der Mittelwert (MW) und der Standardfehler (SEM). Bei $t = 132 \text{ min}$ wurden $100 \mu\text{M}$ ATP dem Puffermedium zugegeben, um die Vitalität des Flimmerepithels zu prüfen. Die PTG wurde bei $t = 60 \text{ min}$ auf den Wert von 100% normiert. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Applikation von CAS und ATP.

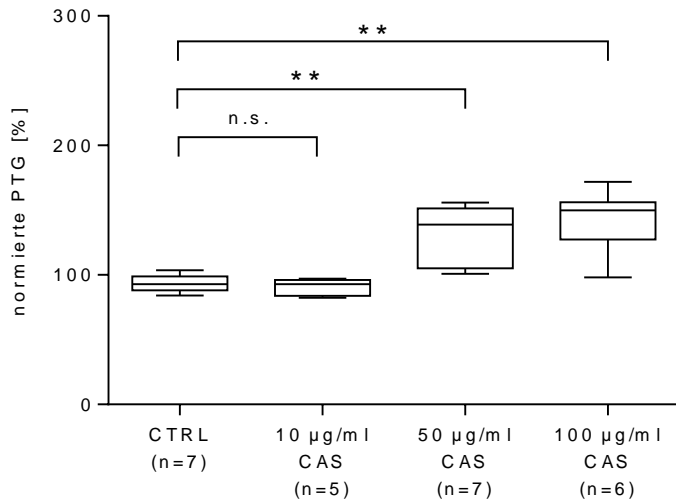


Abbildung 13: PTG im Vergleich 9 min ($t = 69$ min) nach Stimulation mit CAS. Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Gabe von $10 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,7439$). Signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Gabe von $50 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,0023$) und $100 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,0043$). Die PTG wurde bei $t = 60$ min auf den Wert von 100% normiert. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und die 75. Perzentile, sowie den maximalen und minimalen Messwert. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni, Signifikanzniveau $p=0,0167$; ** = $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant.

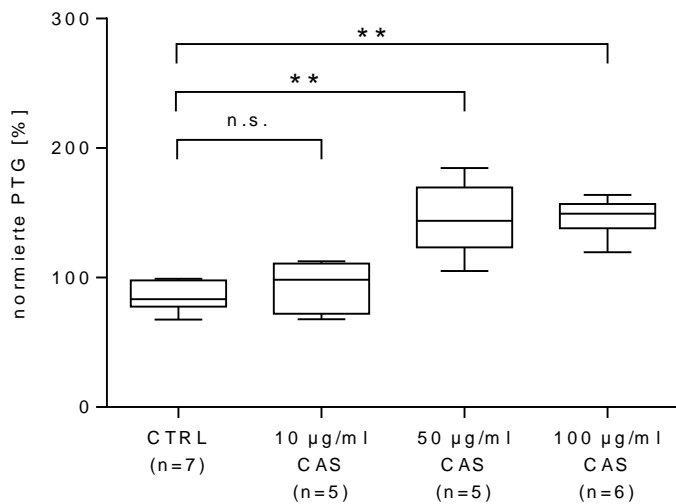


Abbildung 14: PTG im Vergleich 30 min ($t = 90$ min) nach Stimulation mit CAS. Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Gabe von $10 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,5253$). Signifikanter Anstieg nach Gabe von $50 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,0025$) und $100 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,0012$). Die PTG wurde bei $t = 60$ min auf den Wert von 100% normiert. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und die 75. Perzentile, sowie den maximalen und minimalen Messwert. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni, Signifikanzniveau $p = 0,0167$; ** = $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant.

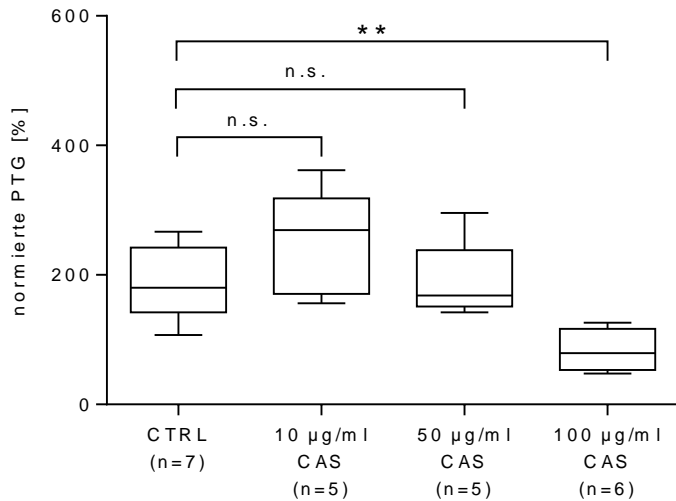


Abbildung 15: PTG im Vergleich 78 min ($t = 138$ min) nach Stimulation mit CAS und 8 min nach ATP-Gabe. Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Gabe von $10 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,1490$) und $50 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,9369$). Signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach Gabe von $100 \mu\text{g/ml}$ CAS ($p = 0,0047$). Die PTG wurde bei $t = 60$ min auf den Wert von 100% normiert. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und die 75. Perzentile, sowie den maximalen und minimalen Messwert. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni, Signifikanzniveau $p = 0,0167$; ** = $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant.

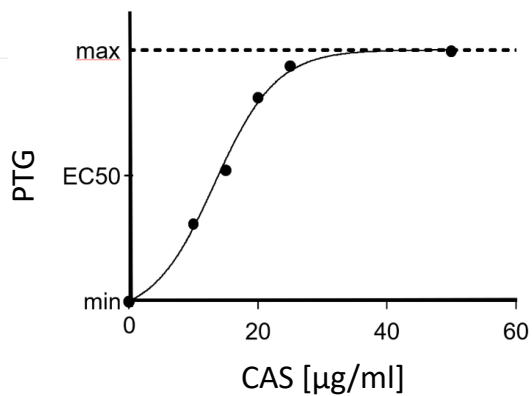


Abbildung 16: Die Dosis-Wirkungskurve von CAS zeigt den Effekt von CAS auf die PTG in den Konzentrationen von $10 \mu\text{g/ml}$ ($n=5$), $15 \mu\text{g/ml}$ ($n=1$), $20 \mu\text{g/ml}$ ($n=2$), $25 \mu\text{g/ml}$ ($n=5$) und $50 \mu\text{g/ml}$ ($n=5$). Die EC_{50} nach Hill-Gleichung liegt bei $14,65 \mu\text{g/ml}$ ($13,4 \mu\text{M}$).

3.1.2 Micafungin und Anidulafungin

Im Folgenden wurde überprüft, ob der unter Caspofungin beobachtete Effekt der PTG-Steigerung ebenfalls durch die Echinocandine Micafungin und Anidulafungin hervorgerufen wird. In den nachfolgenden Experimenten zur detaillierten Untersuchung des Effekts der PTG-Steigerung wurde nur Caspofungin untersucht. Micafungin und Anidulafungin wurden in der Konzentration von 50 µg/ml (40 µM Micafungin; 44 µM Anidulafungin) untersucht, entsprechend der Konzentration, welche bei der Untersuchung von Caspofungin eine signifikante Stimulation der PTG erzeugte und eine positive Vitalitätsprobe aufwies.

Bei Einsatz von Micafungin zeigte sich ein passagerer Anstieg ähnlich der Kinetik von Caspofungin (Abb. 17). Die PTG erreichte ihr Maximum innerhalb von 9 Minuten nach Applikation. Nach Erreichen des Maximums schloss sich eine Plateau-Phase von ca. 18 Minuten an, daraufhin erfolgte auch bei dieser Versuchsgruppe ein kontinuierlicher, linearer Abfall der PTG, welcher im Vergleich zu Caspofungin ausgeprägter war. Somit entsprach am Ende der Beobachtungszeit vor ATP-Gabe die PTG von Micafungin dem Niveau der Kontroll-PTG. Die Vitalitätsprobe durch ATP-Applikation am Versuchsende von Micafungin war positiv.

Bei der Untersuchung von Anidulafungin zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der PTG (Abb. 18 A). Nach Erreichen des Maximums nach 9 Minuten folgte eine Plateau-Phase von ungefähr 24 Minuten, der sich ebenfalls ein kontinuierlicher, nahezu linearer Abfall der PTG anschloss (Abb.17). Vor Ende der Beobachtungszeit unterschied sich die PTG weiterhin signifikant von den Kontrollen (Abb. 18 B). Das Flimmerepithel konnte auch in dieser Versuchsreihe zum Nachweis der Vitalität am Ende der Messung durch 100 µM ATP stimuliert werden. Abkürzungen in den Abbildungen: CAS = Caspofungin, MICA = Micafungin, ANI = Anidulafungin, CTRL = Kontrolle.

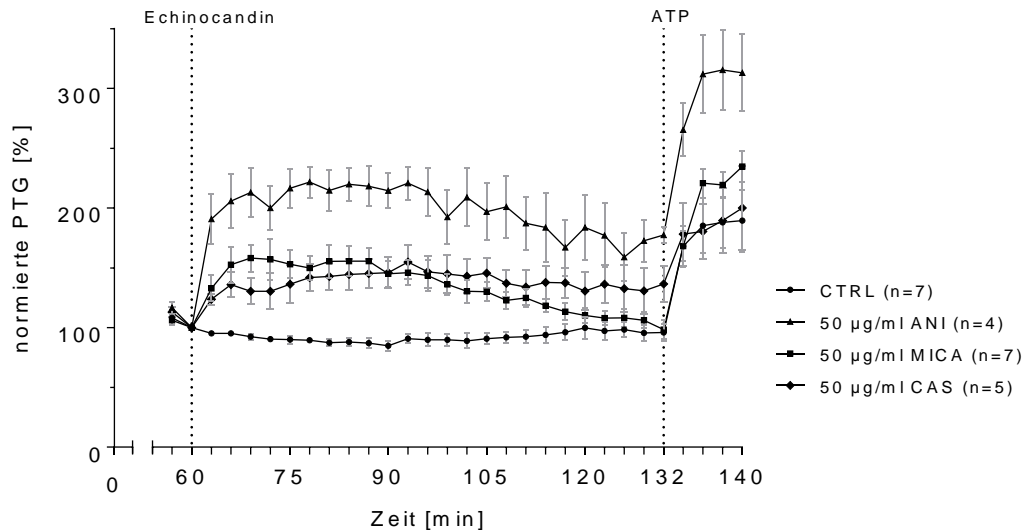


Abbildung 17: Versuchsverlauf von ANI, MICA und CAS in der Konzentration von jeweils 50 µg/ml und der CTRL im Standard-HEPES-Puffer. Bei allen drei Echinocandinen zeigte sich unmittelbar nach Applikation ein passagerer Anstieg der PTG, welcher nach einer 30-minütigen Plateau-Phase linear abfiel, wobei MICA am Ende der Beobachtungszeit die Ausgangs-PTG erreichte. Die PTG von CAS und ANI blieb auch am Ende der Versuchszeit deutlich erhöht. Verwendung des Datensatzes der CTRL und CAS aus Abb. 12. Dargestellt sind der MW und der SEM. Bei $t = 132$ min wurden 100 µM ATP dem Medium zugegeben um die Vitalität des Flimmerepithels zu prüfen. Normierung der PTG auf 100 % bei $t = 60$ min.

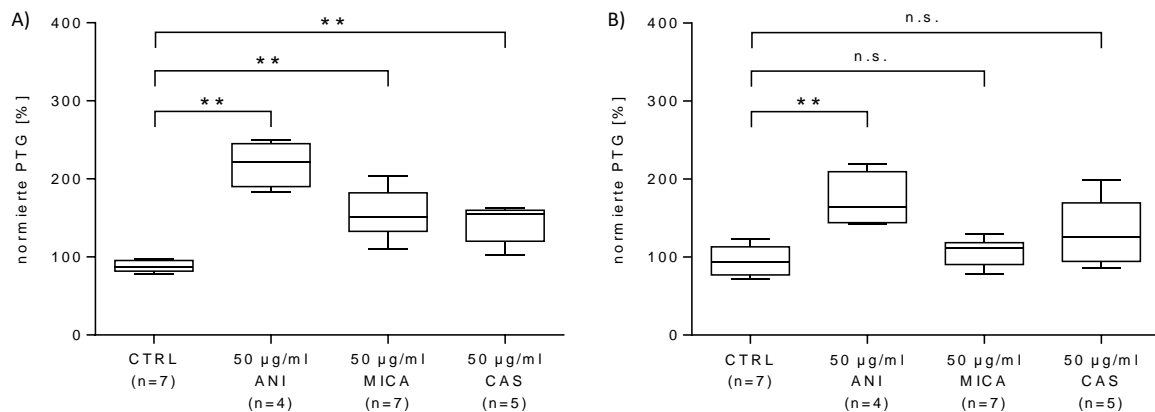


Abbildung 18: Vergleich der PTG aller Echinocandine in der Konzentration von 50 µg/ml und der Kontrolle im Messintervall A) $\Delta t = 78-84$ min. Signifikanter Unterschied der PTG (** = $p < 0,005$) zur CTRL in allen Versuchsgruppen, wobei die PTG von ANI um 121 % ($p = 0,00095$), von MICA um 52% ($p = 0,0012$) und von CAS um 55% ($p = 0,0043$) gesteigert wurde. B) $t = 129$ min. Signifikanter Unterschied der PTG von ANI zur Kontroll-PTG ($p = 0,0015$), MICA und CAS unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle ($p = 0,289$ und $p = 0,0823$). Am Ende der Beobachtungszeit lag bei ANI noch eine PTG-Steigerung um 64 % vor. Die PTG wurde bei $t = 60$ min auf den Wert von 100 % normiert. Verwendung des Datensatzes der CTRL und CAS aus Abb. 12. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und die 75. Perzentile, sowie den maximalen und minimalen Messwert. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni, Signifikanzniveau $p = 0,0167$; ** = $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant.

3.2 Der Einfluss von Caspofungin auf intrazelluläre Signalkaskaden und membrangebundene Rezeptoren

Die Funktion des Flimmerepithels wird durch zahlreiche Faktoren intra- und extrazellulär beeinflusst. Eine große Rolle spielen membrangebundene Rezeptoren mit der intrazellulären Weiterleitung des Signals durch „second messenger“. Im weiteren Verlauf der Studie wurde der Effekt der PTG-Steigerung detailliert für Caspofungin untersucht und geprüft, ob Caspofungin über intrazelluläre Signalkaskaden die Funktion des Flimmerepithels moduliert. Hierbei wurde als Standard die Konzentration von 50 µg/ml Caspofungin verwendet, da diese Konzentration eine zuverlässige und signifikante Stimulation der PTG bewirkte und die Vitalitätsprobe am Versuchsende durch 100 µM ATP stets positiv war.

3.2.1 Untersuchung intrazellulärer Signalwege durch Inhibition der PKA

Die Hemmung der PKA wurde durch 10 µM H-89 durchgeführt. Nach 30-minütiger Inkubation mit H-89 folgte die Applikation von Caspofungin (50 µg/ml) bei $t = 90$ min (Abb. 19). Unmittelbar nach Caspofungin-Applikation war ein signifikanter PTG-Anstieg zu verzeichnen, welcher über einen Zeitraum von 9 Minuten anhielt und anschließend linear abfiel. In Abb. 20 sind die normierte PTG der Kontrolle und die 30. Minute nach Caspofungin-Gabe mit und ohne vorausgegangene Inkubation mit H-89 dargestellt. Der PTG-hemmende Eigeneffekt von H-89 wurde bei der Auswertung berücksichtigt und der Ausgangswert dieser Versuchsgruppe vor Applikation von Caspofungin ($t = 90$ min) auf 100 % normiert. Abkürzungen in den Abbildungen: CAS = Caspofungin, CTRL = Kontrolle.

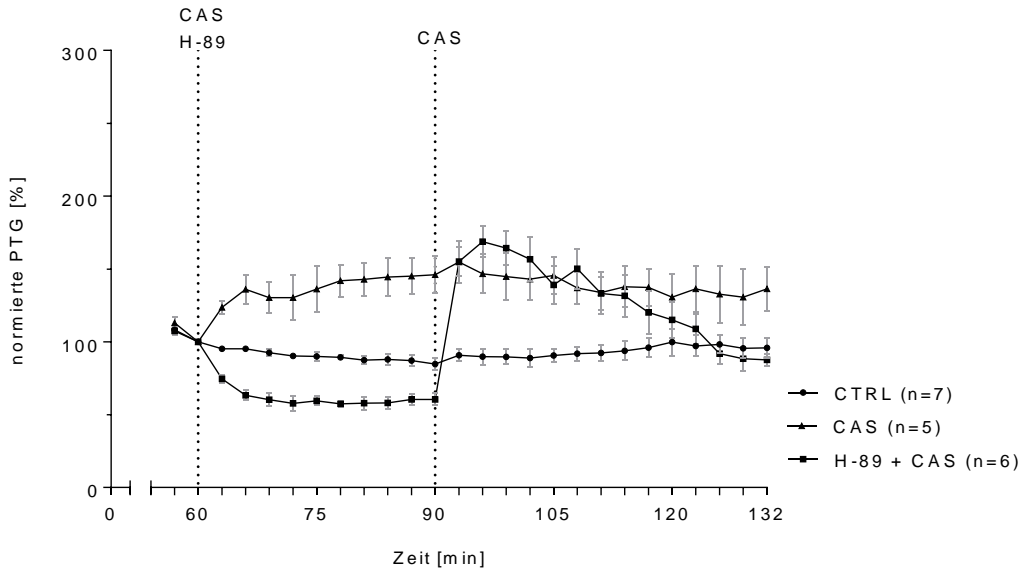


Abbildung 19: Versuchsverlauf von CAS, H-89 + CAS und der CTRL im Standard-HEPES-Puffer. H-89 zeigte eine Hemmung der PTG. Die anschließende Applikation von CAS bei $t = 90$ min führte zu einer PTG-Beschleunigung. Als Vergleich ebenfalls dargestellt ist der Versuchsverlauf der CTRL und der alleinigen Gabe von CAS. Verwendung des Datensatzes der CTRL und CAS aus Abb. 12. Dargestellt sind der MW und der SEM. Normierung der PTG auf 100 % bei $t = 60$ min.

