

Adaptation von MDR-P-Glykoprotein, MRP- und LRP-Expression in primären Lungenzellen und Lungentumorlinien in Kultur

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Fachbereich Biochemie/Biotechnologie)

von Dipl. Biochemiker Thomas Lehmann
geb. am: 22. 12. 1969, in: Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Foth
2. Prof. Dr. G.-J. Krauß
3. Prof. Dr. G. H. Degen

Verteidigung am 06.12. 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000006927

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006927>]

1.	Einleitung	
1.1.	ABC Transporter-Superfamilie	1
1.2.	„multi drug resistance“ (MDR)	1
1.3.	P-Glykoprotein (P-gp 170/ MDR1)	5
1.4.	„multi drug resistance related protein“ (MRP)	8
1.5.	„lung resistance related protein“ (LRP)	11
1.6.	Physiologische und biochemische Funktionen der Lunge	13
1.7.	Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)	17
1.7.1.	Paraquat	21
1.8.	Zielsetzung	24
2.	Material und Methoden	
2.1.	Material	25
2.1.2.	Versuchstiere	25
2.1.3.	Zelllinien	25
2.1.4.	Normale humane Bronchialepithelzell- und Lungenzell-Kulturen	25
2.1.5.	Chemikalien und Biochemikalien	26
2.1.6.	Geräte / Materialien	30
2.2.	Methoden	33
2.2.1.	Sterilisation von Materialien und Lösungen	33
2.2.2.	Spalten und Kultivieren von Tumorzelllinien	33
2.2.3.	Isolierung von AII-Zellen der Rattenlunge	33
2.2.4.	Kultivierung von AII-Zellen	39
2.2.5.	Gewinnung und Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen und peripherer Lungenzellen	39
2.2.6.	AII-Zell-Charakterisierung	41
2.2.7.	Charakterisierung der NHBEZ- und PLZ-Kulturen	41
2.2.8.	Kollagenherstellung	42
2.2.9.	Elektronenmikroskopie	43
2.2.10.	Behandlung der Zellkulturen	43
2.2.11.	Bestimmung der Zytotoxizität	43
2.2.12.	HPLC-Analytik von Malondialdehyd	44
2.2.13.	Quantitative Paraquatbestimmung im Kulturmedium	44
2.2.14.	RNA-Isolierung	45
2.2.15.	Reverse Transkription und PCR	46

2.2.16.	Gesamt-Protein-Isolierung	47
2.2.17.	Präparation von Zellmembranen	47
2.2.18.	Proteinbestimmung	48
2.2.19.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	49
2.2.20.	Naß-Transfer / Blot	51
2.2.21.	Protein-Färbungen	51
2.2.22.	Immunochemischer Nachweis der Proteine	52
2.2.23.	Auswertung der durchgeführten Experimente	53
2.2.24.	Probengewinnung und Probenauswahl	53
3.	Ergebnisse	
3.1.	Charakterisierung der Kultursysteme	54
3.1.1.	Alveolar Typ II-Zell-Primärkultur	54
3.1.2.	Kulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und peripherer Lungenzellen (PLZ)	55
3.1.3.	Charakterisierung von NHBEZ- und PLZ-Kulturen	56
3.2.	Vitalitäts- und Toxizitätstests	58
3.3.	Malondialdehydbestimmung im Kulturmedium	58
3.4.	Quantitative Paraquatbestimmung im Kulturmedium	59
3.5.	Expression von <i>mdr1b</i> mRNA in A-II Zellen der Rattenlunge	60
3.5.1.	Zeitabhängige <i>mdr1b</i> mRNA Expression in AII-Zell-Kultur	60
3.5.2.	<i>Mdr1b</i> mRNA Expression in AII-Zellen der Rattenlunge nach Paraquat- und H ₂ O ₂ -Inkubation	61
3.6.	Einfluß der Kulturbedingungen auf die Expression von LRP, MRP und P-gp in humanen Lungentumorzelllinien	63
3.7.	Interindividuelle Expression von LRP, MRP und P-gp in Auswachskulturen der menschlichen Lunge	66
3.7.1.	Individuelle Expression von LRP in humanen Lungenzellkulturen	66
3.7.2.	Individuelle Expression von MRP in humanen Lungenzellkulturen	68
3.7.3.	Individuelle Expression von P-gp in humanen Lungenzellkulturen	70
3.8.	Expression von LRP, MRP und P-gp in Auswachskulturen verschiedener Generationen und Passagen von NHBEZ und PLZ	71
3.8.1.	LRP-Expression in Kultur humaner Lungenzellen	71
3.8.2.	MRP-Expression in Kultur humaner Lungenzellen	73
3.8.3.	P-gp mRNA-Expression in Kultur humaner Lungenzellen	74

3.9.	Einfluß reaktiver Sauerstoff-Spezies auf die Expression von LRP, MRP und P-gp in Kulturen humaner Lungenzellen	75
3.9.1.	Einfluß von Paraquat auf die Expression von LRP in NHBEZ und PLZ	75
3.9.2.	Einfluß von H ₂ O ₂ auf die Expression von LRP in NHBEZ und PLZ	76
3.9.3.	Einfluß von Paraquat auf die Expression von MRP in NHBEZ und PLZ	78
3.9.4.	Einfluß von H ₂ O ₂ auf die Expression von MRP in NHBEZ und PLZ	79
3.9.5.	Einfluß von Paraquat auf die P-gp mRNA-Expression in NHBEZ und PLZ	81
3.9.6.	Einfluß von H ₂ O ₂ auf die P-gp mRNA-Expression in NHBEZ und PLZ	82
4.	Diskussion	84
4.1.	Radikalische Schädigung durch Paraquat und Wasserstoffperoxid	85
4.2.	Expression von <i>mdr1b</i> in AII-Zell-Kulturen der Ratte	89
4.3.	Einfluß der Kulturbedingungen auf die Expression von LRP, MRP und P-gp in Lungentumorlinien	94
4.4.	NHBEZ und PLZ	98
4.5.	Expression von LRP in humanen Lungenzellen	99
4.6.	Expression von MRP in humanen Lungenzellen	101
4.7.	Expression von P-gp in humanen Lungenzellen	103
4.8.	Zusammenfassung	106
5.	Anhang	
5.1	Abbildungen	109
5.2.	Literatur	114
5.3.	Patientendaten	
5.4.	Publikationen	
5.5.	Lebenslauf	
5.6.	Erklärung über Promotionsversuche	
5.7.	Selbständigkeitserklärung	
5.8.	Danksagung	

1. Einleitung

Für das Überleben der Zellen ist die regulierte und selektive Passage von spezifischen Molekülen über die Membranbarriere hinweg essentiell, so sind 20 % der bekannten Gene von *E.coli* an Transportfunktionen beteiligt. Dabei ist die koordinierte Aufnahme, Abgabe und Verteilung von Substraten an das Vorhandensein spezifischer Transportproteine gebunden. Zu unterscheiden sind dabei passive Prozesse (einfache und erleichterte Diffusion) und energieabhängige Vorgänge. Letztere werden u.a. durch die Übertragung von Phosphatgruppen, die Nutzung von Protonengradienten oder die Hydrolyse von ATP getrieben.

1.1. ABC Transporter-Superfamilie

Die größte und von ihrer Funktion her vielfältigste Gruppe dieser Transportproteine sind die „ATP-binding cassette“ Transporter (ABC-Transporter) (Higgins, 1992). Sie umfaßt inzwischen mehr als 200 verschiedene Proteine in Pro- und Eukaryonten, von denen die meisten Transportfunktionen besitzen.

Die Mitglieder der ABC-Superfamilie nutzen die Energie aus der Hydrolyse von ATP für einen meist unidirektionalen Transport verschiedenster Moleküle durch biologische Membranen (Higgins, 1992; Childs und Ling, 1994; Dean und Allikmets, 1995; Fath und Kolter, 1993). Dazu zählen Ionen, Phospholipide, Peptide, Steroide, Polysaccharide, Aminosäuren, organische Anionen, Medikamente und Xenobiotika (Borst et al., 1999; Cole und Deeley, 1998; Hipfner et al., 1999; Higgins, 1992; Klein et al., 1999). In Prokaryonten erfolgt hauptsächlich der Import von essenziellen Substanzen, die nicht durch Diffusion aufgenommen werden können. Demgegenüber wird in Eukaryonten meistens ein Export oder ein vom Zytoplasma in zelluläre Kompartimente (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Peroxisomen) gerichteter Transport realisiert (Ehrmann et al., 1998).