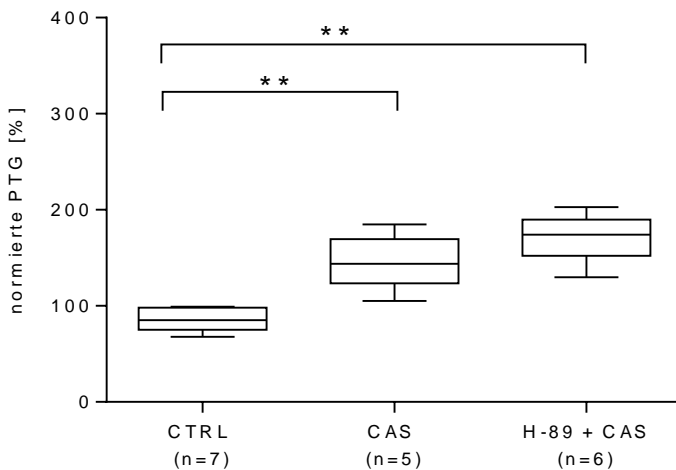


Abbildung 20: Mit und ohne Inkubation von $10 \mu\text{M}$ H-89 und Applikation von $50 \mu\text{g/ml}$ CAS unterscheidet sich die PTG signifikant von der Kontrolle ($p_{(\text{CTRL-CAS})} = 0,0043$, $p_{(\text{CTRL-H-89+CAS})} = 0,0022$). Dargestellt sind die PTG der Kontrolle ($t = 90$), die PTG nach $50 \mu\text{g/ml}$ CAS ($t = 90$) und nach Inkubation mit H-89 und $50 \mu\text{g/ml}$ CAS ($t = 120$). Die PTG wurde bei CAS $t = 60$ min und bei H-89+CAS $t = 90$ min auf den Wert von 100 % normiert. Verwendung des Datensatzes der CTRL und CAS aus Abb. 12. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und die 75. Perzentile, sowie den maximalen und minimalen Messwert. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni, Signifikanzniveau $p = 0,025$, ** = $p < 0,005$

3.2.2 Untersuchung weiterer membrangebundener Rezeptoren und Second Messenger

Weitere Untersuchungen membrangebundener Rezeptoren und der löslichen Guanylatzyklase zeigten keinen Einfluss auf die von Caspofungin vermittelte PTG-Steigerung. Folglich wurden in weiteren Experimenten die 5-HT₂-Rezeptoren durch Cyproheptadin (14 µM) und Methysergide (100 µM), 5-HT₃-Rezeptoren durch WAY (10 µM), die sGC durch ODQ (10 µM), die β-Adreno-Rezeptoren durch ICI 118,551 (100 µM) und die Acetylcholin-Rezeptoren durch Atropin (10 µM) inhibiert und anschließend der Konzentration von 50 µg/ml Caspofungin ausgesetzt. Bei keinem der Versuche konnte der Effekt von Caspofungin gehemmt oder unterdrückt werden. Die Reaktion des zilienträgenden Epithels auf Caspofungin zeichnete sich stets deutlich von der basalen PTG ab (Abb. 21 A-F). Da es sich hierbei um Pilotexperimente handelt, wurde bei stabilen Versuchsbedingungen die Anzahl der Versuche pro Versuchsgruppe reduziert, um die Anzahl der Tiertötungen zu beschränken. Die Experimente wurden zur deskriptiven Darstellung einbezogen, jedoch aufgrund der Versuchsanzahl und dem präliminären Charakter statistisch nicht ausgewertet.

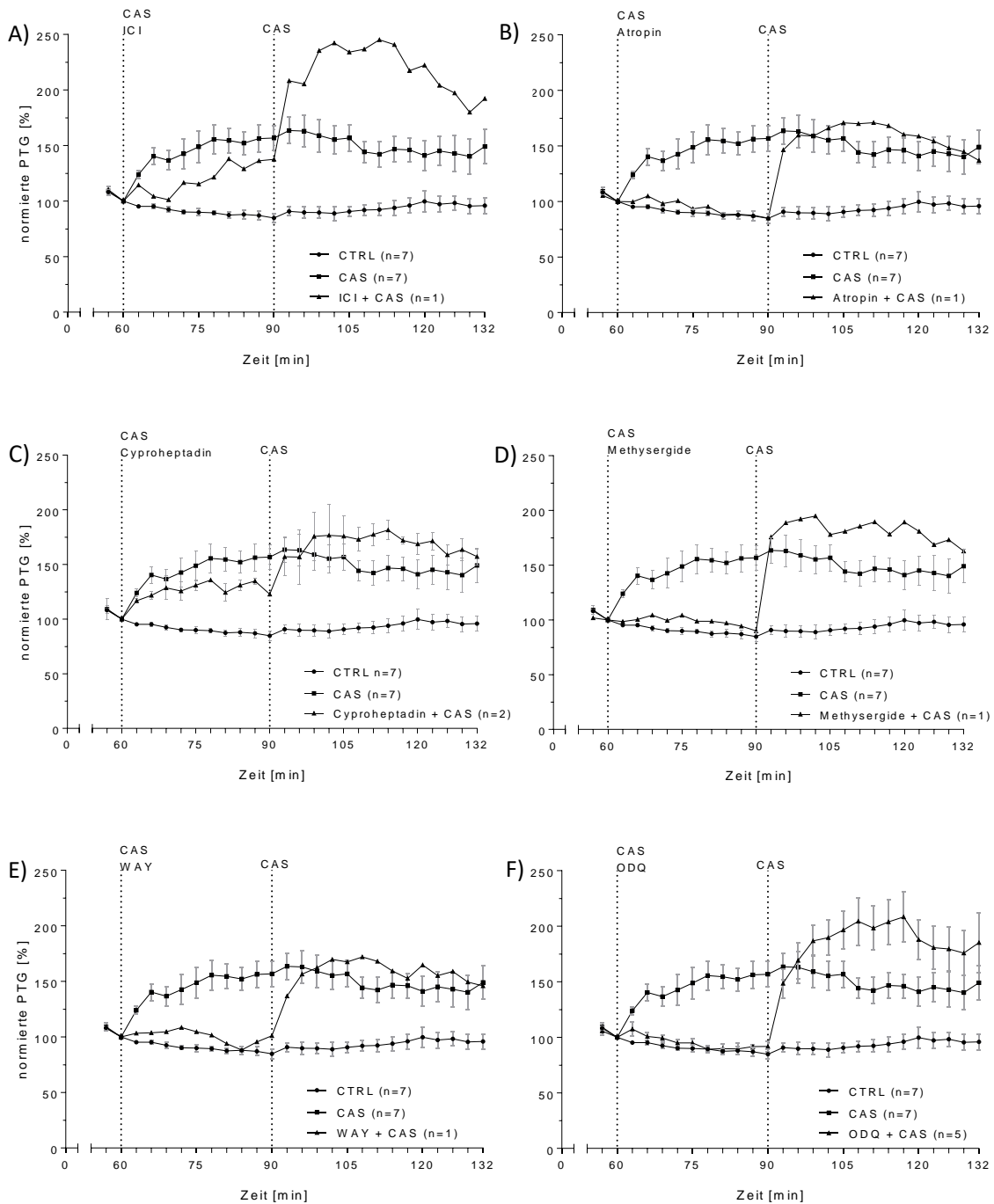


Abbildung 21: Untersuchung membrangebundener Rezeptoren und der löslichen Guanylatzyklase. A) Die Gabe von $100 \mu\text{M}$ ICI steigerte die PTG auf 137%. Die anschließende Applikation von $50 \mu\text{g/ml}$ CAS führte zur weiteren PTG-Steigerung auf 245%. B) Atropin ($10 \mu\text{M}$) beeinflusste die PTG nicht. Nach Gabe von $50 \mu\text{g/ml}$ CAS erfolgte ein Anstieg der PTG auf 163%. C) Cyproheptadin ($2,5 \mu\text{g/ml}$) steigerte die PTG auf zunächst 135%, nach CAS-Applikation ($50 \mu\text{g/ml}$) erhöhte sich die PTG auf 181%. D) Methysergide ($100 \mu\text{M}$) hatte kaum einen Eigeneffekt auf die PTG. Nach Gabe von CAS ($50 \mu\text{g/ml}$) stieg die PTG auf 194% an. E) Nach Gabe von WAY ($20 \mu\text{M}$) veränderte sich die PTG ebenfalls nur marginal, wobei sich die PTG nach CAS-Gabe ($50 \mu\text{g/ml}$) auf 172% steigerte. F) ODQ ($10 \mu\text{M}$) steigerte die PTG nicht, nach darauffolgender CAS-Applikation ($50 \mu\text{g/ml}$) erhöhte sich die PTG auf 208%. Verwendung des Datensatzes der CTRL und CAS aus Abb. 12. Dargestellt ist der MW und der SEM. Normierung der PTG auf 100 % bei $t = 60$ min.

3.3 Die PTG in calciumfreiem Milieu

Die PTG des Flimmerepithels in calciumfreiem Puffer zeigte eine leichte Reduktion der absoluten PTG im Vergleich zur PTG in calciumhaltigem Puffer (Abb. 22 A). Die PTG blieb jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant. Die Vitalitätsprobe am Versuchsende durch ATP war in beiden Gruppen positiv (Abb. 22 B).

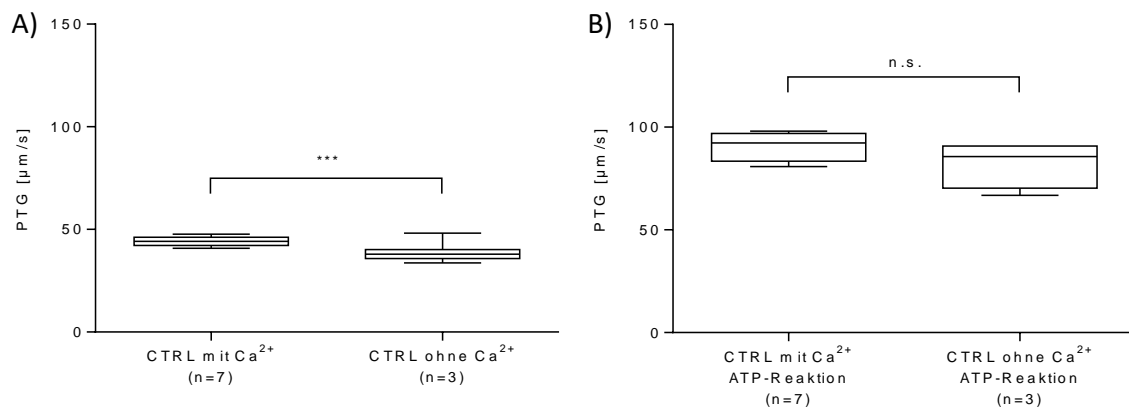


Abbildung 22: Vergleich der absoluten PTG [µm/s] der Kontrollen (CTRL) in calciumhaltigen und calciumfreiem Puffer. A) Die PTG der CTRL in calciumfreiem Puffer ist geringer als die PTG der CTRL in calciumhaltiger Umgebung ($p < 0,0001$). B) Die Stimulation durch ATP am Versuchsende führte in beiden Versuchsgruppen zur Beschleunigung der PTG ($p = 0,1143$). Verwendung des Datensatzes der CTRL mit Ca²⁺ aus Abb. 12. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und die 75. Perzentile, sowie den maximalen und minimalen Messwert. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test. Signifikanzniveau $p = 0,05$, *** = $p < 0,001$

3.3.1 Der Effekt von CAS ist unabhängig von der calciumfreien Umgebung

Caspofungin bewirkte in einer Konzentration von 50 µg/ml in calciumfreiem Puffer, versetzt mit 1 mM EGTA, ebenfalls eine Steigerung der PTG, welche nach 15 min eine Plateau-Phase erreichte und nach 18 min linear abfiel. Dieser lineare Abfall der PTG war bei Verwendung von 50 µg/ml Caspofungin in calciumhaltigem Puffer nicht zu beobachten. Hier wurde die PTG während der Beobachtungszeit nahezu konstant aufrechterhalten. In folgender Abbildung 23 ist der Vergleich der PTG der Kontrollen und der PTG von Caspofungin in calciumfreiem und calciumhaltigem Puffer dargestellt.

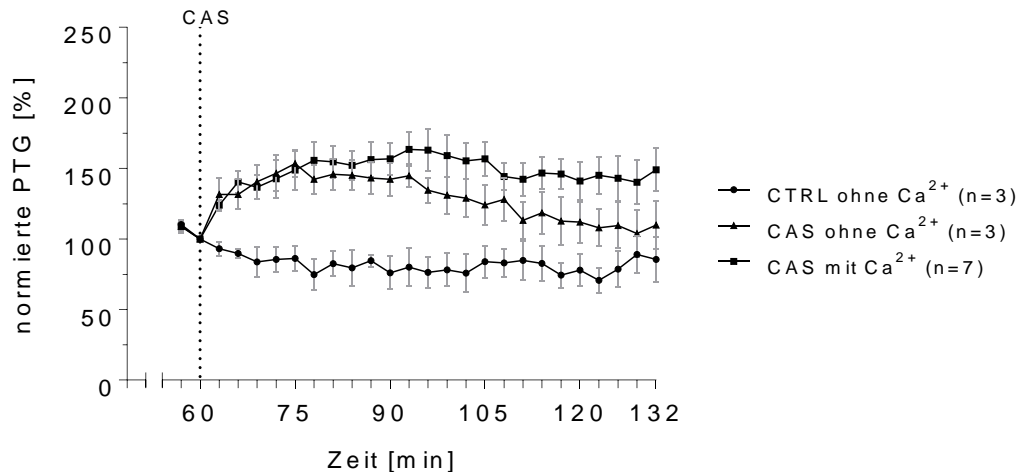


Abbildung 23: Die PTG in calciumfreiem Puffer, versetzt mit 1 mM EGTA. Nach Stimulation mit 50 $\mu\text{g/ml}$ CAS ($t = 60 \text{ min}$) fällt die PTG nach initialem Anstieg und anschließender Plateau-Phase linear ab. Im Vergleich ist die Kontrolle in calciumfreiem Puffer und die Stimulation durch CAS in calciumhaltigem Puffer zu sehen. In calciumhaltigem Puffer blieb die PTG nach CAS-Gabe prolongiert erhöht. Verwendung des Datensatzes von CAS mit Ca^{2+} aus Abb. 12. Dargestellt ist der MW und der SEM. Normierung der PTG auf 100 % bei $t = 60 \text{ min}$. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Applikation von CAS.

3.3.2 Identifizierung intrazellulärer Calciumspeicher in Trachealepithelzellen durch Coffein

Um die Beteiligung intrazellulärer Calciumionen am Anstieg der PTG aus dem ER zu untersuchen, wurde das ER als coffeinsensitiver Calciumspeicher durch 30 mM Coffein zu Beginn der Versuche entleert und anschließend 50 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin appliziert. Dem Puffer wurde neben Coffein auch stets 1 mM EGTA und 100 μM BAPTA-AM zugefügt um extra- und intrazelluläres Ca^{2+} abzufangen. Wurde Caspofungin nun auf das Zilien tragende Epithel gegeben, konnte keine Steigerung der PTG gemessen werden, sondern die PTG verlangsamte sich linear nach Applikation von Caspofungin. Im Vergleich dazu konnte ohne Coffein eine initiale, 9 Minuten anhaltende PTG-Steigerung nach Caspofungin-Gabe in calciumfreiem Milieu gemessen werden, welche jedoch danach schnell linear abfiel. In beiden Versuchsgruppen, in denen Caspofungin eingesetzt wurde, kam die PTG vor Versuchsende zum Erliegen. In der Versuchsgruppe, in welcher die Wirkung von Coffein ohne Applikation von Caspofungin untersucht wurde, nahm die PTG innerhalb des Beobachtungszeitraums geringfügig ab (Abb. 24).

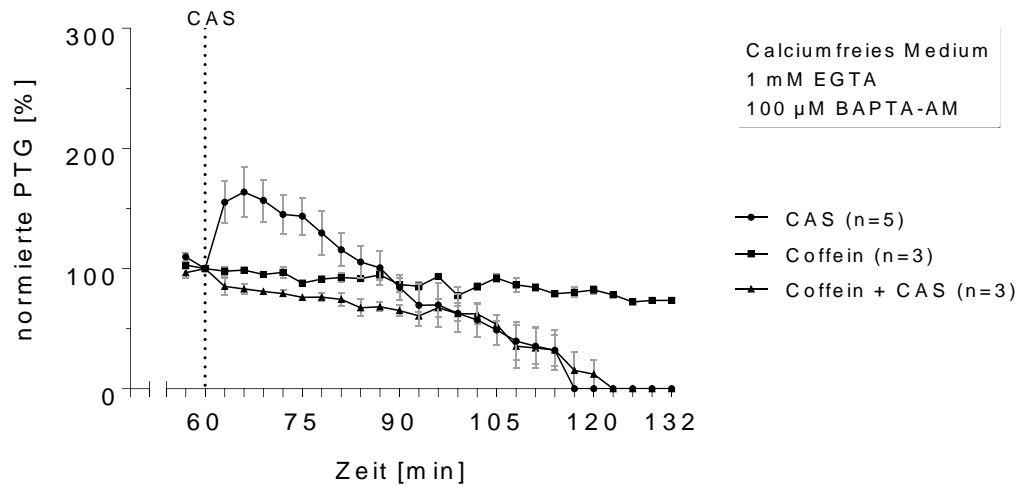


Abbildung 24: CAS in calciumfreiem Puffer mit EGTA und BAPTA-AM versetzt. CAS bewirkt einen deutlichen initialen Anstieg in calciumfreiem Puffer mit BAPTA-AM, jedoch nimmt die PTG nach Erreichen des Maximums nach 6 min schnell ab und kommt innerhalb des Beobachtungszeitraums bei 117 min zum Erliegen. CAS nach Coffein-Applikation hat keinen PTG-stimulierenden Effekt, sondern führt zu einem unmittelbar deutlichen und linearen Abfall der PTG, welche ebenfalls vor Versuchsende zum Erliegen kommt. Coffein alleine bewirkt keinen Abfall der PTG. Dargestellt ist der MW und der SEM. Normierung der PTG auf 100 % bei $t = 60$ min. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Applikation von CAS.

3.4 Fluoreszenzoptische Calciummessung in HTE-Zellen mit Fura-2 AM und Mag-Fluo-4

Beladen mit Fura-2 AM zeigten die HTE-Zellen in Kontrollversuchen ein stabiles Fluoreszenzsignal. In Abbildung 25 ist die Ratio der emittierten Fluoreszenz einer Zelle im Kontrollversuch dargestellt. Das Fluoreszenzverhältnis wurde in jedem Versuch am Zeitpunkt $t = 0$ auf 100% normiert. Die Grundlinie der Kontrollen verlief stabil und geradlinig ohne wesentliche Fluoreszenzveränderung bis zur Vitalitätskontrolle am Versuchsende durch 200 mM KCl bei $t = 800$ s. Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ äußerte sich in einem raschen transienten Anstieg der Fluoreszenz. Die Beobachtungszeit wurde bei $t = 1000$ s beendet. Da der Beobachtungszeitraum für Calciummessungen sehr lang ist, wurde ein leichter Anstieg der 340/380 Ratio registriert, erkennbar an der graduell ansteigenden Grundlinie im Verlauf dieser langen Periode.

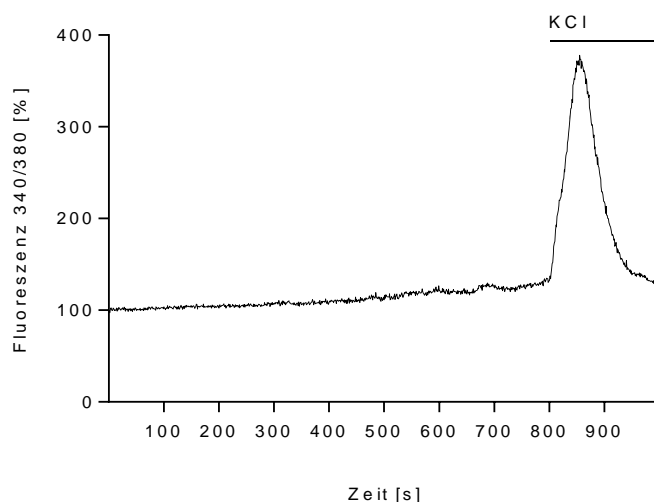


Abbildung 25: Die Fura-2 Fluoreszenz 340nm/380nm der HTE-Zellen aufgetragen zur Beobachtungszeit (1000 s) unter Kontrollbedingungen in calciumhaltigem HEPES-Zellpuffer. Normierung der Fluoreszenzratio auf 100% bei $t = 0$. Das Fluoreszenzsignal der Kontrollversuche zeigte sich stabil und geradlinig. Es wurden keine größeren intrazellulären Veränderungen der Calciumkonzentration gemessen. Die Fluoreszenz wurde in einer Bildfrequenz von 1 Hz erfasst. Die horizontale Linie oberhalb des Graphs markiert die Phase der Funktionskontrolle der Zellen durch KCl-Applikation bei $t = 800$ s. Diese Funktionskontrolle wurde am Ende eines jeden Versuches durchgeführt.

3.4.1 Caspofungin bewirkt in Trachealepithelzellen einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$

Nach Applikation von 65 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin zeigte sich entweder unmittelbar nach Applikation oder mit einer Latenzzeit (Zeitspanne > 30 s nach CAS-Gabe) ein rascher Anstieg der Fura-2 Ratio, welcher nach ungefähr einer Minute wieder das Ausgangsniveau erreichte (Abb. 26). Die Fura-2 Ratio unterschied sich signifikant von der in Kontrollzellen, denen nicht Caspofungin hinzu pipettiert wurde (Abb. 27). Die Blockade membranständiger, spannungsgesteuerter Calciumkanäle durch 50 μM NiCl_2 ergab keine Reduktion des Calciumsignals, welches durch Caspofungin hervorgerufen wurde (Abb. 27).

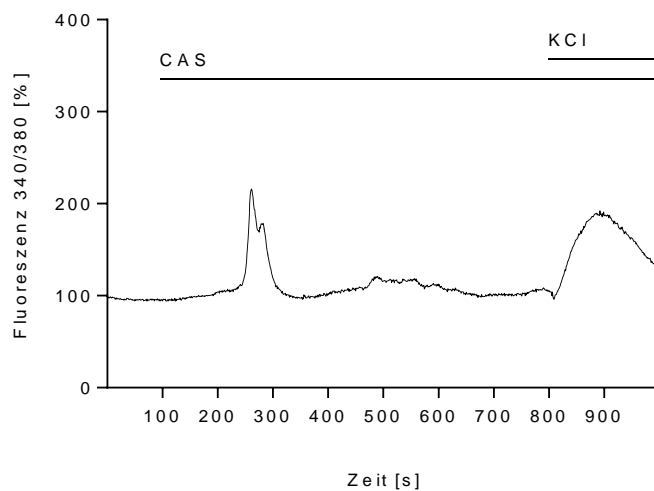


Abbildung 26: Veränderung der Fura-2 Fluoreszenz einer Trachealepithelzelle nach Zugabe von 65 $\mu\text{g/ml}$ (60 μM) CAS bei 100 s, Funktionskontrolle durch 200 mM KCL bei 800 s. Die horizontalen Linien oberhalb des Graphen kennzeichnen die CAS- und KCl-Applikation. Normierung der Fluoreszenzratio auf 100% bei $t = 0$. Die Fluoreszenz wurde in einer Bildfrequenz von 1 Hz erfasst.

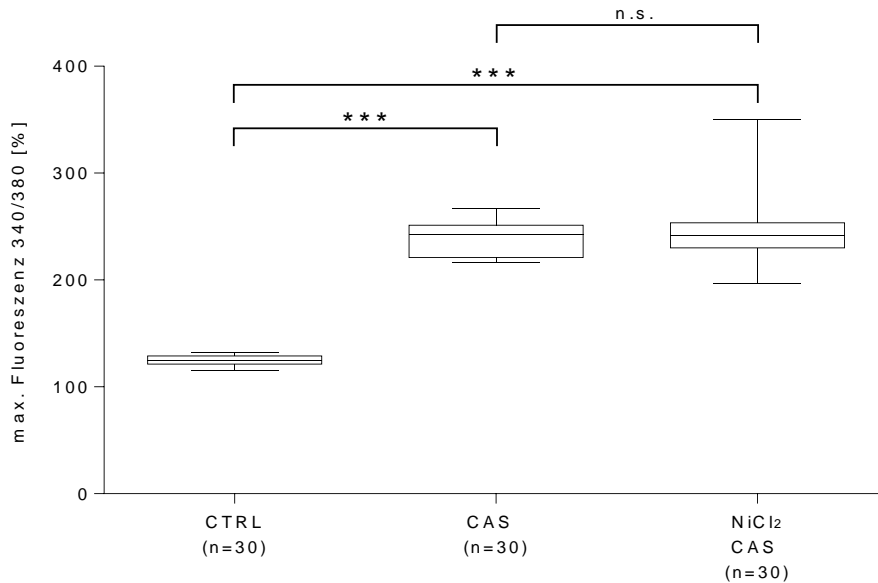


Abbildung 27: Vergleich der maximalen Fluoreszenz der Kontrollen mit 65 µg/ml CAS und 50 µM NiCl₂ + 65 µg/ml CAS in calciumhaltigem HEPES-Puffer. Die Fluoreszenz der Versuchsgruppen CAS und NiCl₂ + CAS unterschied sich jeweils signifikant (jeweils $p < 0,0001$) von der Kontrollgruppe. Zwischen den Versuchsgruppen CAS und NiCl₂ + CAS lag kein signifikanter Unterschied der Fluoreszenz ($p = 0,7243$). Auswertung von jeweils 3 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 30$). Die Boxplots stellen den Median, den SEM und den maximalen und minimalen Wert einer Versuchsgruppe dar. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni. $p = 0,025$, *** = $p < 0,0005$, n.s. = nicht signifikant.

3.4.2 Der durch Caspofungin induzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ist unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+}

Versuche wurden in calciumfreiem HEPES-Puffer ohne Zusatz von Calcium, dafür aber versetzt mit 1 mM EGTA als extrazellulärem Calciumchelator durchgeführt. Es wurden in der Regel pro Versuchsgruppe 3 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 30$) untersucht. In calciumfreier Lösung konnte eine konstante Reaktion auf Caspofungin erst bei Steigerung der Dosis auf 130 µg/ml (120 µM) ausgelöst werden. Bei einer Konzentration von 65 µg/ml (60 µM) fand bei $n=17$ der untersuchten Zellen eine volle Reaktion, bei $n = 13$ der Zellen keine Reaktion statt. Aus diesem Grund wurde in Versuchen in calciumfreiem Milieu die Dosis von 130 µg/ml Caspofungin verwendet, um den Effekt des Echinocandins bei allen Zellen ($n = 30$) zuverlässig hervorzurufen und untersuchen zu können. Zu beobachten waren zwei unterschiedliche Zellreaktionen. Entweder verlief die Zellreaktion biphasisch mit einem schnellen Calciumpeak (Dauer < 10 s), dem

ein prolongierter, etwas flacher verlaufender Calciumanstieg folgte, der nach ca. 90 s wieder die Baseline erreichte (Abb. 28 A), oder der Calciumanstieg war nahezu monophasisch mit raschen Anstieg, dem sich unmittelbar ein langsamerer Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ anschloss, bei dem die Baseline insgesamt wieder nach ca. 100 s erreicht wurde (Abb. 28 B).

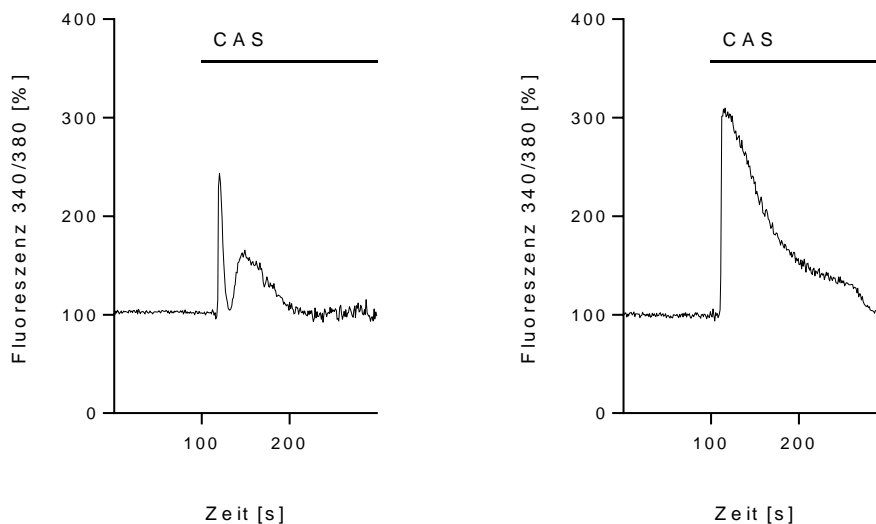


Abbildung 28: A) Biphasischer Verlauf des Calciumsignals nach Stimulation mit 130 $\mu\text{g/ml}$ CAS in calciumfreiem Puffer. Anstieg der Fluoreszenzratio auf 244 %, Abfall auf 105% und erneuter Anstieg auf 165 %. B) Monophasische Zellreaktion nach Applikation von 130 $\mu\text{g/ml}$ CAS in calciumfreiem Puffer. Anstieg der Fluoreszenzratio auf 309 %. Die Linien oberhalb des Graphen markieren die CAS-Applikation. Normierung der Fluoreszenzratio auf 100% bei $t = 0$. Die Fluoreszenz wurde in einer Bildfrequenz von 1 Hz erfasst.

3.4.3 Beteiligung mitochondrialer Calciumspeicher am Caspofungin-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$

In calciumfreiem Puffer wurde durch die Zugabe von DNP (25 μM) überprüft, ob Caspofungin einen Einfluss auf die mitochondrialen Calciumspeicher ausübt. Die Applikation von DNP selbst bewirkte einen schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, welche sofort wieder zur Baseline zurückkehrte. Nach darauffolgender Applikation von 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin erfolgte erneut ein rascher Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, welcher verzögert zur Baseline zurückkehrte (Abb. 29 A).

Vergleicht man die Fluoreszenzamplituden, dargestellt in Abbildung 29 B, zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Fluoreszenz der Versuchsgruppe von 130

$\mu\text{g/ml}$ Caspofungin zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$) und von DNP + $130 \mu\text{g/ml}$ Caspofungin zu DNP alleine nach Entleerung der mitochondrialen Calciumpspeicher ($p < 0,001$).

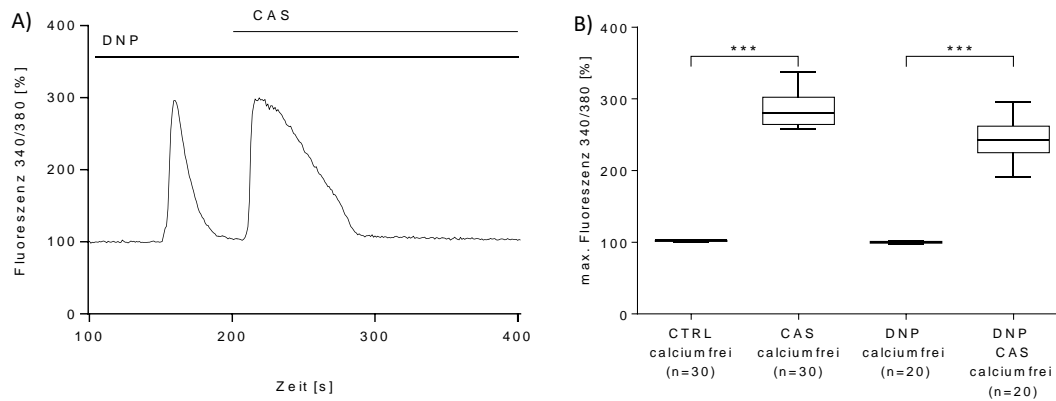


Abbildung 29: A) Zellreaktion nach Gabe von $25 \mu\text{M}$ DNP und $130 \mu\text{g/ml}$ CAS in calciumfreiem Puffer. Die horizontalen Linien oberhalb des Graphen kennzeichnen die Applikation der eingesetzten Agentien. Normierung der Fluoreszenzratio auf 100% bei $t = 0$. Die Fluoreszenz wurde in einer Bildfrequenz von 1 Hz erfasst. B) Vergleich der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Kontrollen, nach Caspofungin-Gabe, nach Entleerung der mitochondrialen Calciumpspeicher durch DNP und nach Caspofungin-Gabe unter DNP-Wirkung. Zu den Kontrollen und zu DNP alleine zeigte sich nach Caspofungin-Applikation jeweils ein signifikanter Unterschied (jeweils $p < 0,0001$). In den Versuchsgruppen CTRL calciumfrei und CAS Calciumfrei Auswertung von jeweils 3 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 30$). In den Versuchsgruppen DNP calciumfrei und DNP+CAS calciumfrei wurden jeweils 2 Deckgläschen à 10 Zellen ausgewertet ($n = 20$). Die Boxplots stellen den Median, den SEM und den maximalen und minimalen Wert einer Versuchsgruppe dar. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test. Signifikanzniveau $p = 0,05$, *** = $p < 0,001$.