Ein Strukturmerkmal der ABC-Proteine ist ihr Aufbau aus vier funktionellen Domänen. Dazu gehören zwei zur Membranverankerung dienende hydrophobe und zwei hydrophile, zytoplasmatisch gelegene ATP-bindende Bereiche (Abbildung 1a). Diese vier Bereiche können dabei in einem Protein vereint vorliegen (Zytoplasmamembrantransporter in Eukaryoten), aus zwei Halbtransportern (homo- oder heterodimere intrazellulär lokalisierte Transporter in Eukaryonten) oder aus vier unabhängigen Untereinheiten (bakterielle periplasmatische Permeasen) zusammengesetzt sein (Hyde et al., 1990; Higgins, 1992; Gottesman und Pastan, 1993).

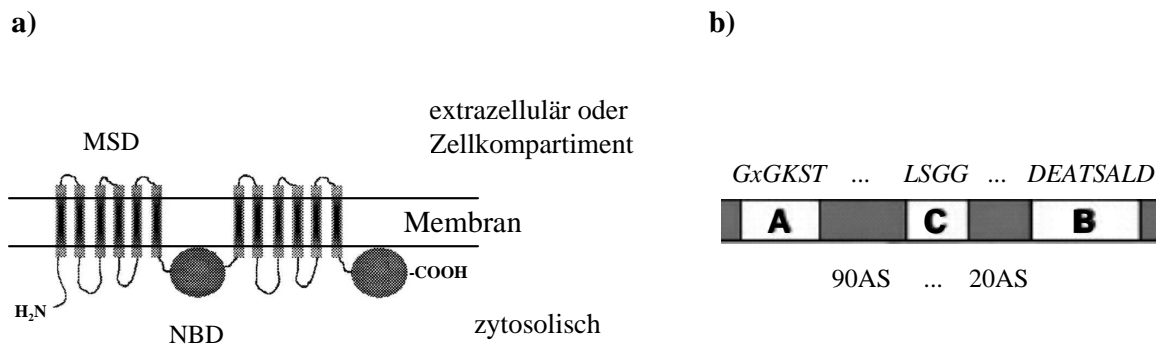


Abb. 1: Abbildung eines ABC-Transporters und Struktur einer Nukleotid-bindenden-Domäne.

(a) Schematische Darstellung der Domänen eines typischen ABC-Transport-Proteins mit zwei Membran-spannenden-Domänen (MSD) und zwei Nukleotid-bindenden Domänen (NBD).

(b) NBD eines ABC-Proteins mit charakteristischen Walker A und B Motiven, Linkerregion C. Häufig vertretene Aminosäuren sind *kursiv* dargestellt. (Klein et al., 1999; Dean et al., 2001a)

Eine Einteilung in Subfamilien erfolgt aufgrund der Sequenz und Organisation der hochkonservierten zytoplasmatischen Nukleotid-Bindungs-Domänen (NBD). Diese enthalten die für alle ATP-bindenden Proteine charakteristischen Walker A und Walker B Regionen und eine zusätzliche konservierte Linkerregion C, *upstream* von Walker B (Walker et al., 1982; Hyde et al., 1990) (Abbildung 1b). Ein Lysin innerhalb der Walker A Region ist an der Bindung des ATP β -Phosphats beteiligt, ein Asp-Rest in Walker B interagiert mit Mg^{2+} (Sharom et al., 1999; Hung et al., 1998). Die Substratbindung und -spezifität wird durch die membranständigen α -Helices der Membran-spannenden-Domänen (MSD) realisiert. Eine Übersicht über die humanen ABC-Transporter-Subfamilien gibt Tabelle 1.

Da sie neben ihren vielfältigen physiologischen Funktionen auch bei der Entstehung oder Therapie menschlicher Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, wird den Vertretern dieser Proteinklasse ein großes Interesse entgegengebracht. Bedeutende Vertreter sind die CFTR- und MDR-Proteine (siehe unten), sowie das in Peroxisomen von Säugetieren lokalisierte PMP70 (peroxisomal membrane protein), dessen Ausfall zu Eisenstoffwechselstörungen und schweren cerebro-hepato-renalen Dysfunktionen führt (Kamijo et al., 1990; Gartner et al., 1992). Weiterhin gehören TAP-1 und -2 dazu, die als Heterodimer Peptide in das Endoplas-matische Retikulum für die Klasse I Antigen Präsentation transportieren (Higgins, 1992).

Das humane CFTR-Protein (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) besitzt eine Chlorid-Ionen-Kanalfunktion. Ein Defekt führt zu einer der häufigsten Erbkrankheiten, der Zystischen Fibrose. Die häufigste Mutation ist eine Deletion von

Phenylalanin 508 (DF508), die zu einer temperaturbedingten Misslokation des CFTR-Proteins und damit zum Funktionsverlust führt (Riordan et al., 1989; Denning et al., 1992).

MDR-Proteine sind verantwortlich für das Phänomen der „multidrug resistance“, einer breitgefächerten Resistenz gegen zytotoxische Substanzen, die weder eine ähnliche Struktur noch gleiche intrazelluläre Wirkorte aufweisen (Gottesman und Pastan, 1993).

Dieses Phänomen bereitet große Probleme bei der Chemotherapie humaner Krebserkrankungen („klassische MDR“).

Aber auch bakterielle multidrug-efflux-Systeme stellen ein großes medizinisches Problem dar, z.B. bei der Behandlung von Wunderkrankungen oder der Therapie von Hirnhaut- und Lungenentzündungen. So sind MDR-Transporter mit intrinsischen und erworbenen Antibiotika-Resistenzen von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, and *S. aureus* assoziiert (Ma et al., 1995; Poole et al., 1993; Sanchez et al., 1997; Yamada et al., 1997).

Gen-Familie alias	n	Tranporter-Typ	Vertreter
A ABC1	12	Volltransporter, (z.T. > 2100 AS)	ABCA1-Tangier Disease (HDL / Cholesterol-Haushalt / Transport); ABCA4-Transport von VitA-Derivaten (Auge)
B MDR/TAP	11	Volltransporter Halbtransporter	SPGP-GallensäurenTransport; ABCB 6,7,8,10 - Transport Fe/S-Protein-Precursor, Fe-Haushalt in Mitochondrien
C CFTR/MRP	12	Volltransporter	SUR1 und -2 -Sulfonylharnstoff-Bindung, Regulation von Kalium-Kanälen (Modulation Insulinsekretion, Diabetes)
D ALD	4	Halbtransporter (Peroxisomen)	PMP70; ABCD1-ALD (Nerven-, Nierenstörungen); alle-Transport von Fettsäuren (Zell-Lipid-Metabolismus)
E OABP	1	keine Transportfunktion, nur NBD	OABP (<u>O</u> ligo- <u>A</u> denylat- <u>B</u> indungs- <u>P</u> rotein)-Erkennung von verschiedenen Virusinfektionen
F GCN20	3	keine Transportfunktion, nur NBD	ABCF1-Aktivierung Kinaseaktivität (Ribosomen)
G white	5	Halbtransporter (N-NBD-MSD-C)	ABCG1-Regulation Cholesteroltransport; ABCG2-MDR; ABCG 5/8- Sterol-Transport in Darm und Leber

Tab.1: Übersicht über die humanen ABC-Transporter-Familien (Dean et al. 2001a und 2001b)

n - Anzahl bisher bekannter Transporter, AS - Aminosäuren, SPGP - Sister of P-glykoprotein, SUR - Sulfonylurea Regulator, PMP - Peroxisomal membrane Protein, ALD - Adenoleuko-dystrophie, MDR - Multi-drug-resistance, NBD - Nukleotid-Bindungs-Domänen, MSD - Membran-spannende-Domänen

1.2. „multi drug resistance“ (MDR)

Seit dem erstmaligen Gebrauch von Nitrogen Mustard zur Behandlung bösartiger Tumore Mitte der vierziger Jahre (Rhoads, 1946), konnten zahlreiche andere chemotherapeutische Wirkstoffe Einzug in die klinische Anwendung finden. Therapielimitierend ist jedoch häufig die Manifestation einer Chemoresistenz, die nicht nur gegen Vertreter einer Stoffklasse gerichtet ist, sondern meist ein breites Spektrum strukturell unterschiedlicher Substanzen einschließt.

Die Ursachen für die Entwicklung einer Chemoresistenz können grundsätzlich auf allen zellulären Ebenen begründet liegen. Dazu zählen verminderte Aufnahme des Substrates in die Zelle, vermehrte intrazelluläre Inaktivierung oder verminderte Aktivierung des Substrates, verminderte Affinität des Substrates zu den intrazellulären Zielen und gesteigerte Reparationskapazität der Zelle. Diese Möglichkeiten zur Ausbildung einer Chemoresistenz sind zum Teil substratspezifisch und stehen somit nicht alle im direkten Zusammenhang mit der klinisch bedeutsamen unspezifischen Vielfachresistenz gegen ein weites Feld von Therapeutika. Für diesen Fall lässt sich ein weiterer Punkt definieren, der die Wirkung energieabhängiger Transportproteine zur zellulären Detoxifikation beschreibt. Das Auftreten einer pleiotropen Resistenz gegen eine Vielzahl strukturell bzw. funktionell unterschiedlicher Agenzien wird als „multidrug resistance“ (MDR) bezeichnet. Der MDR Phänotyp schließt eine Kreuzresistenz gegen Anthrazycline (Doxorubicin, Daunorubicin), Epipodophylltoxine (Etoposid), Vinca-Alkaloide (Vinblastin, Vincristin), Taxol und andere Gruppen ein. Anfänglich durchgeführte physiologische und pharmazeutische Studien zeigten Hinweise für eine verminderte Anreicherung des Therapeutikums in der Zelle (Kessel et al., 1968). Als Ursache dafür wurden ein vermehrter Auswärtstransport (Dano, 1973) bzw. eine verminderte Zellpermeabilität (Ling und Thompson, 1974) diskutiert. Zu den bisher bekanntesten Mechanismen, die zur MDR führen, werden die vermehrte Expression von P-Glykoprotein (P-gp), dem „multidrug resistance related protein“ (MRP) und dem „lung resistance related protein“ (LRP) gezählt. P-gp (MDR1) und MRP gehören zur Familie der ABC-Transporter. LRP ist ein Vertreter der Vault-Proteine.

1.3. Das P-Glykoprotein (P-gp 170/ MDR1)

Die Entdeckung des P-Glykoproteins (P-gp) führte zu ausgedehnten Studien bezüglich des MDR-Wirkungsmechanismus und der klinischen Bedeutung dieses Phänomens. Erstmals konnte 1976 die Überexpression dieses Proteins in Colchizin-resistenten Ziellinien des chinesischen Hamsters nachgewiesen werden (Juliano und Ling, 1976). Da es nur in Zellen mit veränderter Membranpermeabilität auftrat, wurde es P (Permeabilitäts)-Glykoprotein genannt.

P-gp ist ein 170 kDa großes transmembranäres Protein, das einen ATP abhängigen Pumpmechanismus unterhält (Gerlach et al., 1986; Pastan und Gottesman, 1987). Entsprechend der vermuteten Funktion im Prozess der natürlichen Detoxifikation der Zelle, findet sich P-gp auch in normalen menschlichen Geweben, insbesondere solcher mit sekretorischer oder schrankenbildender Funktion (Blut-Hirn-Schranke), wie auch in peripheren Blutzellen.

Das für P-gp kodierende Gen wird als MDR1 bezeichnet (Gros et al., 1986; Ueda et al., 1986). Es gehört zu einer kleinen Familie von zwei in menschlichen Zellen vorkommenden Genen (MDR1/ MDR2), sowie drei Mitgliedern in Zellen von Nagetieren (mdr1a, mdr1b und mdr2) (Nomenklatur nach Hsu et al., 1989). Eine Einteilung in Klassen (Tabelle 2) erfolgt anhand von Sequenzhomologien in den 3'-untranslatierten Regionen der Gene.

	Klasse I	Klasse II	Klasse III
	resistenzvermittelnd		
Mensch	MDR1	-	MDR2 (MDR3)
Maus	mdr1a (mdr3)	mdr1b (mdr1)	mdr2
Hamster	pgp1	pgp2	pgp3
Ratte	mdr1a (pgp1)	mdr1b (pgp2)	mdr2 (pgp3)

Tab. 2: Nomenklatur der "multidrug resistance" Gene (Bellamy, 1996)

Das P-gp besteht aus 1280-Aminosäuren und wird als eine einzelne Polypeptidkette exprimiert. Es wurden zwei aufeinanderfolgende homologe Proteinbereiche mit je 6 hydrophoben Transmembransegmenten und je einer zytoplasmatisch lokalisierten hydrophilen ATP-bindenden Region, mit der Fähigkeit zur ATP-Bindung und -Hydrolyse, charakterisiert (Ambudkar et al., 1992), Struktur siehe auch Abb. 1a. Die Hälften sind wahrscheinlich nicht durch Genduplikation, sondern durch Fusion verwandter Gene entstanden (Chen et al., 1990). Diese 2 Bereiche sind durch eine „Linkerregion“ miteinander verbunden, die evolutionär wenig konservierte, isoform- und spezie-

spezifische Bereiche enthält. Beide ATP-Bindungsstellen sind für die Transportfunktion essentiell (Loo und Clarke, 1994), eine Verminderung des intrazellulären ATPs bedingt einen Anstieg der Chemosensibilität (Broxterman et al., 1988). Mutationen im Bereich der ATP-bindenden Regionen (Walker A-Motiv) führen zum Verlust der Transportfunktion (Azzaria et al., 1989), diese läßt sich durch Vanadat oder nicht hydrolysierbare ATP-Analoga hemmen (Horio et al., 1988).

Klasse I und II P-gp haben zwei Substratbindungsregionen, jeweils in der sechsten und zwölften Transmembrandomäne oder C-terminal (cytoplasmatisch) davon (Greenberger et al., 1991; Bruggemann et al., 1992; Greenberger 1993). Diese spielen auch bei der Substraterkennung eine Rolle (Currier et al., 1992; Devine et al., 1992). P-gp weisen verschiedene Glykosilierungsstellen auf (N-terminal, extrazellulär). Die Bereiche der Linker Region fungieren *in vitro* als Zielsequenz einer Proteinkinase A- und C-vermittelten Phosphorylierung (Orr et al., 1993). Durch entsprechende post-translationale Modifikationen sind P-gp bei gelektrophoretischer Auftrennung bei höheren Molekulargewichten zu detektieren (bis 200 kDa, statt 120-140 kDa - entsprechend der Peptidsequenz) (Fardel et al., 1992; Bellamy, 1996).

Die Funktion des P-gp stellten sich Gottesman und Pastan als Modell eines „hydrophoben Staubsaugers“ vor (Gottesman, 1993). Dabei ist der Grundgedanke, daß amphiphile Substrate in die Membran interkalieren und Substrate einerseits aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum, andererseits ohne das Zytoplasma zu erreichen durch das P-gp nach außen transportiert werden.

Sowohl das humane MDR1 als auch die *mdr1*-Proteine von Maus und Ratte sind fähig, einen auswärtsgerichteten Transport einer Reihe hydrophober, oft kationischer Substanzen zu bewerkstelligen, darunter verschiedene zytostatische Medikamente, und somit eine Mehrfachresistenz gegenüber zytotoxischen Verbindungen zu vermitteln (Zaman et al., 1995; Lautier et al., 1996).

Als gemeinsames Strukturmerkmal besitzen die transportierten Verbindungen einen amphiphilen Charakter und planare Molekülbereiche (Hait und Aftab, 1992). Tertiäre Aminogruppen, die bei physiologischen pH-Werten positiv geladen sind, verleihen dabei eine begrenzte Hydrophilie. Aromatische Ringsysteme sind für den lipophilen Charakter verantwortlich (Lelong et al., 1991). Phenylalanin-x-x-x-Phenylalanin Bereiche in den transmembranären Segmenten 6 und 12 sind eine wichtige Sequenz der Substratbindungsstelle und damit Voraussetzung zum Substrattransport (Loo und Clarke, 1993).