3.4.4 Kein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Entleerung der coffeinsensitiven Calciumpspeicher und Applikation von Caspofungin

Nach Entleerung der Coffein-sensitiven Calciumpspeicher des ER durch 30 mM Coffein¹⁰⁰ bei $t = 100 \text{ s}$ und nach Applikation von $130 \mu\text{g/ml}$ Caspofungin bei $t = 200 \text{ s}$ zeigte sich eine geringe, prolongierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 30 A). Ein schneller, transientser und von der Grundlinie scharf abgrenzbarer Fluoreszenzanstieg blieb aus. Im Vergleich dieser Versuchsgruppe zur Versuchsgruppe von Caspofungin ohne Coffein ist ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzratio zu erkennen (Abb. 30 B).

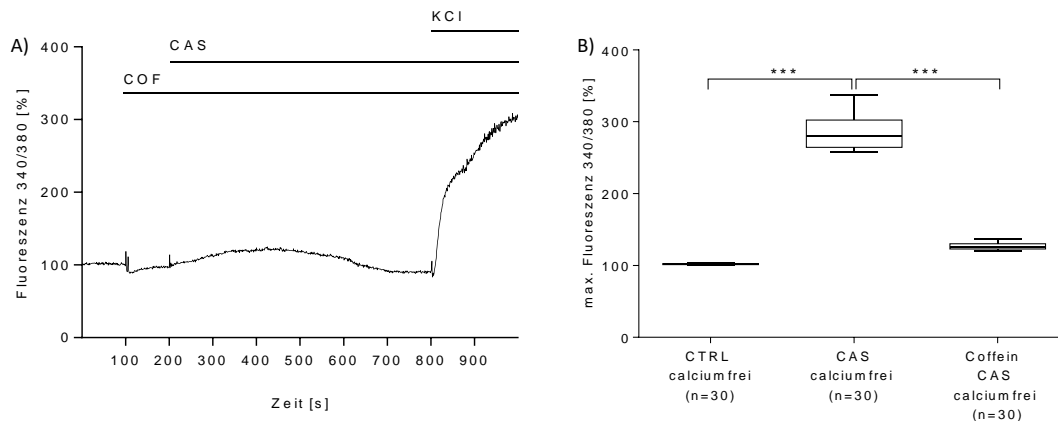


Abbildung 30: A) Applikation von 30 mM Coffein bei 100 s, 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin bei 200 s und 200 mM KCl zur Vitalitätsprobe bei 800 s, gekennzeichnet durch die horizontalen Linien. Normierung der Fluoreszenzratio auf 100% bei $t = 0$. Die Fluoreszenz wurde in einer Bildfrequenz von 1 Hz erfasst. B) Vergleich der maximalen Fluoreszenz der Kontrolle, von 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin ohne Coffeingabe und 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin nach Coffeingabe (30 mM) (jeweils $p < 0,0001$). Auswertung von jeweils 3 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 30$). Die Boxplots stellen den Median, den SEM und den maximalen und minimalen Wert einer Versuchsgruppe dar. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni. Signifikanzniveau $p = 0,025$, *** = $p < 0,00051$.

3.4.5 Caspofungin bewirkt eine Elevation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Blockade der IP_3 -Rezeptoren durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB)

Eine Inkubation mit dem nicht-selektiven IP_3 -Inhibitor 2-APB¹⁰¹ (40 μM) in calciumfreiem Puffer und darauffolgender Gabe von 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin führte zu einem deutlichen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über ungefähr 10 s. Innerhalb weiterer 100 s kehrte die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder zur Grundlinie zurück (Abb. 31 A). 2-APB wurde bereits 20 min vor Messstart während der Inkubationszeit von Fura-2 AM appliziert, um eine ausreichend lange Inkubationszeit von 2-APB zu gewährleisten. Somit war 2-APB zu Beginn der Messung im Puffer bereits vorhanden und wurde nicht hinzu pipettiert. In Abbildung 31 B ist der Vergleich der Zellreaktionen von Caspofungin ohne 2-APB und von Caspofungin mit 2-APB zur Kontrollgruppe dargestellt. Beide Versuchsgruppen unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) von der Kontrolle.

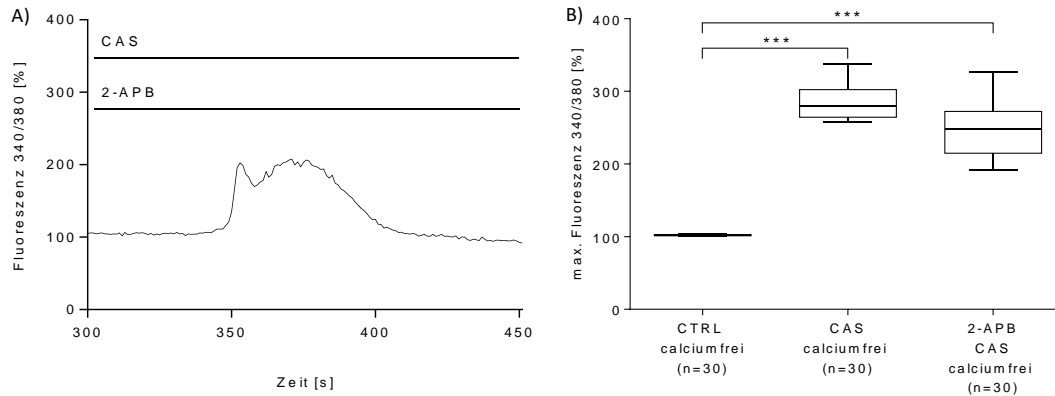


Abbildung 31: 30-minütige Inkubation mit 2-APB (40 μM) und darauffolgender Applikation von Caspofungin löste in calciumfreiem Puffer einen signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus. A) Zellreaktion nach Applikation von 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin in calciumfreiem Puffer mit 2-APB, Applikation gekennzeichnet durch die horizontalen Linien. Normierung der Fluoreszenzratio auf 100% bei $t = 0$. Die Fluoreszenz wurde in einer Bildfrequenz von 1 Hz erfasst. B) Vergleich der maximalen Fluoreszenz der Kontrolle, von 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin und 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin mit 2-APB. Signifikanter Unterschied der Fluoreszenz von 2-APB + CAS zur Kontrolle ($p < 0,0001$). Auswertung von jeweils 3 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 30$). Die Boxplots stellen den Median, den SEM und den maximalen und minimalen Wert einer Versuchsgruppe dar. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni. Signifikanzniveau $p = 0,025$, *** = $p < 0,0005$.

3.4.6 Blockade des Ryanodinrezeptors hemmt die Caspofunginreaktion

In den folgenden Versuchen wurde eine Konzentration von 40 μM Ryanodin zur Inhibierung des Ryanodinrezeptors in calciumfreiem HEPES-Puffer eingesetzt. Die Fluoreszenz blieb nach 20-minütiger Inkubation mit 40 μM Ryanodin und darauffolgender Applikation von 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin unverändert und zeigte keinen Calciumpeak (Abb. 32 A). Im Vergleich der Fluoreszenzmaxima der Versuchsgruppen (Abb. 32 B) unterscheidet sich die Versuchsgruppe Ryanodin + CAS deutlich von der Versuchsgruppe CAS.

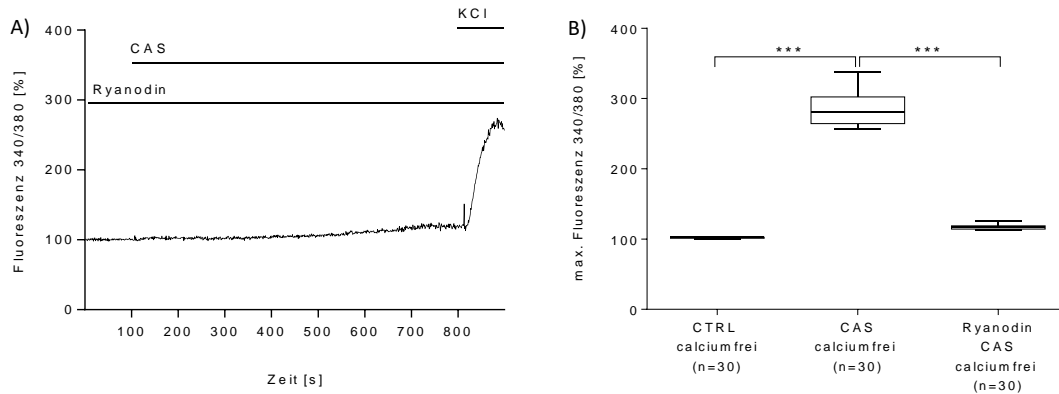


Abbildung 32: A) Nach einer 20-minütigen Inkubation mit 40 μM Ryanodin in calciumfreiem Puffer und CAS-Gabe bei $t = 100$ s blieb die Grundlinie der Fluoreszenz stabil. Die Gabe von 200 mM KCl und 2,5 mM Ca^{2+} am Versuchsende zeigte einen Anstieg der Fluoreszenz. Die horizontalen Linien kennzeichnen die Anwesenheit von Ryanodin, CAS und KCL. Normierung der Fluoreszenzratio auf 100% bei $t = 0$. Die Fluoreszenz wurde in einer Bildfrequenz von 1 Hz erfasst. B) Vergleich der maximalen Fluoreszenz der Kontrolle, von 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin und 40 μM Ryanodin + 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin. Signifikanter Unterschied der Fluoreszenz von Ryanodin + CAS zu CAS ($p < 0,0001$). Auswertung von jeweils 3 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 30$). Die Boxplots stellen den Median, den SEM und den maximalen und minimalen Wert einer Versuchsgruppe dar. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test und α -Korrektur nach Bonferroni. Signifikanzniveau $p = 0,025$, *** = $p < 0,0005$.

In folgender Abb. 33 sind die unterschiedlichen Versuchsgruppen in calciumfreiem HEPES-Puffer für den direkten Vergleich zusammenfassend dargestellt. Die Applikation von 130 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin erzeugte einen deutlichen Anstieg der Fura-2-Fluoreszenzratio im Vergleich zur Kontrollgruppe (Anstieg des MW auf 286%). Auch konnte dieser Fluoreszenzanstieg, hervorgerufen von Caspofungin, durch die Entleerung der mitochondrialen Calciumspeicher durch DNP (Anstieg des MW auf 243%) und durch die Inhibierung der IP_3 -Rezeptoren durch 2-APB (Anstieg des MW auf 247%) nicht verhindert werden. Eindeutig gehemmt wurde diese Caspofungin-induzierte Calciumreaktion durch Entleerung der Calciumspeicher des ER mittels Coffein (Anstieg des MW auf 127%) und durch Blockade des Ryanodin-Rezeptors mittels Ryanodin (Anstieg des MW auf 117%).

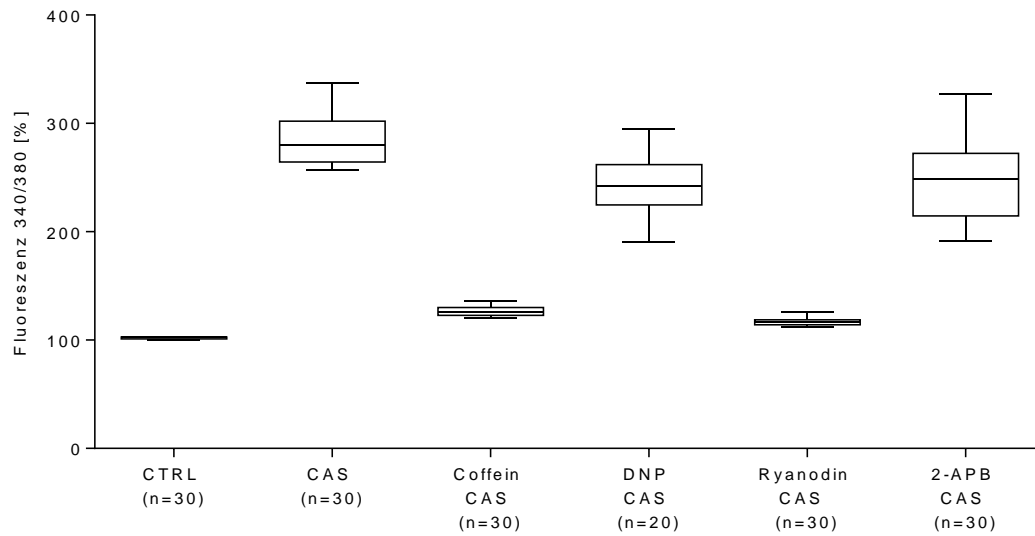


Abbildung 33: Übersicht aller Versuche in calciumfreiem HEPES-Puffer im Vergleich. Eindeutiger Fluoreszenzunterschied von CAS, Coffein + CAS, DNP + CAS und 2-APB + CAS zur Kontrolle (CTRL). Die Fluoreszenz von Coffein + CAS und Ryanodin + CAS weisen das gleiche Fluoreszenzniveau wie die Kontrolle auf. Die Boxplots stellen den Median, den SEM und den maximalen und minimalen Wert einer Versuchsgruppe dar.

3.4.7 Entleerung von ER-Ca²⁺-Speicher durch Caspofungin

Für Kontrollexperimente ruhten mit Mag-Fluo-4 AM beladene HTEpC-c Zellen entweder in Ca²⁺-haltigem Puffer, Ca²⁺-freiem Puffer oder Ca²⁺-freiem Puffer mit BAPTA-AM Zusatz (Abb. 33 A-C). In keinem dieser Pufferlösungen nahm das Mag-Fluo-4-Fluoreszenz-Signal ab, als Marker für die Calciumkonzentration im endoplasmatischen Retikulum ([Ca²⁺]_{ER}). Unter diesen Ruhebedingungen erfolgt keine signifikante Leckage von Ca²⁺-Ionen aus dem ER in das Zytosol (Abb. 34 A-C).

Die Applikation von Caspofungin (t = 100 s) führte in allen untersuchten Zellen innerhalb einer Sekunde zu einer raschen Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz. Die Reduktion der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz erholte sich rasch in der folgenden Sekunde, bevor sie anschließend innerhalb 60 s in einer langsameren und länger anhaltenden Kinetik reduziert wurde, was einer Reduktion der [Ca²⁺]_{ER} entspricht (Abb. 34 D, E, F). Die Amplitude der initialen Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz sowie das Ausmaß der prolongierten Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz waren abhängig von der Caspofunginkonzentration (Abb. 35 A, B). Eine Erholung der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz und somit ein Wiederauffüllen der ER Ca²⁺-Speicher konnte am Ende der Experimente durch Ca²⁺-haltigen Puffer (2,5 mM) und einer Depolarisierung mittels KCl-Exposition erreicht werden (Abb. 34 A-C & D, F).

Die zu Beginn der Caspofunginexposition registrierte schnelle negative Amplitude der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz verschwand komplett in allen untersuchten Zellen, wenn diese zu Beginn mit BAPTA-AM beladen wurden. In diesen Experimenten wurde nur die langsame langanhaltende Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz gemessen. Zusätzlich konnte das Wiederauffüllen der ER Ca²⁺-Speicher durch die abschließende Exposition zu KCl (200 mM) in Ca²⁺-haltigem Puffer nur sehr abgeschwächt registriert werden, was zu der Annahme führt, dass die zytosolischen Ca²⁺-Ionen unmittelbar durch BAPTA chelatiert wurden und nicht in das ER aufgenommen werden konnten (Abb 34 F). Eine komplette Entleerung der ER Ca²⁺ Speicher erfolgte durch die Applikation von Coffein (30 mM). Die ER Ca²⁺ Speicher konnten nach Auswaschen von Coffein und anschließender Exposition in Ca²⁺-haltigem Puffer (2,5 mM) und depolarisierendem KCl-Puls (200 mM) wieder aufgefüllt werden, sichtbar durch

die Zunahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz (Abb. 36 A). In mit Coffein (30 mM) vorbehandelte Zellen konnte Caspofungin keine weitere Veränderung der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz hervorrufen, weder war die initiale negative Amplitude noch die prolongierte Reduktion der Fluoreszenz messbar, die $[Ca^{2+}]_{ER}$ war durch die Coffeingabe schon maximal reduziert worden (Abb. 36 B und C).