Die Gewebeverteilung ist in den einzelnen P-gp Klassen unterschiedlich. Die Klasse III (siehe Tabelle 2) wurde in allen Säugerspezies gefunden, hauptsächlich in der Leber, weniger in Lunge, Milz, Nebenniere, Herz- und Skelettmuskulatur (Silverman und Thorgeirsson, 1995). Dabei haben die Klasse III Proteine essenzielle Bedeutung für die Exkretion von Phosphatidylcholin in die Galle (Oude Elferink und Groen, 1995). Die Klasse I und II P-gps (Tabelle 1) wurden in differenzierten Zellen von Darmmukosa, proximalen Nierentubuli, Milz, Leber, Pankreas, Nebennierenrinde, Lunge, Gehirn, Hoden, Plazenta u. a. Organen in unterschiedlicher Ausprägung gefunden (Silverman und Thorgeirsson, 1995; Silverman und Schrenk, 1997). P-gp zeigen eine polarisierte Expression zwischen basalen und apikalen Zellmembranen, was z. T. zu hochdifferenzierten Zellfunktionen führt, z. B. den Export von Stoffen durch die sinusoidalen und kanalikulären Hepatozytenmembranen (Silverman und Schrenk 1997, Borst et al., 2000a). In Gefäßendothelzellen von Gehirn, Testes und Plazenta agieren *mdr1*-P-gp als funktionelle Komponenten der Blut-Gewebeschanke (Bradley et al., 1990).

Zum Mechanismus der Regulierung der Expression von P-gp ist bekannt, daß er bei den meisten Nagetierzelllinien über eine Genamplifikation abläuft (van der Blik und Borst, 1989). Im Gegensatz dazu findet sich in menschlichen Zelllinien eher eine Aktivierung der Transkription (van der Blik et al., 1988; Baas et al., 1990). In klinischen Beispielen der P-gp-Überexpression konnte eine Genamplifikation nicht nachgewiesen werden (Goldstein et al., 1989; Rothenberg et al., 1989). In normalen Säugerzellen wird die Expression von MDR1 P-Glykoprotein durch viele Faktoren reguliert, und es ist wahrscheinlich, daß die Pgp-Expressionen an der Deregulation während des Zellwachstums beteiligt ist. Überexpressionen in der Leber wurden während Cholestase, Leber-Regeneration, hepatozellulären Karzinomen und experimenteller Hepatokarzinogenese beobachtet (Schrenk et al., 1993; Teeter et al., 1990; Goldstein et al., 1989; Huang et al., 1992).

Einige Substanzen (Karzinogene wie 3-Methylcholanthren, 2-Acetylaminofluoren und Induktoren von CYP-Monooxygenasen) regulieren die Expression von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus und von P-gp in paralleler Weise (Aubrecht et al., 1995; Hill et al., 1996; Gant et al., 1992). Die Expression von P-gp ist in verschiedenen Tumorzelllinien mit einer transkriptionellen Suppression durch p53 verbunden, darunter auch humane Lungentumore (Galimberti et al., 1998; Wang und Beck, 1998; Hirose und Kuroda, 1998). Einige vom *mdr1b* transportierten Stoffe (z. B. Daunomycin) induzieren die mRNA-Expression in Nager-Zelllinien. Die Induktion von P-gp durch das Zytokin TNF- α kann durch Ascorbat verhindert werden, was auf eine Beteiligung von Radikalen auf die P-gp-

Regulation hinweist (Ziemann et al., 1999). H_2O_2 induziert die *mdr1b*-Expression (RNA, Protein und funktionelles Protein) in primären Rattenhepatozyten. Auch diese Induktion wird durch Antioxidanzien (Vitamin C, Mannitol, DMSO, 3-Aminobenzamid) unterdrückt, was die Beteiligung radikalischer Mechanismen und von Poly-ADP-ribosylierung unterstreicht (Hirsch-Ernst et al., 1998; Ziemann et al., 1999). Die P-gp-Induktion durch das Zytokin $TNF-\alpha$, weist außerdem auf eine mögliche Regulation des *mdr1*-abhängigen Fremdstoff-Transports während Entzündungsprozessen hin (Hirsch-Ernst et al., 1998). Dexamethason und extrazelluläre Matrixproteine sind in der Lage, die *mdr1*-Expression zu unterdrücken. Die hepatotropen Wachstumsfaktoren EGF und IGF-I induzieren die Expression von *mdr1* mRNA und P-gp (Fardel et al., 1993, Hirsch-Ernst et al., 1995 und 1998). Physiologische Sauerstoffkonzentrationen modulieren die *mdr1b*-Expression in Rattenhepatozyten-Primärkulturen, das deutet darauf hin, daß Sauerstoff ein entscheidender Regulator für die zonale Sekretion von P-gp-Substraten in die Galle darstellt (Hirsch-Ernst et al., 2000).

1.4. „multi drug resistance related protein“ (MRP)

Hinweise auf ein neues, von P-gp unabhängiges, MDR-Transportsystem ergaben sich aus Untersuchungen an der Leukämiezelllinie HL60/ADR (McGrath und Center, 1988). Die Isolierung des membranären Transportproteins gelang allerdings an einer P-gp-negativen Linie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms H69AR (Mirski et al., 1987). Keiner der bis dahin bekannten Resistenzmechanismen konnte als Erklärungsmodell dafür dienen. Die Identifizierung einer 6,5 kb großen mRNA, die in H69AR ca. 100fach überexprimiert war, führte zur Entdeckung des multidrug-resistance related proteins (MRP1 als ersten Vertreter der MRP-Familie) (Cole et al., 1992). Untersuchungen an anderen Zelllinien zeigten, dass sich bei den meisten P-gp unabhängigen Multiresistenzen eine Überexpression von MRP nachweisen ließ (Krishnamachary und Center, 1993; Barrand et al., 1994; Slovak et al., 1993; Sumizawa et al., 1994; Zaman et al., 1993). Transfektion von HeLa- und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien mit MRP sicherten die Erkenntnis, dass mit einer Überexpression von MRP eine Resistenz gegen eine Vielzahl wichtiger Chemotherapeutika assoziiert ist (Zaman et al., 1994). Dazu gehören Doxorubicin, Vincristin, Vinblastin und Etoposid; weniger betroffen davon sind Mitoxantron und Taxol. MRPs fungieren desweiteren als Transporter von Glutathionkonjugaten mit verschiedenen anionischen Gruppen von endogenen und exogen Substraten, z. B. dem Entzündungsmediator Leukotrien C4 (LTC₄), oder Glutathion-S-Konjugaten von

Xenobiotika (Mayer et al., 1995; Zaman et al., 1995; Gekeler et al., 1995; Lautier et al., 1996). Neben GSH-Konjugaten stellen auch glukuronisierte und sulfatierte endogene und exogene Verbindungen ein Substrat für MRP dar (Jedlitschky, 1996). Bei den unkonjugierten Substraten erfolgt ein Co-Transport mit reduziertem Glutathion (GSH) (Loe et al., 1998; Zaman et al., 1995; Lorico et al., 1996; Rappa et al., 1997). MRP zeigen ähnlich wie die P-Glykoproteine eine polarisierte Expression zwischen basalen und apikalen Zellmembranen, was zu z. T. hochdifferenzierten Zellfunktionen führt, z. B. der Export von Stoffen durch die sinusoidalen und kanalikulären Hepatozytenmembranen (Keppler und König, 1997; Keppler und König, 2000; Borst et al., 2000b).

Vom „multidrug resistance related protein“ (MRP) wurden bis heute 7 Familienmitglieder identifiziert (Kool et al., 1997; Kool et al., 1999; Hopper et al., 2001). Einen Überblick gibt Tabelle 3. Man unterteilt in 2 Gruppen (siehe Abbildung 2). Eine Gruppe umfasst die MRP1, -2, -3, -6 und -7, sie besitzen eine zusätzliche N-terminale Domäne (MSD₀) (Borst et al., 2000b; Leslie 2001). Zur zweiten Gruppe zählen MRP4 und -5, sie sind kleiner als MRP1 und weisen keine MSD₀ auf. MSD₀ scheint nicht für die Transportaktivität notwendig zu sein (Bakos et al., 1998). Das 190 kDa große membrangebundene MRP1 ist N-glykosyliert und unterliegt der Phosphorylierung (Almquist et al., 1995, Krishnamachary et al., 1993). MRP1 bis -3 transportieren zusätzlich zu den neutralen oder gering basischen organischen Verbindungen (Co-Transport mit freiem GSH) auch Substanzen, die an GSH, Glukuronsäure oder Sulfat konjugiert wurden (Leier et al., 1994; Muller et al., 1994; Borst et al., 2000b). In Tumorzellen wird häufig eine simultan erhöhte Expression von MRP1 und γ -Glutamylcystein-Synthetase gefunden, die die Synthese von GSH katalysiert (Kuo et al., 1998). MRP2 ist vor allem in der baso-lateralen Hepatozytenmembran zu finden und dort am ATP-abhängigen Transport von physiologischen Glutathionkonjugaten (z. B. Bilirubin) in die Gallengänge und sinusoidalen Gefäße beteiligt. Dieser Transport ist zum Teil durch Buthioninsulphoximin (BSO) hemmbar (Versantvoort et al., 1996). Trotz dieser physiologischen Rolle von MRP2, dessen Fehlen zum Dubin-Johnson-Syndrom (angeborene Störung der Bilirubinsekretion in die Gallenkanäle) führt (Paulusma et al., 1997), haben MRP1 und MRP2 ein ähnliches Substratspektrum. Von beiden werden auch Vinca-Alkaloide und Anthracycline transportiert, die an saure Liganden in der Zelle konjugiert wurden. Der Transport dieser Substanzen durch MRP1 und 2 setzt die Anwesenheit von reduziertem GSH voraus. MRP3 spielt in der Resistenz gegenüber Etoposid und Teniposid, nicht aber gegenüber anderen Medikamenten eine Rolle.

Bezeichnung	Lokalisation	Transport/ Funktion
MRP1 ABCC1	Lu, Te, Ni, ubiquitär (in Le gering)	MDR, GS-X, LTC4,
MRP2 (cMOAT) ABCC2	Le, Ni, Ma	MDR, GS-X, glukuroniertes Bilirubin und anorg. Anionen
MRP3 (MOAT-D) ABCC3	Le, Ni, Ma, Nn, Pa, Pr	MDR, GS-X
MRP4 (MOAT-B) ABCC4	Pr, Lu, ubiquitär	Nukleosid-Analoga (?)
MRP5 (MOAT-C) ABCC5	Mu, He, Ge, ubiquitär	MDR, cAMP, cGMP, GS-X, Nukleosid-Analoga (?)
MRP6 (MOAT-E) ABCC6	Le, Ni	?
MRP7 ABCC10	?	?

Tab. 3: Überblick über die MRP-Transporter-Familie (nach Borst et al., 1999 und Leslie et al., 2001) cMOAT=canalicular Multispecific Organic Anion Transporter, Lu-Lunge, Te-Testis, Ni-Nieren, Le-Leber, Ma-Magen, Nn-Nebennieren, Pa-Pankreas, Pr-Prostata, Mu-Muskel, He-Herz, Ge-Gehirn, ?-unbekannt, (?)-vermutet

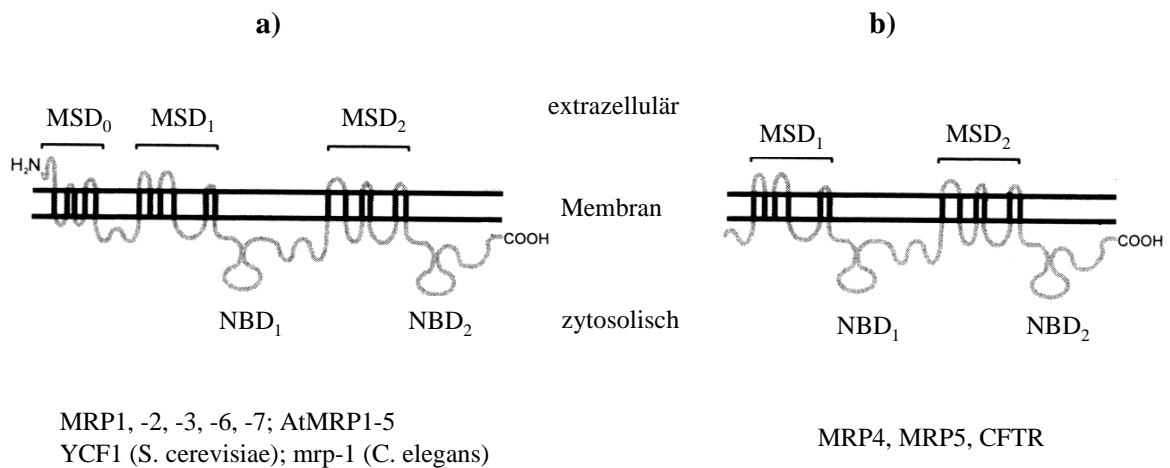


Abb. 2: Zweidimensionale Darstellung von MRPs. Struktur von MRP und verwandten Proteinen mit charakteristischer dritter N-terminalen Membran-spannenden MSD₀ (**a**) und den kleineren Mitgliedern der MRP-Familie mit typischer ABC-Struktur ohne MSD₀ (**b**). Leslie et al., 2001
At-Arabidopsis thaliana; *YCF*- yeast cadmium resistance factor 1, *Sacharomyces cerevisiae*;
C. elegans - *Caenorhabditis elegans*

MRP4 und -6 hingegen sind nicht an einer Resistenz gegenüber Antitumor-Medikamenten beteiligt. Über die Struktur und die Funktion des MRP7 ist bis jetzt wenig bekannt.

Als MRP1-Genlokus konnte das Chromosom 16 detektiert werden (Krishnamachary und Center, 1993; Slovak et al., 1993). Die Überexpression von MRP kann durch eine Amplifikation des kodierenden Gens am ursprünglichen Genort erfolgen (Slovak et al., 1993). Andererseits finden sich zahlreiche Hinweise darauf, dass eine vermehrte Produktion von MRP auch ohne Genamplifikation stattfinden kann (Cole et al., 1992; Eijdens et al., 1995). Eine Analyse des Initialpromoters vom MRP-Gen zeigt multiple Startpunkte für die Transkription und übereinstimmende Bereiche für eine positive oder negative Regulation (Zhu und Center, 1994).

Hohe Spiegel von MRP mRNA wurden charakteristischerweise in Tumoren gefunden, die schlecht auf eine Chemotherapie ansprechen, wie Bronchialkarzinome (Nooter et al., 1996) oder Neuroblastome. Letztere zeigen auch eine signifikante Korrelation mit der Expression von n-myc, einem Onkogen, welches z. Z. den stärksten Indikator für ein Therapieversagen darstellt (Bordow et al., 1994). Diese Beobachtung lässt den Schluß zu, dass eine enge Beziehung zwischen zellulären Prozessen der Tumorprogression und der Ausbildung von Faktoren der Chemoresistenz besteht. Die Expression von MRP und P-gp ist in verschiedenen Tumorzelllinien mit einer transkriptionellen Suppression durch p53 verbunden, darunter auch humane Lungentumore. Veränderungen der MRP1 Expression durch p53-Inaktivierung oder Mutation wurden ebenfalls für humane Prostata-Tumorzelllinien beschrieben (Galimberti et al., 1998; Wang und Beck, 1998; Hirose und Kuroda, 1998; Sullivan et al., 2000). In normalen Säugerzellen wird die Expression von MRP und MDR1-P-gp durch viele Faktoren reguliert, und es ist wahrscheinlich, dass die P-gp und MRP-Expressionen an der Deregulation während des Zellwachstums beteiligt sind.

1.5. „lung resistance related protein“ (LRP)

Die Entdeckung des „lung resistance related protein“ (LRP) zeigte einen möglichen Weg der Entwicklung einer Multi-Chemoresistenz auf, welcher nicht durch ein Protein vermittelt wird, das aus der Familie der ABC-Transporter stammt (Scheper et al., 1993). Erstmals in einer Zelllinie eines nichtkleinzelligen Lungentumors (NSCLC) detektiert, konnte es auch in den meisten anderen Neoplasien nachgewiesen werden, deren Chemoresistenz nicht auf eine Expression von P-gp zurückzuführen war. In Proben humaner Lungentumore waren in NSCLC 36% bis 83% (großzellige, undifferenzierte Karzinome / squamöse Zell-Karzinome), aber nur 5% der kleinzelligen Lungentumore

(SCLC), die primär chemosensitiver sind als NSCLC, LRP positiv (Izquierdo et al., 1996a). LRP ist ein wichtiger Resistenzfaktor bei MDR-bezogenen Medikamenten (Doxorubicin, Vincristin) und einigen nicht-klassischen MDR-Medikamenten (Cisplatin, Carboplatin, Melphalan) (Izquierdo et al., 1996b).