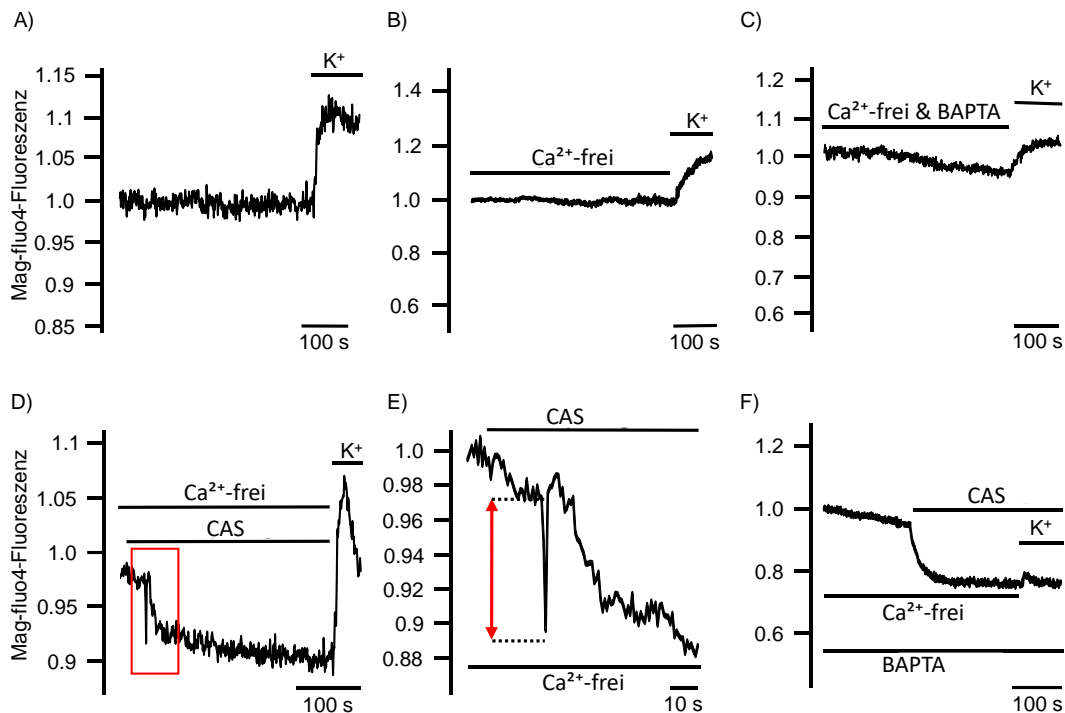


Abbildung 34: Caspofungin entleert ER Ca^{2+} -Speicher. Darstellung des Kurvenverlaufs anhand einer exemplarisch gewählten Trachealepithelzelle (Anzahl der gemessenen Zellen siehe Abb. 35). (A) Tracheale Epithelzellen, die in Ca^{2+} -haltigem HEPES-Puffer ruhen, zeigen keine Veränderung der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz. (B) Ca^{2+} -freier Puffer bewirkt auch unter langer Exposition keine Veränderung der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz. (C) Tracheale Epithelzellen, die in Ca^{2+} -freiem Puffer ruhen und mit BAPTA geladen wurden, um zytosolische Ca^{2+} -Ionen zu binden, zeigen unter Langzeitexposition (> 300 s) nur eine geringe Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz, die ER Ca^{2+} Speicher bleiben konstant gefüllt und zeigen keinen Nettoausfluss. (D) $130 \mu\text{g/ml}$ Caspofungin induziert eine schnelle Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz (roter Kasten), die sich unmittelbar wieder zurück zur Grundlinie erholt. Die prolongierte Exposition zu Caspofungin bewirkt eine langsame, andauernde Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz auf ein stabiles, niedrigeres Niveau. (E) Vergrößerter Ausschnitt der initialen schnellen negative Amplitude zeigt die schnelle Kinetik und Amplitude der initialen Antwort auf die Caspofungin-Exposition. (F) In Zellen, denen Caspofungin in Anwesenheit von BAPTA appliziert wird, verschwindet die initiale schnelle Amplitude komplett, nur die prolongierte Reduktion der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz konnte gemessen werden. Das Wiederauffüllen der ER Ca^{2+} Speicher durch Depolarisation mittels KCl hatte nur einen geringen Effekt, da BAPTA zytosolische Ca^{2+} Ionen pufferten. Die luminale ER Mag-Fluo-4-Fluoreszenz verblieb sehr niedrig (die horizontalen Balken in den Experimenten zeigen die Expositionsperioden der einzelnen Pharmaka).

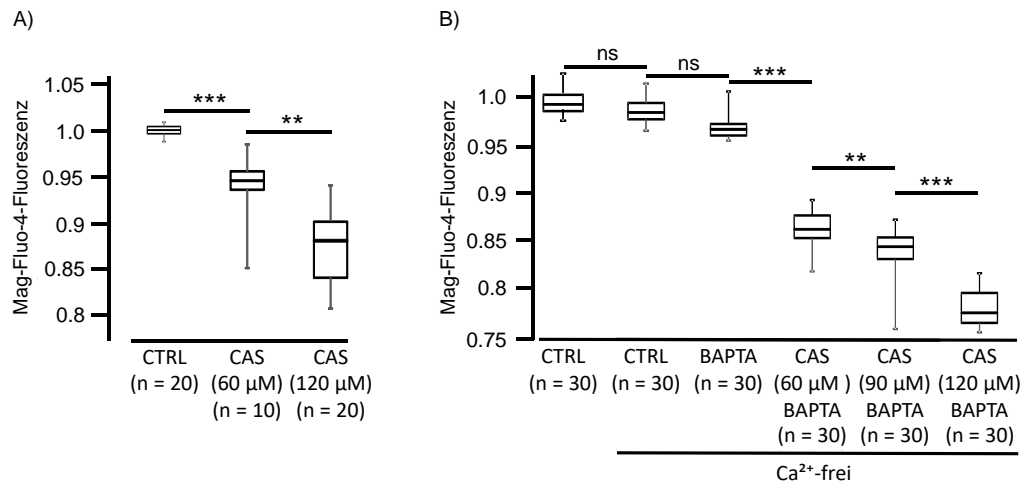


Abbildung 35: Der Effekt von Caspofungin auf die ER Ca²⁺-Speicher ist konzentrationsabhängig. (A) Caspofungin induziert eine sofortige negative Amplitude ($\Delta t = 100-102$ s) der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz als Parameter der abnehmenden [Ca²⁺]_{ER}. Die Amplituden dieser kurzlebigen Ausschläge sind konzentrationsabhängig. Niedrige Caspofunginkonzentrationen (60 μM) induzierten schon diese negativen Ausschläge der [Ca²⁺]_{ER} ($p < 0,0001$), diese waren signifikant größer unter hohen Caspofunginkonzentrationen (120 μM, $p < 0,001$). (B) Die prolongierte Entleerung der ER Ca²⁺-Speicher wurde für verschiedene Caspofunginkonzentrationen nach 60 s registriert. Unter Zusatz von BAPTA wurde ein Wiederauffüllen der ER Ca²⁺-Speicher verhindert. Die anhaltende minimalen Mag-Fluo-4-Fluoreszenz unter diesen Bedingungen zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Entleerung der Ca²⁺-Speicher. Das Ausmaß der Entleerung der Ca²⁺-Speicher war unter hohen Caspofunginkonzentrationen (120 μM) am ausgeprägtesten. CTRL-CTRL_{Ca²⁺-frei}: $p = 0,8086$, Ca²⁺-freie Versuche: CTRL-BAPTA: $p = 0,7451$, BAPTA-CAS (60 μM): $p = 0,0004951$, CAS (60 μM)-CAS (90 μM): $p = 0,003871$, CAS (90 μM)-CAS (120 μM): $p = 0,0002253$. Ausgewertete Zellen je Deckgläschen in A) CTRL: 2 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 20$), CAS 60 μM: 2 Deckgläschen à 5 Zellen ($n = 10$), CAS 120 μM: 2 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 20$), B) jeweils 3 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 30$). Die Boxplots stellen den Median, den SEM und den maximalen und minimalen Wert einer Versuchsgruppe dar. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test. ns = nicht signifikant, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

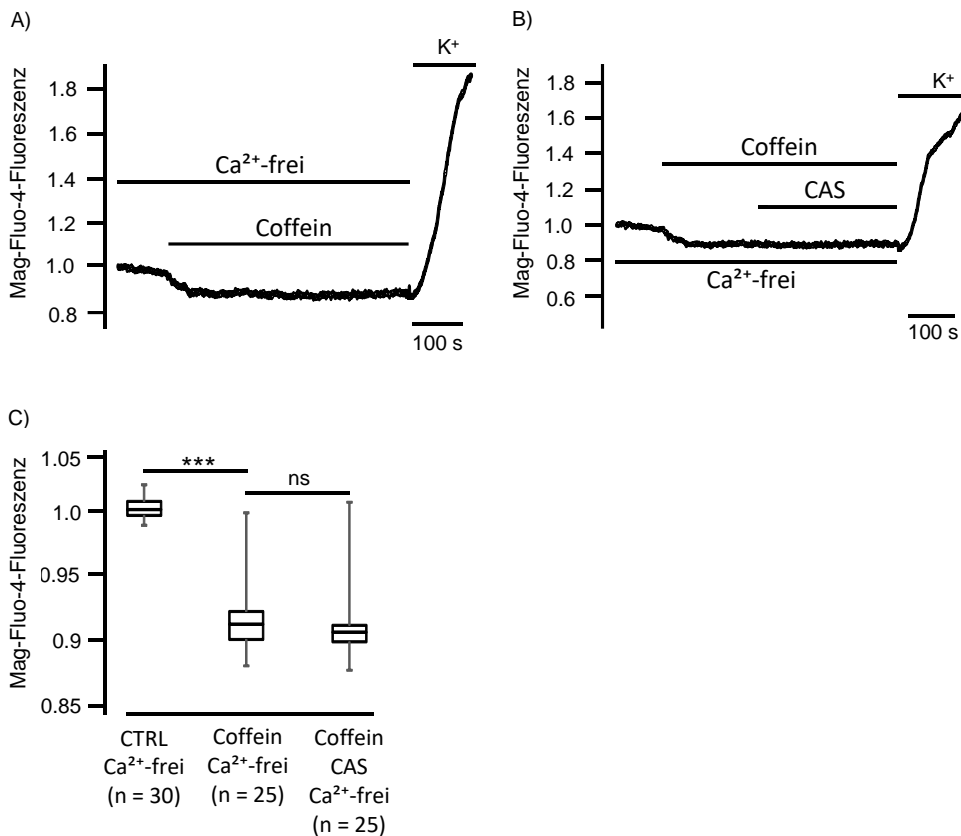


Abbildung 36: Caspofungin entleert Coffein-sensitive Ca^{2+} -Speicher. (A) In Ca^{2+} -freier Pufferlösung bewirkt die Applikation von Coffein (30 mM) eine frühe und langandauernde Reduktion der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz. Die ER Ca^{2+} -Speicher wurden anschließend über einen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom mittels eines KCl-Impulses (200 mM) wieder aufgefüllt. Diese Versuche zeigen, dass ER Ca^{2+} -Speicher und Coffein-sensitive Ca^{2+} -Speicher identisch sind. (B) Coffein-Exposition induziert eine Entleerung der ER- Ca^{2+} -Speicher, bevor Caspofungin hinzugegeben wird. Die anschließende Caspofunginapplikation konnte keine weitere Reduktion der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz induzieren. Dies zeigt, dass die ER Ca^{2+} -Speicher schon durch Coffein entleert wurden. (C) Die Zugabe von Coffein (30 mM) zu den Trachealzellen bewirkte eine signifikante Reduktion der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz ($p = 0,00021$), dies weist darauf hin, dass die ER Ca^{2+} -Speicher entleert sind. Die nachfolgende Verabreichung von Caspofungin veränderte nicht mehr die Mag-Fluo-4-Fluoreszenz ($p = 0,9924$). In Abbildung A) und B) wurde der Kurvenverlauf einer Zelle exemplarisch dargestellt. Die entsprechende statistische Auswertung und die Anzahl der Zellen pro Versuchsgruppe finden sich in C). Ausgewertete Zellen je Deckgläschen in C) CTRL Ca^{2+} -frei: 3 Deckgläschen à 10 Zellen ($n = 30$), Coffein Ca^{2+} -frei: 3 Deckgläschen à 10,10 und 5 Zellen ($n = 25$), Coffein CAS Ca^{2+} -frei: 3 Deckgläschen à 10,10 und 5 Zellen ($n = 25$). Die Boxplots stellen den Median, den SEM und den maximalen und minimalen Wert einer Versuchsgruppe dar. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U Test. ns = nicht signifikant, *** = $p < 0,001$.

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Caspofungin die PTG der murinen Trachea steigert und in kultivierten humanen Trachealepithelzellen zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt, welche durch Entleerung der Coffein-sensitiven Calciumspeicher hervorgerufen wurde und durch Ryanodin geblockt werden konnte. Im folgenden Abschnitt werden die Versuchsergebnisse im Einzelnen diskutiert.

4.1 Caspofungin stimuliert die PTG

Durch Applikation von 10, 50 oder 100 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin zeichnete sich ein von der Konzentration abhängiger Anstieg der PTG ab. Nach Applikation von 10 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin blieb der initiale Anstieg der PTG aus, jedoch war ein moderater, nicht-signifikanter Anstieg gegen Ende der Beobachtungszeit zu erkennen. Die Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin befindet sich bereits im Bereich der maximalen Plasma-konzentration C_{MAX} , welche durchschnittlich bei Patienten in verschiedenen Studien¹⁰² gemessen wurde. Bei Applikation von 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin wurde ein signifikanter Anstieg der PTG erzeugt, welcher jedoch bei der Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin nicht aufrechterhalten werden konnte. Die PTG konnte auch nicht mehr durch ATP als Vitalitätsnachweis stimuliert werden, was stark darauf hindeutet, dass das tracheale Flimmerepithel in dieser hohen Konzentration geschädigt wurde und diese Konzentration bereits im toxischen Bereich liegt. In der Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin konnte ein signifikanter PTG-Anstieg nach Applikation sowie ein positiver Vitalitätsnachweis am Versuchsende durch ATP erzielt werden. Somit wurde diese Konzentration als Standarddosis in weiteren Versuchen und zur Untersuchung des Effekts auf die PTG bei den anderen Echinocandinen Micafungin und Anidulafungin verwendet.

50 $\mu\text{g/ml}$ Micafungin und Anidulafungin riefen ebenfalls einen signifikanten Anstieg der PTG hervor. Alle Vitalitätsproben der verschiedenen Versuchsgruppen in der getesteten Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ verliefen positiv. In den weiteren Experimenten wurde zur detaillierten Untersuchung der PTG-

Stimulation Caspofungin verwendet, um erstens die Anzahl der Organentnahmen und der Versuche zu begrenzen. Zweitens wurde Caspofungin gewählt, weil Caspofungin als erster Vertreter der Echinocandine und als Antimykotikum der ersten Wahl bei invasiven Mykosen derzeit am häufigsten in der Intensivmedizin eingesetzt wird.^{103–106}

Die Untersuchung des zugrunde liegenden Mechanismus der PTG-Erhöhung durch Caspofungin erfolgte zunächst durch Applikation von Inhibitoren der Hauptsignalwege von Trachealepithelzellen. So wurden die intrazellulären Schlüsselproteine wie die Proteinkinase A zur Bildung von cAMP und die lösliche Guanylatzyklase zur Bildung von cGMP geblockt, jedoch auch membrangebundene Rezeptoren wie P₂Y₂-Rezeptoren, Acetylcholinrezeptoren, β₂-Rezeptoren und Serotonin-Rezeptoren.

Nach Inhibition der PKA durch H-89 konnte die PTG durch 50 µg/ml Caspofungin dennoch stimuliert werden. Somit kann die Stimulation der PKA durch Caspofungin für die initiale PTG-Beschleunigung ausgeschlossen werden. Die Inhibierung von membranständigen Rezeptoren wie den Serotonin-Rezeptoren, dem P₂Y₂-Rezeptor, muskarinergen ACh-Rezeptor und dem adrenergen β₂-Rezeptor erbrachte die gleiche initiale Stimulation nach Applikation von Caspofungin. So kann eine Aktivierung der G-Protein-gekoppelten, membranständigen Rezeptoren ausgeschlossen werden. Auch die Inhibition der intrazellulären sGC, welche für die Bildung von cGMP und letztlich für die Aktivierung der PKG verantwortlich ist, konnte den caspofungininduzierten PTG-Anstieg nicht verhindern. Da die PKA, die PKG und Calcium direkten Einfluss auf die Zilienstimulation haben, verstärkte sich anhand der bisherigen Ergebnisse die Vermutung, dass der durch Caspofungin erhöhten PTG eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration [Ca²⁺]_i durch Freisetzung oder Einstrom von Calcium zu Grunde liegt.

In den folgenden Versuchen wurden somit Tracheen in calciumfreiem HEPES-Puffer untersucht, um einen durch Caspofungin hervorgerufenen Calciumeinstrom von extrazellulär auszuschließen. Um das Calcium extrazellulär vollständig abzufangen, wurde EGTA dem Puffer hinzugefügt. Zunächst konnte man anhand der absoluten, nicht normierten PTG der calciumfreien Kontrollen erkennen, dass die basale PTG in calciumfreiem Puffer etwas langsamer als in

calciumhaltigem Puffer war. Dies war zu erwarten, da Calcium intrazellulär eine direkte stimulierende Wirkung am Kinozilium besitzt^{35,61}. Eine Reduktion des intrazellulären Calciums, wahrscheinlich durch Leck-Ströme oder in Ruhe geöffnete Ionenkanäle, bzw. erhöhtem Effluxmechanismus über die Zellmembran, führte folglich zu einer verringerten PTG. Die PTG der calciumfreien Kontrollen blieb jedoch auf geringerem Niveau über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil. In calciumfreiem und calciumhaltigem Milieu konnte die Vitalität des Flimmerepithels durch ATP-Gabe für beide Versuchsgruppen in gleichem Ausmaß nachgewiesen werden.