LRP - später auch als „human major vault protein“ (MVP) identifiziert - ist ein ca. 104-110 kDa großes Protein, daß ähnlich wie P-gp im natürlichen Gewebe an xenobiotisch exponierten Stellen vermehrt exprimiert wird. Ausgenommen davon sind die Gallenkanäle, wo sich zwar P-gp aber kein LRP nachweisen läßt. Es zeigt im Bronchialepithel, im Verdauungstrakt, in Keratinozyten und Makrophagen eine hohe Expression (Izquierdo, 1996a)

Die cDNA, die für das LRP kodiert, wurde aus einer menschlichen Fibrosarkomzelllinie isoliert. Als Genort konnte das chromosomale Segment 16p11.2 detektiert werden, welches in der Nähe des MRP Lokus liegt (Scheffer et al., 1995). Es findet sich in erster Linie zytoplasmatisch in groben Granula, ein Hinweis darauf, dass es mit einem Molekül interagiert, das mit vesikulären bzw. lysosomalen Strukturen assoziiert ist (Scheper et al., 1993). Es gehört zur Gruppe der Vault-Proteine. Die ungewöhnliche Struktur der Vaults lassen vermuten, dass sie Teil des Zellkern-Porenkomplexes sind. Säugetier-Vaults sind große zytoplasmatische Ribonukleinsäure-Protein-Komplexe, die aus mindestens vier verschiedenen Komponenten bestehen. Das sind das major vault protein (MVP oder auch LRP), die 193 kDa große Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (VPARP), das 240 kDa große Telomerase/Vault assoziierte Protein TEP1 und eine oder mehrere kleinere RNAs (vRNAs) (Kedersha et al., 1990). Aufgereinigte Vaults zeigen eine achteckige Tonnenstruktur, die aus multiplen MVP/LRP-Kopien besteht, an deren Enden VPARP, TEP1 und die vRNAs vermutet werden (Kedersha et al., 1991; Kong et al., 2000).

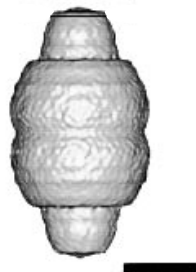


Abb. 3 : Oberflächendarstellung eines Vault-Partikels. Rekonstruktion einer Elektronenmikroskopischen Aufnahme eines isolierten Vaults aus einer TEP1 knock-out Maus. Die Länge des schwarzen Balkens entspricht 250 Å. (Kickhöfer et al. 2001)

Die Identifikation des VPARP als funktionelle Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) brachte den ersten Beweis für eine Vault-vermittelte enzymatische Aktivität (Kickhoefer et al., 1999a). Demgegenüber sind die Aufgaben von TEP1 als Vault- als auch Telomerase assoziiertem Protein und mögliche Wechselwirkungen noch ungeklärt (Kickhoefer et al.,

1999b). Klionierte vRNAs aus Menschen, Ratten, Mäusen und Ochsenfröschen zeigten Längenvarianzen von 86 bis 141 Basen (Kickhoefer et al., 1993). Vaults sind in Eukaryonten weit verbreitet und haben eine hoch konservierte Struktur (Kickhoefer et al., 1998).

Über die genaue Funktion des LRP und somit auch der Vaults besteht nach wie vor Unklarheit. In Analogie zur anderen Vaults nimmt man an, dass sie an der Regulation des nukleozytoplasmatischen bzw. vesikulären Transportes verschiedener Substrate innerhalb der Zelle teilnehmen. Gestützt wird diese These auf Beobachtungen verminderter nukleozytoplasmatischer Konzentrationen und der Exozytose in Vesikeln von Chemotherapeutika in LRP-überexprimierenden Zellen (Schuurhuis, 1991; Scheffer et al., 1995; Hamill and Suprenant, 1997; Abbondanza et al., 1998; Herrmann et al., 1999; Kitazono et al., 1999). Hamill und Suprenant (1997) vermuteten eine Beteiligung der Vaults an der Rekonstitution von Ribosomen und / oder die Beteiligung am Transport von Ribosomen und Ribonukleoproteinen aus dem Zellkern. Abbondanza et al. (1998) zeigten eine Interaktion von Vaults mit dem Östrogenrezeptor und vermuteten eine Beteiligung von Vaults an Zellkern-Zytoplasma-Transportvorgängen bei der Modulation von Signalwegen für Steroid-Hormone. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der 13MDa großen Vault-Partikel zeigen einen hohlen Innenraum, was die Annahme unterstützt, dass sie an Transportvorgängen beteiligt sind (Kong et al., 1999).

1.6. Physiologische und biochemische Funktionen der Lunge

Die Lunge, als Gasaustauschorgan, wird auf zwei Wegen gegenüber Fremdstoffen exponiert. Über die eingeatmete Luft ist die Lunge der direkten Einwirkung potenziell gefährlicher meist anthropogener Substanzen ausgesetzt (z. B. Tabakrauch, Mineralstäube, Metalloxide und Gase, wie Ozon oder Phosgen). Andererseits nimmt sie das gesamte Auswurfvolumen des rechten Ventrikels auf und ist damit neben dem Herzen das am stärksten durchblutete Organ. Dadurch hat sie Kontakt zu allen im venösen Blut enthaltenen endogenen und exogenen Substanzen. Eine Schädigung der Lunge kann somit sowohl durch inhalativ als auch durch systemisch verfügbare Verbindungen erfolgen. Neben ihrer respiratorischen Funktion erfüllt sie auch eine Reihe metabolischer Funktionen.

Die Lunge selbst besitzt eine Vielzahl von Enzymsystemen, um den unterschiedlichen Belastungen gerecht zu werden. Ein besonderes Problem stellen dabei ROS und freie Radikale dar, die entweder extern über die Atemluft aufgenommen werden, systemisch mit

dem Blutkreislauf in die Lunge gelangen oder vor Ort entstehen, z. B. durch aktivierte Entzündungszellen (Alveolarmakrophagen bei der Phagozytose) oder den Fremdstoffmetabolismus. Viele lungentoxische Verbindungen begünstigen die Generierung von ROS, wie z. B. NO₂, SO₂, Ozon, Tabakrauch, Mineralstäube, Paraquat, Bleomycin (Quinlan et al., 1994; Mauderly, 1984; Heppleston, 1991). Eine ätiologische Mitbeteiligung von ROS ist für die unterschiedlichsten pulmonalen Erkrankungen und pathophysiologischen Zustände nachgewiesen. Als Beispiele wären die Effekte von Zigarettenrauchen, Emphysem, COPD (chronic obstructive lung disease), Hyperoxie, Luftverschmutzung und Reizgasen (O₃, NO₂, SO₂, Dieselabgase), ARDS (adult respiratory distress syndrome), Mineralstäube, die Asbest-Karzinogenese, Asthma oder die zystische Fibrose zu nennen (Halliwell und Gutteridge, 2000).

Die Lunge ist auf Grund ihrer Funktion auch den höchsten Sauerstoffpartialdrücken im Körper ausgesetzt. Hohe O₂-Atemluft-Konzentrationen führen zu toxischen Effekten (Clark, 1988; Deneke und Fanburg, 1980), wie zu Schädigungen der Alveolen und zur Entstehung von Ödemen mit Störung des alveolären Gasaustausches. Die Endothelzellen der Blutgefäße reagieren dabei besonders empfindlich. Es kommt zum Absterben der Alveolar-Epithelzellen und zur Penetration von Proteinen in die Alveolen. Können diese Schäden nicht mehr repariert werden, führt dies zur Ausbildung von fibrotischen Umbauvorgängen und zur dauerhaften Störung des Gasaustausches (Poli und Parola, 1997).