Caspofungin in calciumfreiem Puffer, versetzt mit EGTA, steigerte initial die PTG wie auch in calciumhaltigem Milieu. Jedoch begann nach der initialen Beschleunigung die PTG schneller abzufallen als in calciumhaltigem Puffer. Eine Möglichkeit, den stärkeren PTG-Abfall zu erklären, wäre das extrazellulär calciumfreie Milieu, wodurch Calciumionen aufgrund des Konzentrationsgradienten über die Zellmembran nach außen strömen oder durch membranständige Calciumpumpen und Natrium-Calcium-Austauscher nach extrazellulär gepumpt werden und nicht mehr intrazellulär zur Zilienstimulation zur Verfügung stehen.¹⁰⁷ Eine weitere Erklärung wäre die Aktivierung von STIM1 (stromal interaction molecule 1), hervorgerufen durch den intraluminal sinkenden Calciumspiegel nach Entleerung des ER durch Caspofungin. Folglich aktiviert STIM1 seinen zellmembranständigen Partner ORAI1 als Calciumkanal, welcher daraufhin für Calciumionen durchlässig wird. Dieser Calciumeinstrom von extrazellulär durch ORAI1 wäre hier in calciumfreiem Milieu nicht möglich und die schnell abfallende PTG nach initialer Beschleunigung mit fehlender Plateauphase somit erklärbar. Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen erkennen, dass die PTG-Beschleunigung durch Caspofungin über Calcium vermittelt und Calcium aus intrazellulären Calciumspeichern freigesetzt wird. Membranständige Calciumkanäle sind am initialen Anstieg der PTG nicht beteiligt, jedoch bedeutend für die Aufrechterhaltung der PTG-Stimulation.

Bei Zugabe von Caspofungin in calciumfreiem Puffer, versetzt mit EGTA und BAPTA-AM als zusätzlich intrazellulärem Calciumchelator, bewirkte Caspofungin zwar auch einen initialen Anstieg der PTG, daraufhin jedoch schloss sich unmittelbar ein sehr steiler, linearer Abfall an, sodass die PTG noch vor

Versuchsende zum Erliegen kam. Eine Zilienaktivität konnte nicht mehr induziert werden. Dies bestärkt die Annahme, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei der Signalvermittlung zur Steigerung der PTG eine essentielle Rolle spielt. Der initiale Anstieg, der stets immer noch zu verzeichnen war, beruht wahrscheinlich darauf, dass BAPTA-AM nicht in der Lage war, die Menge des freigesetzten Calciums sofort abzufangen. Dies gelang erst verzögert, was den schnelleren und steileren Abfall der PTG erklärt. Wurde das intrazelluläre Calcium nach einer gewissen Latenz von BAPTA-AM nun abgefangen, konnte der Zilienschlag nicht mehr durchgeführt werden und die PTG kam vollständig zum Erliegen. Anhand dieser Ergebnisse wurde gezeigt, dass Calcium eine essenzielle Rolle in der caspofunginvermittelten PTG-Stimulation spielt. Der Fokus wurde nun auf die intrazellulären Calciumspeicher gelenkt.

Die Entleerung der Calciumspeicher des ER erfolgte in einer weiteren Versuchsgruppe durch 30 mM Coffein, welches bereits zu Beginn der PTG-Messung dem Puffer mit EGTA und BAPTA-AM beigefügt war. Während des Beobachtungszeitraums hielt die PTG unter Coffein-Einfluss ohne Caspofungin-Applikation ein konstantes Niveau ein und es konnte nur ein minimal negativer Effekt auf die PTG festgestellt werden. Die PTG nahm kontinuierlich über den gesamten Beobachtungszeitraum geringfügig ab. In der Versuchsgruppe unter Einfluss von Coffein mit Applikation von Caspofungin bei $t = 60$ min blieb der initiale PTG-Anstieg aus und es zeichnete sich direkt ein deutlicher Abfall der PTG nach Caspofungin-Gabe ab. Dieser lineare Abfall ohne PTG-Spitze in der Versuchsgruppe „Coffein + Caspofungin“ deutet darauf hin, dass Caspofungin die Freisetzung von Calcium aus den gleichen intrazellulären Speichern hervorruft wie Coffein. So ergibt sich die Annahme, dass zum Zeitpunkt der Caspofungin-Gabe die Calciumspeicher bereits durch Coffein größtenteils entleert wurden und hier BAPTA-AM durch die frühzeitige Applikation von Coffein auch ausreichend Zeit hatte, das freigesetzte Calcium abzufangen. Die Entleerung des ER wurde durch die Caspofungin-Gabe zusätzlich aggraviert, sodass die PTG schneller zum Erliegen kam als durch Coffein alleine.

4.2 Caspofungin bewirkt eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern

Um die Wirkung der Echinocandine auf die intrazelluläre Calciumhomöostase auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen erfolgten fluoreszenzoptisch Calciummessungen humaner Trachealepithelzellen.

Die Verwendung von isolierten Trachealepithelzellen gewährleistete die anzahlkontrollierte Aussaat der Zellen auf Deckgläschen und somit konstante Versuchsbedingungen. Bei erhaltenen intrazellulären Stoffwechselprozessen und Membranrezeptoren weist diese Zelllinie jedoch aufgrund der Isolierung aus dem Zellverband und Kultivierung im Nährmedium außerhalb des Organismus keine Kinozilien mehr auf.

Die mit Fura-2 AM angefärbten HTE-Zellen zeigten unter Ruhebedingungen eine stabile intrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$, welche durch ein konstantes Fluoreszenzniveau repräsentiert wurde.

Die Applikation von 50 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin löste nicht bei allen Zellen eine Reaktion aus. Aus diesem Grund musste die Konzentration auf 65 $\mu\text{g/ml}$ gesteigert werden, um nach Caspofunginapplikation eine zuverlässige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ herbeizuführen, um konstante Versuchsbedingungen für die Untersuchung der intrazellulären Signalkaskaden zu schaffen. Die reduzierte Sensibilität gegenüber Caspofungin lässt sich mit der Verwendung von isolierten Kulturzellen erklären, welche wahrscheinlich eine trägere Stoffwechselaktivität im Vergleich zu frisch entnommenen Flimmerepithelzellen im Zellverband aufweisen. Die unterschiedlichen Zeitspannen zwischen Applikation von Caspofungin bis zur Zellreaktion wurden als Variationen zwischen den Deckgläschen und Zellpassagen betrachtet.

Wurden nun 65 $\mu\text{g/ml}$ Caspofungin appliziert, konnte stets ein schneller Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen werden. Dieser Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ war von transienter Kinetik und die Fluoreszenzratio kehrte nach ungefähr 100 s wieder auf das Niveau der Grundlinie zurück. Somit wurde die Vermutung bestätigt, dass Caspofungin in Trachealepithelzellen zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt und Ca^{2+} auf diesem Weg als sekundärer Botenstoff zur Modulation der Zilienfunktion wirken kann. Des Weiteren wurde untersucht, ob nun tatsächlich intrazelluläre

Calciumspeicher durch Caspofungin entleert werden oder ob auch spannungsabhängige Calciumkanäle der Zellmembran eine Rolle spielen und Ca^{2+} von extrazellulär in die Zelle eindringt. Aus diesem Grund wurden nun zunächst in calciumhaltigem Puffer spannungsabhängige Calciumkanäle durch NiCl_2 geblockt, um zu überprüfen, ob Caspofungin dennoch eine Zellreaktion hervorruft. Dies konnte bestätigt werden, da nach Caspofungin-Gabe in Anwesenheit von NiCl_2 ebenfalls die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anstieg.

In calciumfreiem Puffer konnten zwei unterschiedliche Verläufe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung nach Caspofungin-Gabe beobachtet werden. Der Anstieg war stets schnell und steil, jedoch unterschied sich der Verlauf im Anschluss nach Erreichen der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung zwischen den Zellen. Bei einem Teil der Zellen zeigte sich nach Erreichen des Maximums der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ein schneller Abfall auf das Niveau der Grundlinien, welchem sich dann ein erneuter, langsamerer, kleinerer Anstieg und Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anschloss. Bei anderen Zellen zeigte sich nach Erreichen der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ein prolongierter monophasischer Abfall auf das Niveau der Grundlinien ohne einen isolierten zweiten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Die Grundlinie der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in beiden beobachteten Verläufen nach ungefähr 100 s wieder erreicht. Da die Reaktionszeit der unterschiedlichen Zellreaktionen in etwa gleich lange dauert, ist es naheliegend, dass die Zellreaktion am ehesten biphasisch ist und der zweite Calciumanstieg je nach individueller Sensibilität der Zellen von dem ersten ausgeprägten Calciumanstieg überlagert wird und man diese Calciumströme nicht immer scharf voneinander abgrenzen kann.

Die Untersuchungen von DNP und Caspofungin zeigten, dass die Mitochondrien als intrazelluläre Calciumspeicher in den Trachealepithelzellen durch Caspofungin nicht entleert werden. Die Entkopplung der Atmungskette durch DNP und die konsekutive Entleerung der mitochondrialen Calciumspeicher zeigte einen transienten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die darauffolgende Applikation von Caspofungin bewirkte dennoch eine Zellreaktion, welche die Beteiligung von Mitochondrien als Caspofungin-empfindliche Calciumspeicher ausschließt.

Nachdem die Beteiligung extrazellulärer und mitochondrialer Calciumquellen untersucht wurde und die Verantwortlichkeit derer für den hauptsächlichen Effekt von Caspofungin ausgeschlossen werden konnte, erfolgte die Fokussierung auf

die coffeinsensitiven ER-Calciumspeicher. Die Entleerung des ER durch Coffein zeichnete sich im Versuch durch einen kurzen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in geringer Ausprägung ab. Ein ausgeprägter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ konnte jedoch nicht abgebildet werden, da diese Reaktion vermutlich sehr schnell ablief und durch die eingestellte Bildfrequenz nicht aufgezeichnet wurde. Die darauffolgende Caspofungin-Applikation erzeugte keine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit ausgeprägter Kinetik. Es zeichnete sich jedoch eine kurze Fluoreszenzspitze geringer Ausprägung ab, welche jedoch innerhalb von ein bis zwei Sekunden wieder die Grundlinie erreichte. Da nun kein direkter steiler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte, bleibt der Verdacht, dass hier ein Artefakt durch das Zupipettieren von Caspofungin entstanden ist. Sicherlich ist nicht vollständig auszuschließen, dass ebenfalls eine Zellreaktion von sehr kurzer Dauer wie bei Coffein stattfand und durch die Einstellung der Kamera nicht aufgezeichnet wurde. Dennoch konnte der Effekt von Caspofungin in gewohnter Kinetik bei vorausgehender Entleerung des ER nicht ausgelöst werden. Es zeigte sich lediglich ein minimaler, prolongierter Anstieg der Fluoreszenz über ungefähr 250 s mit deutlich geringerer Effektstärke. Dieser Anstieg lässt vermuten, dass Coffein hier nicht zur vollständigen Entleerung des ER geführt hat und Caspofungin die Freisetzung der restlichen Calciumbestände im ER bewirkte. Diese deutliche Effektminderung deutet jedoch stark darauf hin, dass Caspofungin die Calciumspeicher des ER angreift. Um zu überprüfen, welche Calciumkanäle des ER Caspofungin-empfindlich sind, wurden diese inhibiert und daraufhin Caspofungin ausgesetzt.

Durch 2-APB wurde der IP_3 -Rezeptor am ER geblockt, jedoch zeigte Caspofungin den bekannten Effekt, der mit einem schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ einherging und einen biphasischen Verlauf von ungefähr 100 s aufwies. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass 2-APB jedoch auch weitere modulatorische Eigenschaften an TRPV4-Kanälen und an ORAI1 aufweist^{101,108}. Um spezifischer den IP_3 -Rezeptor zu blockieren, erscheint Xestospongin C in zukünftigen Versuchen geeigneter. Da die Versuche jedoch in calciumfreier Lösung durchgeführt wurden, kann man den Effekt von 2-APB auf die membranständigen Rezeptoren vernachlässigen.

In einer weiteren Versuchsgruppe mit Blockade des Ryanodin-Rezeptors durch Ryanodin zeigte sich nach Caspofungin-Gabe erstmals keine erkennbare

Abweichung der Fluoreszenz von der Grundlinie. In bisherigen Studien wurde der Ryanodin-Rezeptor in Trachealepithelzellen nicht umfassend untersucht. Deshalb sind weitere Experimente und Studien notwendig, um das Vorkommen des Ryanodin-Rezeptors in Trachealepithelzellen genauer zu bestimmen. Diese Auslöschung der Caspofungin-Reaktion nach höher dosierter Gabe von Ryanodin (40 μM) in Zusammenhang mit den vorausgegangenen Experimenten zeigt jedoch, dass Caspofungin über den Ryanodin-Rezeptor Calcium aus dem ER freisetzt.

Die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER nach Caspofungin-Gabe wurde auch in den Kontrollversuchen unter Verwendung von Mag-Fluo-4 AM, einem synthetischen Calciumindikator für die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$.^{109,110} beobachtet. Die Applikation von Caspofungin bewirkte in mit Mag-Fluo-4 beladenen HTE-Zellen eine Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz, was einer Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ entspricht. Die Caspofungin-Gabe nach kompletter Entleerung der Speicher durch Coffein führte zu keiner weiteren Abnahme der Mag-Fluo-4-Fluoreszenz. In Zusammenschau dessen bestärken diese Ergebnisse ebenfalls die Annahme, dass Caspofungin eine Entleerung von Calcium-Ionen aus dem ER bewirkt.

Zur weiteren Diskussion steht die Notwendigkeit, die Caspofungin-Konzentration in calciumfreiem Puffer grundsätzlich verdoppeln zu müssen, um einen stetigen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auszulösen. Diese Tatsache bestärkt die Annahme, dass eine intrazelluläre Calciumfreisetzung, initiiert durch Caspofungin, zur Öffnung weiterer membrangebundener Calciumkanäle führt und in calciumhaltigem Puffer deshalb die Sensibilität gegenüber Caspofungin erhöht ist. So vermittelt möglicherweise der intraluminale Calciumsensor STIM1 und sein membranständiger Partner ORAI1, ein ligandengesteuerter Calciumkanal, einen Calciumeinstrom von extrazellulär. Dieser Mechanismus wird als „Store Operated Calcium Entry“ (SOCE) bezeichnet und sollte in Bezug auf Caspofungin in weiteren experimentellen Studien untersucht werden.

Insgesamt stehen diese Ergebnisse im Einklang mit einer weiteren Studie, in denen die Wirkung von Caspofungin auf humane Kardiomyozyten untersucht wurde¹³. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Caspofungin über den gleichen Mechanismus einen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumhomöostase in Trachealepithelzellen ausübt und die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Caspofungin

verantwortlich für die Stimulation der PTG im murinen Flimmerepithel ist. Ob diese erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ von Caspofungin in einem längeren Zeitraum zu einer Dekompensation der Calciumhomöostase führt, muss weiterhin geprüft werden. Des Weiteren sollte die Wirkung von Caspofungin auf frisch isolierte, humane, zilienträgenden Flimmerepithelzellen aus bronchoskopischen Proben verifiziert werden. Im Hinblick auf die Klinik sollte geklärt werden, ob Echinocandine einen Benefit auf die mukoziliäre Clearance des Menschen haben und ob kritisch kranke Patienten der Intensivmedizin, welche Echinocandine zur Behandlung invasiver Mykosen erhalten, auch respiratorisch von der antifungalen Therapie profitieren. Ebenfalls könnten weitere bisher unbekannte Effekte auf andere Organsysteme stattfinden, welche bisher noch nicht aufgezeigt wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass Echinocandine bisher unbekannte Auswirkungen auf das respiratorische Flimmerepithel haben, und geben Anlass, diese Effekte vor allem im klinischen Kontext in weiteren Studien zu untersuchen.

4.3 Limitationen der Arbeit

Zu den erhobenen Daten sind wie folgt einige Punkte kritisch zu betrachten. Bei den Messungen der PTG wurde stets Referenz zu dem gleichen Datensatz einer Kontrollgruppe genommen. Grundlegend müsste pro Versuchsgruppe eine Kontrollgruppe der gleichen Anzahl durchgeführt werden. Auf dieses Vorgehen wurde bei äußerst stabilen Versuchsbedingungen bewusst verzichtet und eine gewisse Einschränkung der statistischen Aussagefähigkeit in Kauf genommen, da pro Versuch eine Tiertötung durchgeführt werden musste und so die Anzahl der Tiertötungen deutlich begrenzt werden konnte.

Ebenso wurde zur Begrenzung der Tiertötungen auf die erneute Untersuchung des Eigeneffekts von DMSO verzichtet, da dies bereits in der Promotion von Claudio Marquardt aus Würzburg 2015 mit dem Titel „Funktionsuntersuchung von Temperatur auf den ziliären Transport in der Trachea von Mäusen“ in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt wurde. Dort zeigte sich ab einer Konzentration von > 10 mM DMSO ein PTG-hemmender Effekt, weshalb in dieser Arbeit darauf geachtet wurde, dass die Konzentration im Kulturschälchen maximal 1 mM DMSO betrug.