Die Lunge besitzt eine komplexe Gewebsarchitektur mit einer starken Kompartimentierung und Polarisierung. Es sind mehr als vierzig verschiedene Zelltypen beschrieben, doch nur sechs sind bis jetzt als Targetzellen bei einer pulmonalen Schädigung bekannt. Dies sind Alveolar Typ I-Zellen, Alveolar Typ II-Zellen, Alveolarmakrophagen, Kapillar-Endothelzellen, zilienträgende Bronchialepithelzellen und nichtzilienträgende Bronchialepithelzellen. Einige dieser Zelltypen reagieren stärker auf initiiierende Einflüsse, und bilden somit eine Zielpopulation für die Induktion maligner Tumore. Für nur wenige Zelltypen ist eine aktive Beteiligung an der Biotransformation von Xenobiotika nachgewiesen (Dahl et al., 1988; Martin, 1993).

Alveolarmakrophagen oder Granulozyten zählen zu den immunkompetenten Zellen, die einerseits im lymphatischen Gewebe verteilt auf den gesamten Respirationstrakt und andererseits im Lumen der Atemwege selbst, zu finden sind. Das Endothel der pulmonalen Blutgefäße besitzt auf luminaler Seite unterschiedlich große Zellausläufer, die zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche mit dem Blutplasma führen. Dies ist wichtig für

den Gasaustausch. Die Aufnahme von im Blut zirkulierenden Verbindungen in das Lungengewebe wird durch dieses Endothel gesteuert. Diese Aufnahme kann insbesondere für lipophile Substanzen passiv erfolgen, für einige endogene Verbindungen existieren aber auch spezifische Transporter.

Der Bronchialbaum der Lunge trägt auf luminaler Seite ein Epithel, das sich aus mindestens acht verschiedenen Zelltypen zusammensetzt. Den größten Teil bilden dabei die zilienträgenden Epithelzellen. Sie finden sich vorrangig im oberen Respirationstrakt. Die Zilien sorgen für einen ständigen Abtransport von Schleim und so für die Reinigung der Atemwege. Über die Stoffwechselaktivitäten dieses Zelltypus ist bis jetzt wenig bekannt (Clark, 1988; Crapo et al., 1982; Dahl et al., 1988; Dahl und Lewis 1993). Im ziliären Epithel finden sich verstreut neben den Basalzellen die sogenannten Becherzellen, Clara-Zellen und seröse Zellen, die neben den submukös gelegenen Drüsen an der Produktion des Bronchialschleims beteiligt sind. Clara-Zellen sind die nichtzilienträgenden Bronchialepithelzellen des distalen Bronchialbaums und werden morphologisch von den zilienträgenden Bronchialepithelzellen unterschieden. Sie befinden sich am Übergang von den Bronchiolen zum gasaustauschenden Alveolar-Epithel, den Acini, sowie im höheren Respirationstrakt bis hin zur Nasenschleimhaut. Es sind kuboide, säulenartige Zellen, frei von Zilien, mit langen apikalen Mikrovilli und neurosekretorischen Granula. Im Elektronenmikroskop zeigen sie ein ausgeprägtes agranuläres Endoplasmatisches Retikulum (ER), große Mitochondrien und osmiophile Granula. Immunhistochemische Studien an histologischem Sektionsmaterial und an isolierten Zellen haben belegt, dass Clara-Zellen Cytochrom P-450 Isoenzyme exprimieren und somit über eine Xenobiotika-Stoffwechselaktivität verfügen. Sie werden u.a. zu den Progenitorzellen der chemisch induzierten Tumorgenese gezählt (Belinsky et al., 1991; Clark, 1988; Dahl und Lewis, 1993).

Zur epithelialen Auskleidung der Alveolen tragen vor allem die Alveolar-Typ I-Zellen (squamöse Epithelzellen) bei. Sie bedecken die Oberfläche der Alveolen zu 95%, obwohl sie lediglich 4-5% der Zellen der tiefen Lungenabschnitte stellen. Ihr Zytosol ist Teil der Diffusionsstrecke des Gasaustausches von den Alveolen zu den Kapillaren des Blutgefäßsystems. Sie sind sehr empfindlich für Verletzungen jeglicher Art und besitzen keine eigenen Mitose- und Proliferationsmöglichkeiten sowie Reparaturmechanismen.

Zwischen diesen Typ I-Zellen befinden sich eingestreut die Alveolar Typ II-Zellen (AII-Zellen oder auch Nieschenzellen), die nur 5% der alveolären Oberfläche bedecken. Es handelt sich dabei um kleine, irreguläre kuboidale Zellen mit einem organellenreichen

Zytoplasma. Unter dem Elektronenmikroskop sind auf deren Oberfläche zahlreiche kurze Mikrovilli sichtbar. Die Zellen zeigen *in situ* und *in vitro* eine apikal-basale Ausrichtung. Apikal gelegene membrangebundene Natrium-Kanäle befähigen die AII-Zellen zur aktiven Natrium-Aufnahme aus den Alveolen. Die transepitheliale Bewegung von Natrium aus den Alveolen spielt eine große Rolle in der Homöostase der geweblichen Flüssigkeitsverteilung und in der Verhinderung eines alveolären Ödems. Des Weiteren sind die AII-Zellen in der Lage, präferenziell kleine Partikel aus dem Alveolarraum aktiv aufzunehmen. Die AII-Zellen haben Stammzellfunktion. Schäden an Typ I-Zellen werden durch proliferierende AII-Zellen ersetzt, die zu AI-Zellen differenzieren.

Ein besonderes Merkmal der AII-Zellen sind die Lamellar-Körperchen, die die Hauptbestandteile des Surfactant enthalten. Beim Surfactant handelt es sich um ein Lipid/Protein - Gemisch (9:1), das die Oberflächenspannung der Alveolen herabsetzt und damit deren Entfaltung bei der Atmung ermöglicht. Der größte Teil der Lipide sind Phospholipide, insbesondere Lecithin. Der Proteinanteil ähnelt der Serumproteinzusammensetzung, enthält aber zusätzlich vier spezifische Surfactant-Proteine (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D). Eine weitere Besonderheit der AII-Zellen ist ihre hohe metabolische Kompetenz. Zeichen hierfür sind die zahlreich vorhandenen Mitochondrien, freien Ribosomen, das ausgeprägte ER und der Golgi-Apparat. *In vitro* konnten für AII-Zellen hohe Aktivitäten der Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase, der Epoxid-Hydrolase oder der Glutathion-S-Epoxid-Transferase nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wird ihnen neben den Clara-Zellen eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus der Lunge zugeschrieben. In diesem Zusammenhang ist auch die direkte Schädigung der AII-Zellen bei Exposition gegenüber Silikat-Stäuben, Ozon, Stickstoffdioxid oder Paraquat zu sehen. Paraquat wird beispielsweise sowohl bei inhalativer als auch systemischer Applikation aktiv durch AII-Zellen aufgenommen und intrazellulär durch zyklische Oxidations-Reduktions-Reaktionen mit molekularem Sauerstoff zum Superoxidation und anderen reaktiven Sauerstoff-Spezies überführt. Dies kann zu einer selektiven AII-Zell-Nekrose führen. Die Fähigkeit der metabolischen Aktivierung von Fremdstoffen macht die Alveolar Typ II-Zellen auch zum Ort der Schädigung durch die generierten reaktiven Verbindungen. All-Zellen sind weniger empfindlich als AI-Zellen, können aber trotzdem durch die Generierung von ROS oder andere Mechanismen vor allem in ihrer Surfactantproduktion gestört werden (Belinsky, 1991; Clark, 1988; Dahl et al., 1988; Dahl und Lewis 1993; Phalen et al., 1989; Witschi und Cote, 1976; Domin et al., 1986).

1.7. Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)

In den Mitochondrien aller höheren (heterotrophen) Organismen wird Sauerstoff als Oxidationsmittel zur Energiegewinnung genutzt. Der molekulare Sauerstoff ist ein Biradikal. Da die zwei Valenz-Elektronen des molekularen Sauerstoffs parallel ausgerichtet sind (paralleler Spin) sorgen sie aus Spinverbotsgründen für den relativ stabilen, reaktionsträgen Zustand. Jede andere Anordnung der äußeren Elektronen führt zu reaktionsfreudigen Sauerstoffderivaten, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) genannt werden. Der Begriff beinhaltet nicht nur freie Radikale, sondern auch Nicht-Radikale, welche sich direkt vom Sauerstoff ableiten.