Des Weiteren wurde H-89 nicht in der vollen Versuchsdauer untersucht, sondern es wurde stets nach 30 min CAS hinzu pipettiert. Der Zeitraum von 30 min war in der praktischen Versuchsdurchführung nicht verlängerbar, da durch den ausgeprägten PTG-hemmenden Effekt von H-89 die Partikel auf dem Trachealepithel mit zunehmender Versuchsdauer zur Verklumpung neigten und eine valide Auswertung der einzelnen Partikel somit unmöglich wurde.

Nachdem die PTG-steigernde Wirkung der Echinocandine und der Einfluss von H-89 untersucht wurde, habe ich Experimentalreihen zur Untersuchung der Signalkaskade der zahlreichen membrangebundenen Rezeptoren begonnen. Da bei den einzelnen Pilotexperimenten frühzeitig erkennbar war, dass diese nicht zielführend waren, wurde in einigen Versuchsreihen die Anzahl bei $n = 1$ belassen. Dennoch ist es in Zusammenschau der Ergebnisse wichtig, auch diese Versuchsdurchführungen darzustellen, obwohl sie nicht in einer statistischen Auswertung verwendet werden können.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit, in welchem die fluoreszenzoptischen Calciummessungen durchgeführt wurden, erfolgte in der Regel die Auswertung von 10 Zellen aus drei unterschiedlichen Deckgläschen. Dennoch gab es aufgrund fehlender Vitalitätsnachweise einiger Zellen in den Versuchsgruppen von DNP und Mag-Fluo-4 eine abweichende Anzahl von Zellen und Deckgläschen, welche in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. Auf diese Abweichungen wurde in den entsprechenden Legenden hingewiesen und muss als eine Limitation der Aussagekraft in diesen Versuchsgruppen angesehen werden. Rückblickend und in Zusammenschau aller fluoreszenzoptischer Untersuchungen wäre eine Anzahl von 5 Zellen pro Deckgläschen und die Untersuchung von 6 Deckgläschen pro Versuchsgruppe im Hinblick auf Praxis und Statistik für weitere Untersuchungen angemessen.

4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Echinocandinen und im Besonderen von Caspofungin auf das Trachealepithel untersucht. Zunächst konnte ich bei den Untersuchungen des murinen Flimmerepithels der Trachea feststellen, dass alle drei in der Klinik angewandten Echinocandine Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin die PTG beschleunigen. In den weiteren Versuchen wurde der Einsatz der Echinocandine auf Caspofungin begrenzt. Eine Caspofungin-Konzentration von 50 µg/ml löste eine signifikante Beschleunigung der PTG aus.

Zwar liegt bei Caspofungin die maximale Plasmakonzentration C_{MAX} beim Menschen durchschnittlich etwas geringer bei ungefähr 10 µg/ml, die Konzentration in den Organen kann jedoch höher liegen, da die Verteilung im Körper von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel der Proteinbindung, abhängt. Betrachtet man die begrenzte Versuchsdauer, so könnten in vivo auch geringere Konzentrationen von Caspofungin längerfristig zu einer signifikanten Beschleunigung der PTG führen, da in den Versuchen die PTG nach Applikation von 10 µg/ml Caspofungin einen moderaten Anstieg bis zum Ende der Versuchszeit aufzeigte, welcher hier sein Maximum noch nicht erreicht hatte. Somit liegen die hier in den Experimenten verwendeten Konzentrationen durchaus im klinisch relevanten Bereich.

Des Weiteren wurde bei genaueren Untersuchungen der PTG festgestellt, dass Caspofungin über Calcium seine PTG-stimulierende Wirkung entfaltet, weshalb die Methode der fluoreszenzoptischen Calciummessung in HTE-Zellen hinzugezogen wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass Caspofungin über den Ryanodin-Rezeptor Calcium aus dem ER freisetzt. In zukünftigen experimentellen Untersuchungen sollten zilientragende, humane Trachealepithelzellen aus bronchoskopischen Untersuchungen frisch gewonnen und anschließend die Zilientätigkeit sowie die Calciumhomöostase in Abhängigkeit von Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin gemessen werden. Ein direkter Nachweis des Ryanodin-Rezeptors in trachealen Flimmerepithelzellen ist ebenfalls noch ausstehend.

Zusätzlich sollten klinische Studien klären, ob aufgrund der experimentell beobachteten Stimulation der Zilientätigkeit durch Echinocandine die klinische

Anwendung von Echinocandinen bei Patienten der Intensivmedizin eine Veränderung oder gar eine Verbesserung der respiratorischen Situation bewirkt.

5 Zusammenfassung

Echinocandine haben sich als neue Behandlungsstrategie zur Therapie invasiver Mykosen bei kritisch kranken Patienten etabliert. Insbesondere bei diesem Patientenkollektiv spielt die mukoziliäre Clearance der Lunge zur Verhinderung pulmonaler Infekte eine zentrale Rolle. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Echinocandine auf das Trachealepithel untersucht.

Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin stimulieren die Partikeltransportgeschwindigkeit des murinen Flimmerepithels in einer Konzentration von 50 µg/ml. Die weitere Untersuchung von Caspofungin als Hauptvertreter der Echinocandine zeigte eine calciumabhängige Stimulation der PTG. Der intrazelluläre Calciumanstieg, welcher durch Caspofungin hervorgerufen wurde, wurde aus intrazellulären Calciumspeichern generiert. Dies konnte durch Experimente in calciumfreiem Puffer, versetzt mit dem Calciumchelator EGTA, bei murinen Tracheen sowie bei kultivierten HTE-Zellen gezeigt werden. Speziellere Untersuchungen der HTE-Zellen ergaben, dass Caspofungin über Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors Calcium aus intrazellulären coffeinsensitiven Calciumspeichern, dem ER, freisetzt.

Caspofungin bewirkt eine Calciumliberation aus dem ER über Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors und stimuliert auf diesem Weg die Dynein-Mikrotubuli-Interaktion der Kinozilien, die folglich ihre Zilienschlagfrequenz erhöhen und so die mukoziliäre Clearance der Trachea steigern. Aus der eingeschränkten, dennoch vorhandenen Reaktionsfreudigkeit auf Caspofungin in calciumfreiem Puffer ergibt sich die Annahme, dass die Freisetzung von Calcium aus dem ER durch Caspofungin einen zusätzlichen calciumgetriggerten Calciumeinstrom, vermutlich über STIM1 und ORAI1, in calciumhaltigem Puffer bewirkt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Echinocandine neben ihrer antimykotischen Eigenschaft die mukoziliäre Clearance der unteren Atemwege steigern und so protektiv gegen Infektionen der Lunge wirken.

6 Summary

The echinocandines represent a new group of antifungals for the treatment against invasive fungal infections in critically ill patients. Particularly for these patients the mucociliary clearance plays a crucial role in avoiding pulmonary infections. Hence, it is of important interest how echinocandines affect the tracheal epithelium and its mucociliary clearance.

Caspofungin, micafungin and anidulafungin accelerate the particle transport velocity of the murine ciliated tracheal epithelium in a concentration of 50 µg/ml. Further investigations of caspofungin, the major representative of the echinocandines, showed a calcium-dependent stimulation of the epithelium, which is generated by calcium liberation from intracellular calcium stores. Experiments in calcium free, EGTA containing buffer solutions with murine trachea and cultivated human tracheal epithelial cells underline these findings. Further, caffeine and ryanodine blocked the effect of caspofungin.

These results provide strong evidence that caspofungin liberates calcium from the endoplasmic reticulum via activating ryanodine receptors and stimulates subsequently the dynein-microtubuli-interaction of the kinocilium, which leads to an increased ciliary beat frequency and an improved mucociliary clearance. A decreased reactivity of the epithelial cells in calcium free buffer solution after application of caspofungin implicates a certain dependency from extracellular calcium. These findings lead to the assumption that after liberating calcium from the ER by caspofungin, a subsequent store-operated calcium entry, presumably via STIM1 and ORAI1, plays also an important role to reinforce the effect of caspofungin in calcium containing buffer solution. The present work shows that echinocandins, in addition to their antifungal properties, increase the mucociliary clearance of the lower airways and thus have a protective effect against lung infections.

7 References

1. Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine* **369**, 840–851; 10.1056/NEJMra1208623 (2013).
2. Roux, D. *et al.* Airway fungal colonization compromises the immune system allowing bacterial pneumonia to prevail. *Critical Care Medicine* **41**, e191-9; 10.1097/CCM.0b013e31828a25d6 (2013).
3. Ostrosky-Zeichner, L. & Al-Obaidi, M. Invasive Fungal Infections in the Intensive Care Unit. *Infectious Disease Clinics of North America* **31**, 475–487; 10.1016/j.idc.2017.05.005 (2017).
4. Epelbaum, O. & Chasan, R. Candidemia in the Intensive Care Unit. *Clinics in Chest Medicine* **38**, 493–509; 10.1016/j.ccm.2017.04.010 (2017).
5. Chen, K. *et al.* Empiric treatment against invasive fungal diseases in febrile neutropenic patients: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* **17**, 159; 10.1186/s12879-017-2263-6 (2017).
6. Sucher, A. J., Chahine, E. B. & Balcer, H. E. Echinocandins: the newest class of antifungals. *The Annals of Pharmacotherapy* **43**, 1647–1657; 10.1345/aph.1M237 (2009).
7. Bellmann, R. & Smuszkiwicz, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. *Infection* **45**, 737–779; 10.1007/s15010-017-1042-z (2017).
8. Walsh, T. J. *et al.* Intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of micafungin in adult lung transplant patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 3451–3459; 10.1128/AAC.01647-09 (2010).
9. Holt, S. L. & Drew, R. H. Echinocandins: addressing outstanding questions surrounding treatment of invasive fungal infections. *American Journal of Health-System Pharmacy : AJHP : Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists* **68**, 1207–1220; 10.2146/ajhp100456 (2011).

10. Arens, C. *et al.* Effects of echinocandin preparations on adult rat ventricular cardiomyocytes. Preliminary results of an in vitro study. *Der Anaesthetist* **63**, 129–134; 10.1007/s00101-014-2289-8 (2014).
11. Koch, C. *et al.* Cardiac effects of echinocandins after central venous administration in adult rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, 1612–1619; 10.1128/AAC.04446-14 (2015).
12. Koch, C. *et al.* Cardiac Effects of Echinocandins in Endotoxemic Rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**, 301–306; 10.1128/AAC.01766-15. (2016).
13. Koch, C. *et al.* Caspofungin Modulates Ryanodine Receptor-Mediated Calcium Release in Human Cardiac Myocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **62**; 10.1128/AAC.01114-18. (2018).
14. Lichtenstern, C. *et al.* Cardiac effects of echinocandin preparations - three case reports. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 429–431; 10.1111/jcpt.12078 (2013).
15. Patil, A. & Majumdar, S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **69**, 1635–1660; 10.1111/jphp.12780 (2017).
16. Kyriakidis, I., Tragiannidis, A., Munchen, S. & Groll, A. H. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. *Expert Opinion on Drug Safety* **16**, 149–165; 10.1080/14740338.2017.1270264 (2017).
17. Knight, D. A. & Holgate, S. T. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology (Carlton, Vic.)* **8**, 432–446; 10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x (2003).
18. Salathe, M. Regulation of mammalian ciliary beating. *Annual Review of Physiology* **69**, 401–422; 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141253 (2007).
19. Weiterer, S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha induces a serotonin dependent early increase in ciliary beat frequency and epithelial transport velocity in murine tracheae. *PLoS ONE* **9**, e91705; 10.1371/journal.pone.0091705 (2014).

20. Weiterer, S. *et al.* Galactomannan and Zymosan Block the Epinephrine-Induced Particle Transport in Tracheal Epithelium. *PLoS ONE* **10**, e0143163; 10.1371/journal.pone.0143163 (2015).
21. Knowles, M. R. & Boucher, R. C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of Clinical Investigation* **109**, 571–577; 10.1172/JCI15217 (2002).
22. Bustamante-Marin, X. M. & Ostrowski, L. E. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **9**; 10.1101/cshperspect.a028241 (2017).
23. Chilvers, M. A. & O'Callaghan, C. Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatric Respiratory Reviews* **1**, 27–34; 10.1053/prrv.2000.0009 (2000).
24. Hussong, J. *et al.* Cilia-driven particle and fluid transport over mucus-free mice tracheae. *Journal of Biomechanics* **46**, 593–598; 10.1016/j.jbiomech.2012.08.020 (2013).
25. Knowles, M. R. & Boucher, R. C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of Clinical Investigation* **109**, 571–577; 10.1172/JCI15217 (2002).
26. Whitsett, J. A. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Annals of the American Thoracic Society* **15**, S143-S148; 10.1513/AnnalsATS.201802-128AW (2018).
27. Davis, S. D. *et al.* Primary Ciliary Dyskinesia: Longitudinal Study of Lung Disease by Ultrastructure Defect and Genotype. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **199**, 190–198; 10.1164/rccm.201803-0548OC (2019).
28. Sleight, M. A., Blake, J. R. & Liron, N. The propulsion of mucus by cilia. *The American Review of Respiratory Disease* **137**, 726–741; 10.1164/ajrccm/137.3.726 (1988).
29. Krasteva, G., Canning, B. J., Papadakis, T. & Kummer, W. Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life Sciences* **91**, 992–996; 10.1016/j.lfs.2012.06.014 (2012).

30. Sanderson, M. J. Regulation of Ciliary Beat Frequency in Respiratory Tract Cells. *CHEST* **101**, 69S; 10.1378/chest.101.3_Supplement.69S (1992).
31. Ishikawa, T. Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **9**; 10.1101/cshperspect.a028076 (2017).
32. Fliegau, M. & Omran, H. Novel tools to unravel molecular mechanisms in cilia-related disorders. *Trends in Genetics : TIG* **22**, 241–245; 10.1016/j.tig.2006.03.002 (2006).
33. Satir, P. & Christensen, S. T. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual Review of Physiology* **69**, 377–400; 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236 (2007).
34. Bhabha, G., Johnson, G. T., Schroeder, C. M. & Vale, R. D. How Dynein Moves Along Microtubules. *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 94–105; 10.1016/j.tibs.2015.11.004 (2016).
35. Buljan, V. A. *et al.* Calcium-axonemal microtubuli interactions underlie mechanism(s) of primary cilia morphological changes. *Journal of Biological Physics* **44**, 53–80; 10.1007/s10867-017-9475-2 (2018).
36. Smith, E. F. Regulation of flagellar dynein by calcium and a role for an axonemal calmodulin and calmodulin-dependent kinase. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 3303–3313; 10.1091/mbc.e02-04-0185 (2002).
37. Sleight, M. A. Ciliary function in transport of mucus. *European Journal of Respiratory Diseases. Supplement* **128 (Pt 1)**, 287–292 (1983).
38. Salathe, M. & Bookman, R. J. Coupling of Ca²⁺ and ciliary beating in cultured tracheal epithelial cells. *Journal of Cell Science* **108 (Pt 2)**, 431–440 (1995).
39. Wyatt, T. A., Spurzem, J. R., May, K. & Sisson, J. H. Regulation of ciliary beat frequency by both PKA and PKG in bovine airway epithelial cells. *The American Journal of Physiology* **275**, L827–35; 10.1152/ajplung.1998.275.4.L827 (1998).
40. Schmid, A. & Salathe, M. Ciliary beat co-ordination by calcium. *Biology of the Cell* **103**, 159–169; 10.1042/BC20100120 (2011).

41. Zagoory, O., Braiman, A. & Priel, Z. The Mechanism of Ciliary Stimulation by Acetylcholine. *Journal of General Physiology* **119**, 329–339; 10.1085/jgp.20028519 (2002).
42. Wyatt, T. A. Cyclic GMP and Cilia Motility. *Cells* **4**, 315–330; 10.3390/cells4030315 (2015).
43. Lazarowski, E. R. & Boucher, R. C. Purinergic receptors in airway epithelia. *Current Opinion in Pharmacology* **9**, 262–267; 10.1016/j.coph.2009.02.004 (2009).
44. Alfahel, E., Korngreen, A., Parola, A. H. & Priel, Z. Purinergically induced membrane fluidization in ciliary cells: characterization and control by calcium and membrane potential. *Biophysical Journal* **70**, 1045–1053 (1996).
45. Bayer, H. *et al.* Serotonergic receptors on human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **36**, 85–93; 10.1165/rcmb.2006-0151OC (2007).
46. Kummer, W., Lips, K. S. & Pfeil, U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochemistry and Cell Biology* **130**, 219–234; 10.1007/s00418-008-0455-2 (2008).
47. Salathe, M. Effects of beta-agonists on airway epithelial cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110**, S275-81; 10.1067/mai.2002.129412 (2002).
48. Hayashi, T. *et al.* ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. *Experimental Physiology* **90**, 535–544; 10.1113/expphysiol.2004.028746 (2005).
49. Meissner, G. Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Frontiers in Bioscience* **7**, d2072-2080; 10.2741/A899 (2002).
50. Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M. & Sorrentino, V. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *The Journal of Cell Biology* **128**, 893–904; 10.1083/jcb.128.5.893 (1995).
51. Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D. & Hamilton, S. L. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium

- release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a003996; 10.1101/cshperspect.a003996 (2010).
52. Meissner, G. The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *The Journal of General Physiology* **149**, 1065–1089; 10.1085/jgp.201711878 (2017).
53. Várnai, P., Hunyady, L. & Balla, T. STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**, 118–128; 10.1016/j.tips.2008.11.005 (2009).
54. Lewis, R. S. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature* **446**, 284–287; 10.1038/nature05637 (2007).
55. Noyer, L., Lemonnier, L., Mariot, P. & Gkika, D. Partners in Crime: Towards New Ways of Targeting Calcium Channels. *International Journal of Molecular Sciences* **20**; 10.3390/ijms20246344 (2019).
56. Lorenzo, I. M., Liedtke, W., Sanderson, M. J. & Valverde, M. A. TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 12611–12616; 10.1073/pnas.0803970105 (2008).
57. White, J. P. M. *et al.* TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiological Reviews* **96**, 911–973; 10.1152/physrev.00016.2015 (2016).
58. Alpizar, Y. A. *et al.* TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. *Nature Communications* **8**, 1059; 10.1038/s41467-017-01201-3 (2017).
59. Zagoory, O., Braiman, A., Gheber, L. & Priel, Z. Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **280**, C100-9; 10.1152/ajpcell.2001.280.1.C100 (2001).
60. Zhang, L. & Sanderson, M. J. The role of cGMP in the regulation of rabbit airway ciliary beat frequency. *The Journal of Physiology* **551**, 765–776; 10.1113/jphysiol.2003.041707 (2003).

61. Sakato, M., Sakakibara, H. & King, S. M. Chlamydomonas outer arm dynein alters conformation in response to Ca²⁺. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 3620–3634; 10.1091/mbc.e06-10-0917 (2007).
62. Marchi, S. *et al.* Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium* **69**; 10.1016/j.ceca.2017.05.003 (2018).
63. Puri, B. K. Calcium Signaling and Gene Expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1131**; 10.1007/978-3-030-12457-1_22 (2020).
64. Dewenter, M., Lieth, A. von der, Katus, H. A. & Backs, J. Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circulation Research* **121**, 1000–1020; 10.1161/CIRCRESAHA.117.310355 (2017).
65. Gustavsson, N., Wu, B. & Han, W. Calcium sensing in exocytosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **740**; 10.1007/978-94-007-2888-2_32 (2012).
66. Clapham, D. E. Calcium Signaling. *Cell* **131**, 1047–1058; 10.1016/j.cell.2007.11.028 (2007).
67. Demaurex, N. CELL BIOLOGY: Apoptosis--the Calcium Connection. *Science* **300**, 65–67; 10.1126/science.1083628 (2003).
68. Petersen, O. H. Calcium signalling and secretory epithelia. *Cell Calcium* **55**, 282–289; 10.1016/j.ceca.2014.01.003 (2014).
69. Tse, F. W. & Tse, A. Regulation of exocytosis via release of Ca²⁺ from intracellular stores. *Bioessays* **21**, 861–865; 10.1002/(SICI)1521-1878(199910)21:10<861::AID-BIES8>3.0.CO;2-9 (1999).
70. Gasperini, R. J. *et al.* How does calcium interact with the cytoskeleton to regulate growth cone motility during axon pathfinding? *Molecular and Cellular Neuroscience* **84**, 29–35; 10.1016/j.mcn.2017.07.006 (2017).
71. Beierwaltes, W. H. The role of calcium in the regulation of renin secretion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **298**, F1-F11; 10.1152/ajprenal.00143.2009 (2010).

72. Henrich, M. & Buckler, K. J. Cytosolic calcium regulation in rat afferent vagal neurons during anoxia. *Cell Calcium* **54**, 416–427; 10.1016/j.ceca.2013.10.001 (2013).
73. Mackrill, J. J. Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets. *Biochemical Pharmacology* **79**, 1535–1543; 10.1016/j.bcp.2010.01.014 (2010).
74. Ogawa, Y. Role of ryanodine receptors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 229–274; 10.3109/10409239409083482 (1994).
75. Williams, G. S. B., Boyman, L., Chikando, A. C., Khairallah, R. J. & Lederer, W. J. Mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 10479–10486; 10.1073/pnas.1300410110 (2013).
76. Salathe, M., Ivonnet, P. I., Lieb, T. & Bookman, R. J. Agonist-stimulated calcium decreases in ovine ciliated airway epithelial cells: role of mitochondria. *The Journal of Physiology* **531**, 13–26; 10.1111/j.1469-7793.2001.0013j.x (2001).
77. Rizzuto, R., Bernardi, P. & Pozzan, T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of Physiology* **529 Pt 1**, 37–47; 10.1111/j.1469-7793.2000.00037.x (2000).
78. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 11–21; 10.1038/35036035 (2000).
79. Díaz-Vegas, A. R. *et al.* Mitochondrial Calcium Increase Induced by RyR1 and IP3R Channel Activation After Membrane Depolarization Regulates Skeletal Muscle Metabolism. *Frontiers in Physiology* **9**, 791; 10.3389/fphys.2018.00791 (2018).
80. Duchen, M. R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of Physiology* **529**, 57–68; 10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x (2000).

81. Rossi, C. S., Alexandre, A. & Rossi, C. R. Interaction of calcium with mitochondria during calcium flux. *FEBS Letters* **43**, 349–352; 10.1016/0014-5793(74)80677-0 (1974).
82. Lan, B. *et al.* The roles of mitochondria-associated membranes in mitochondrial quality control under endoplasmic reticulum stress. *Life Sciences* **231**, 116587; 10.1016/j.lfs.2019.116587 (2019).
83. Marchi, S. *et al.* Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Communication Through Ca²⁺ Signaling: The Importance of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs). *Advances in Experimental Medicine and Biology* **997**, 49–67; 10.1007/978-981-10-4567-7_4 (2017).
84. Jiao, J., Han, D., Meng, N., Jin, S. & Zhang, L. Regulation of tracheal ciliary beat frequency by nitric oxide synthase substrate L-arginine. *ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and its Related Specialties* **72**; 10.1159/000265683 (2010).
85. Keating, G. & Figgitt, D. Caspofungin: a review of its use in oesophageal candidiasis, invasive candidiasis and invasive aspergillosis. *Drugs* **63**, 2235–2263; 10.2165/00003495-200363200-00008 (2003).
86. Deresinski, S. C. & Stevens, D. A. Caspofungin. *Clinical Infectious Diseases* **36**, 1445–1457; 10.1086/375080 (2003).
87. Chen, S. C.-A., Playford, E. G. & Sorrell, T. C. Antifungal Therapy in Invasive Fungal Infections. *Current Opinion in Pharmacology* **10**, 522–530; 10.1016/j.coph.2010.06.002 (2010).
88. Andes, D. *et al.* In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 2497–2506; 10.1128/AAC.01584-09 (2010).
89. Chen, S. C.-A., Slavin, M. A. & Sorrell, T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* **71**, 11–41; 10.2165/11585270-000000000-00000 (2011).
90. Stone, J. A. *et al.* Disposition of Caspofungin: Role of Distribution in Determining Pharmacokinetics in Plasma. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 815–823; 10.1128/AAC.48.3.815-823.2004 (2004).

91. Kofla, G. & Ruhnke, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. *European Journal of Medical Research* **16**, 159–166 (2011).
92. Muilwijk, E. W. *et al.* Pharmacokinetics of caspofungin in ICU patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**, 3294–3299; 10.1093/jac/dku313 (2014).
93. Ozawa, T. Ryanodine-sensitive Ca²⁺ release mechanism in non-excitabile cells (Review). *International Journal of Molecular Medicine*; 10.3892/ijmm.7.1.21 (2001).
94. Bennett, D. L. *et al.* Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 6356–6362; 10.1074/jbc.271.11.6356 (1996).
95. Green, A., Smallman, L. A., Logan, A. C. & Drake-Lee, A. B. The effect of temperature on nasal ciliary beat frequency. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* **20**, 178–180; 10.1111/j.1365-2273.1995.tb00040.x (1995).
96. Puchelle, E., Zahm, J. M. & Quemada, D. Rheological properties controlling mucociliary frequency and respiratory mucus transport. *Biorheology* **24**, 557–563; 10.3233/bir-1987-24606 (1987).
97. Wanner, A., Salathé, M. & O'Riordan, T. G. Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **154**, 1868–1902; 10.1164/ajrccm.154.6.8970383 (1996).
98. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440–3450 (1985).
99. Tedeschi, H. & Horn, H. W. 2,4 dinitrophenol and the permeability of mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **28**, 752–757; 10.1016/0006-291x(67)90380-4 (1967).
100. Reggiani, C. Caffeine as a tool to investigate sarcoplasmic reticulum and intracellular calcium dynamics in human skeletal muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*; 10.1007/s10974-020-09574-7 (2020).

101. Peinelt, C., Lis, A., Beck, A., Fleig, A. & Penner, R. 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *The Journal of Physiology* **586**, 3061–3073; 10.1113/jphysiol.2008.151365 (2008).
102. Stone, J. A. *et al.* Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 739–745; 10.1128/AAC.46.3.739–745.2002 (2002).
103. Johnson, M. D. & Perfect, J. R. Caspofungin: first approved agent in a new class of antifungals. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **4**, 807–823; 10.1517/14656566.4.5.807 (2003).
104. Denning, D. W. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet* **362**, 1142–1151; 10.1016/S0140-6736(03)14472-8 (2003).
105. Pappas, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **62**, e1-50; 10.1093/cid/civ933 (2016).
106. Nivoix, Y., Ledoux, M.-P. & Herbrecht, R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **41**, 158–174; 10.1055/s-0039-3400291 (2020).
107. Verkhatsky, A., Trebak, M., Perocchi, F., Khananshvili, D. & Sekler, I. Crosslink between calcium and sodium signalling. *Experimental Physiology* **103**, 157–169; 10.1113/EP086534 (2018).
108. Xiaolan Xu *et al.* 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Potentiates CRAC Current by Directly Dilating the Pore of Open Orai1. *Scientific Reports* **6**, 1–11; 10.1038/srep29304 (2016).
109. Lebeau, P. F., Platko, K., Byun, J. H. & Austin, R. C. Calcium as a reliable marker for the quantitative assessment of endoplasmic reticulum stress in live cells. *The Journal of Biological Chemistry* **296**, 100779; 10.1016/j.jbc.2021.100779 (2021).
110. Rossi, A. M. & Taylor, C. W. Reliable measurement of free Ca²⁺ concentrations in the ER lumen using Mag-Fluo-4. *Cell Calcium* **87**, 102188; 10.1016/j.ceca.2020.102188 (2020).

8 Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺]	Calciumkonzentration
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
[Ca ²⁺] _{ER}	Calciumkonzentration im Endoplasmatischen Retikulum
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
5HT	5-Hydroxytryptamin
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACh	Acetylcholin
AM	Acetoxymethylester
ANI	Anidulafungin
ATP	Adenosintriphosphat
CA	Kanada
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAS	Caspofungin
CBF	ciliary beat frequency, Zilienschlagfrequenz
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat

C _{MAX}	Maximale Plasmakonzentration
CPA	Cyclopiazonsäure
CZ	Tschechien
d	Distanz
DE	Deutschland
DNP	Dinitrophenol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
H89	N-[2-(p-Bromocinamylamino)ethyl]-5-isoquinolinsulfonamid-Dihydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HTE-Zellen	Humane Trachealepithelzellen
Hz	Hertz
ICI 118,551	(2R,3R)-rel-3-isopropylamino-1-(7-methylindan-4-yloxy)-butan-2-ol Hydrochlorid
IP ₃	Inositoltriphosphat
JPN	Japan
M	muskarinerner Rezeptor
MD	Median
mg	Miligramm
MIC	Minimale inhibitorische Konzentration
MICA	Micafungin
min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimolar

MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
nM	Nanomolar
NO	Norwegen
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
Nr.	Nummer
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on
ORAI1	calcium release-activated calcium channel 1
p	Signifikanzniveau
PA	Pennsylvania
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PTG	Partikeltransportgeschwindigkeit
ROI	Region Of Interest
s	Sekunde
sAC	lösliche Adenylatzyklase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOCE	Store operated calcium entry, calciuminduzierter Calciumeinstrom
spp.	species plurales
STIM1	stromal interaction molecule 1
t	Zeit
TierschG	Tierschutzgesetz

TRPV4	Transient receptor potential vanilloid channel subfamily V member 4
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
v	Geschwindigkeit
WAY	N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2- pyridinylcyclohexanecarboxamid Maleatsalz
Δt	Zeitintervall

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	5
Abbildung 2.....	5
Abbildung 3.....	9
Abbildung 4.....	10
Abbildung 5.....	16
Abbildung 6.....	19
Abbildung 7.....	21
Abbildung 8.....	24
Abbildung 9.....	26
Abbildung 10.....	27
Abbildung 11.....	28
Abbildung 12.....	37
Abbildung 13.....	38
Abbildung 14.....	38
Abbildung 15.....	39
Abbildung 16.....	39
Abbildung 17.....	41
Abbildung 18.....	41
Abbildung 19.....	43
Abbildung 20.....	43
Abbildung 21.....	45
Abbildung 22.....	46
Abbildung 23.....	47
Abbildung 24.....	48

Abbildung 25.....	49
Abbildung 26.....	50
Abbildung 27.....	51
Abbildung 28.....	52
Abbildung 29.....	53
Abbildung 30.....	54
Abbildung 31.....	55
Abbildung 32.....	56
Abbildung 33.....	57
Abbildung 34.....	59
Abbildung 35.....	60
Abbildung 36.....	61

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1..... 17

Tabelle 2..... 30

Tabelle 3..... 31

11 Veröffentlichungen und Vorträge

März 2014: Weiterer, Sebastian; Schulte, Dagmar; Müller, Sabrina; Kohlen, Thomas; Uhle, Florian; Weigand, Markus A.; Henrich, Michael (2014): Tumor necrosis factor alpha induces a serotonin dependent early increase in ciliary beat frequency and epithelial transport velocity in murine tracheae. In: *PLoS ONE* 9 (3), e91705. DOI: 10.1371/journal.pone.0091705.

Dezember 2013, Kongress der „Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) Leipzig: „*Die Wirkung der Echinocandine Caspofungin und Micafungin auf die Clearancefunktion des respiratorischen Flimmerepithels der Maus*“ Sabrina Müller, Michael Henrich, Christoph Lichtenstern, Florian Uhle, Thomas Kohlen, Christian Koch, Markus A. Weigand, Sebastian Weiterer

Mai 2017, Deutscher Anästhesiecongress Nürnberg: „*Der Einfluss von Caspofungin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration und den Partikeltransport des Trachealepithels*“ Sabrina Müller, Christian Koch, Dagmar Schulte, Michael Sander, Michael Henrich

Juni 2020: Müller, Sabrina; Koch, Christian; Weiterer, Sebastian; Weigand, Markus A.; Sander, Michael; Henrich, Michael (2020): Caspofungin induces the release of Ca²⁺ ions from internal stores by activating ryanodine receptor-dependent pathways in human tracheal epithelial cells. In: *Sci Rep* 10 (1), S. 11723. DOI: 10.1038/s41598-020-68626-7.

November 2021: Müller, Sabrina; Droll, Maximilian Carl; Koch, Christian; Weiterer, Sebastian; Weigand, Markus A.; Sander, Michael; Henrich, Michael (2021): Echinocandins Accelerate Particle Transport Velocity in the Murine Tracheal Epithelium: Dependency on Intracellular Ca²⁺ Stores. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 65 (11), e0066921. DOI: 10.1128/AAC.00669-21.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 25.04.2024

13 Danksagung

Diese Arbeit begleitete mich nun eine lange Zeit - eine Zeit, die das Fundament meiner beruflichen Laufbahn bildete. Das Interesse zur Anästhesiologie bestand bereits zu Beginn des Medizinstudiums nach einem Freiwilligen Sozialen Jahr im Rettungsdienst, wobei ich im Verlauf des vorklinischen Studienabschnitts mein Interesse für die Zellphysiologie entdeckte. Mein Anliegen, in der experimentellen Forschung der Anästhesiologie zu promovieren, ermöglichte mir mein Betreuer Michael Henrich im Jahr 2012. Deshalb gilt an dieser Stelle mein ausdrücklicher Dank Michael Henrich für die hervorragende Betreuung, für die Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit und für die Ausdauer, den menschlichen Beistand und den offenen Austausch in den schwierigen Lebensphasen, die mich zeitweise am Fortschritt der Arbeit hinderten. Ebenfalls möchte ich besonderen Dank Ilona Magel aussprechen, welche durch ihre exzellente Arbeit im Labor die Grundlagen meiner experimentellen Erfolge schuf, mir eine stets reibungslose Durchführung meiner Experimente ermöglichte und mich in allen Anliegen unterstützte und begleitete. Zu Beginn meiner Promotionsarbeit begleitete mich Sebastian Weiterer mit großem Engagement und unterrichtete mich umfassend in den Einzelheiten der Umsetzung, Durchführung und Auswertung der Experimente, wofür ich ihm sehr dankbar bin. Ich bedanke mich auch bei meinen Weggefährtinnen und Weggefährten im Labor, bei meinen Freundinnen und Freunden und meiner Familie, die mir aus nah und fern Kraft schenkten, diesen Weg zu meistern.

14 Tabellarischer Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.