Zu den radikalischen ROS zählen das Superoxidanion [$O_2^{\bullet-}$], das Hydroxylradikal [OH^{\bullet}], das Peroxylradikal [RO_2^{\bullet}], das Alkoxy-Radikal [RO^{\bullet}] und das Hydroxyperoxyl-Radikal [HO_2^{\bullet}]. Nichtradikalische ROS sind Wasserstoffperoxid, hypochlorige Säure, Ozon, Singulett-Sauerstoff und Peroxynitrit. Auf Grund des ungepaarten Elektrons zeigen Radikale eine starke Tendenz, ein zweites Elektron von einem potenziellen Reaktionspartner abzuziehen, um einen stabileren Energiezustand zu erreichen. Die Interaktion mit Zellbestandteilen und die Möglichkeit bestimmte Kettenreaktionen auszulösen, kann zur Bildung sekundärer Radikale aus Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren führen.

Verschiedenste physikalische, chemische und physiologische Reaktionen sind Ausgangspunkt für die Entstehung von ROS. Viele Enzymsysteme generieren sie bei physiologischen Vorgängen, z. B. die mikrosomalen und mitochondrialen Elektronentransportketten, die enzymatischen Umsetzungen in Peroxysomen oder im Zytosol durch das Xanthin/Xanthinoxidase-System (Sanders et al., 1997), die Prostaglandin-Synthese oder das Cytochrom-P450-System im endoplasmatischen Retikulum, das Sauerstoffkonzentrations-abhängig Superoxidanionen produziert (Goeptar, 1995). Eine weitere bedeutende Quelle der ROS ist der Stoffwechsel vieler Xenobiotika im Mechanismus der (Ent-) Giftung, als Beispiel ist das Chemotherapeutikum Bleomycin zu nennen (Mahmutoglu et al., 1987; Trush et al., 1981). Viel komplexer ist die Situation bei Stoffgemischen mit einer großen Anzahl verschiedenster Inhaltsstoffe und Wechselwirkungen wie z. B. beim Tabakrauch. Aber auch eine Reihe physikalischer Einflüsse (verschiedene Strahlungsarten oder mechanische Reizungen) können zur Bildung von ROS führen. Selbst kleinste Partikel (PM_{10}) in Dieselabgasen, welche wegen ihrer geringen Größe tief eingeatmet werden können und in der Lunge verbleiben (sie werden von ihrem Reinigungssystemen nicht erfasst), sind in der Lage Hydroxylradikale zu

generieren (Donaldson et al., 1997). Ein ähnlicher Wirkungsmechanismus wurde für Asbestfasern nachgewiesen, welche in unmittelbarem Zusammenhang mit der Induktion von Lungenfibrosen, Lungenkarzinomen oder Pleuramesotheliomen stehen (Quinlan et al., 1994). Die Hautalterung (UV-Licht) und die Entstehung verschiedenster anderer Tumore werden ebenso mit dem Wirken reaktiver Spezies in Zusammenhang gebracht (Campbell, 1989; Fubini und Mollo, 1995; Fubini et al., 1995).

ROS sind aus verschiedenen Gründen zellpathogen. In der DNA kann es durch oxidative Veränderungen zu Fehlpaarungen und in deren Folge zu Punktmutationen, Strang- und Chromosomenbrüchen kommen (McDonald et al., 1993). Solche Vorgänge sind mutagen und spielen bei der Tumorentstehung und -promotion eine Rolle. ROS können Onkogene aktivieren bzw. Tumorsuppressorgene inhibieren, Enzyme und Proteine inaktivieren oder zur Lipidperoxidation führen. Biologische Membranen und subzelluläre Organellen sind durch die dort vorhandenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membranphospholipide gegenüber oxidativen Prozessen empfindlich. Oxidanzien reagieren dabei mit den Fettsäuren und können über radikalische Zwischenstufen das Peroxyradikal generieren. Dieser als Lipidperoxidation beschriebene Vorgang kann zur völligen Zerstörung von Zellmembranen führen. Im Rahmen der Lipidperoxidation entstehen Aldehyde, welche ebenfalls reaktive Eigenschaften besitzen und die Molekülstruktur von Proteinen und Nukleinsäuren schädigen können. Ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation der Membranlipide ist das Malondialdehyd (MDA). Die Empfindlichkeit von Proteinen gegenüber radikalischen Schädigungen hängt von ihrer Aminosäurezusammensetzung ab, da bestimmte Aminosäuren besonders leicht angreifbar sind (Cystein, Histidin, Methionin, Thyptophan, Tyrosin). Das spielt eine ausschlaggebende Rolle in Bezug zur funktionellen Beeinträchtigung durch die oxidative Schädigung, z. B. bei Veränderung wichtiger Bindungsstellen (Akhtaq et al., 1987). Doch nicht nur die direkte Oxidation von Zellbestandteilen kann zur Beeinflussung der Zellhomöostase führen: über die Beeinflussung des intrazellulären Kalziumhaushalts kann es zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Endonukleasen kommen. Diese sind in der Lage, DNA-Moleküle zu fragmentieren (Brömme und Holtz, 1996; Halliwell und Gutteridge, 2000; Richter, 1997).

ROS spielen auch eine Rolle bei essenziellen biologisch/physiologischen Abläufen des Organismus. So wird Superoxid bei Entzündungsreaktionen der unspezifischen Abwehr, wie dem "respiratory burst", in phagozytierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten zur Abwehr von Bakterien benutzt. In das extrazelluläre Milieu abgegebene Superoxidanionen gelten als Teil von chemotaktischen

Faktoren für andere Entzündungszellen (Collins et al., 1995). Als endogene Aktivatoren der phagozytären Superoxidradikalbildung gelten z. B. der Komplementfaktor C5a, Leukotrien B₄ sowie der Tumorpromotor Phorbolmyristylacetat (PMA) (Trush und Kensler, 1991). Des Weiteren sind sie bekannt als Ereignis der Signaltransduktion bei verschiedenen Regulations-mechanismen, wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen, z. B. EGF, TNF-, TGF- oder als Second-Messenger-System über die Aktivierung von NF-κB (Bae et al., 1997; O'Kelly et al., 2000; Martin et al., 1997; Remacle et al., 1995). Wegen ihrer hohen Reaktivität können sie mit allen molekularen Strukturen der Zellen reagieren, was je nach Lebensdauer des Radikals, Bildungsort und Reaktionspartner zu strukturellen und funktionellen Störungen bis hin zum Zelltod führen kann. Durch die zelleigenen Schutz- und Reparatursysteme werden entstandene Schäden zum Teil erkannt und repariert werden können. Bei irreparablen Schäden kann ein Signal in Richtung des programmierten Zelltodes (Apoptose) induziert werden, wodurch geschädigte Zellen aus dem Gesamtorganismus entfernt werden.

Bei der schrittweisen Reduktion des molekularen Sauerstoffs entstehen auf verschiedenen Reduktionsstufen drei reaktive Spezies: Superoxidanionen [$O_2^{\bullet-}$], Wasserstoffperoxid [H_2O_2] und Hydroxylradikale [OH^{\bullet}] (Abbildung 4).

$O_2^{\bullet-}$ werden vorzugsweise durch die Elektronentransportketten in den Mitochondrien gebildet, dieser Weg als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette ist direkt proportional zur Sauerstoffspannung und wird daher auch als wesentlicher Mechanismus der Sauerstofftoxizität diskutiert. Die Entstehung von Superoxidanionen beim Stoffwechsel von Fremdstoffen steht oft in Beziehung zum toxikologischen Erscheinungsbild. Besonders ausgeprägt ist diese Bildung bei Vergiftungen mit dem Herbizid Paraquat (Babior, 1997; Fridovich, 1995; Hassan und Fridovich, 1978). $O_2^{\bullet-}$ sind wegen ihrer Polarität schlecht membranpermeabel. Sie werden durch Superoxiddismutasen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgesetzt. Die effektive Halbwertszeit liegt im Bereich von Millisekunden. Als Folgeprodukte entstehen Wasserstoffperoxid, Peroxynitrite und Hydroxylradikale. Hydroxylradikale können nicht direkt aus Superoxid generiert werden. Superoxidanionen sind jedoch in der Lage, das dreiwertige Eisen in die zweiwertige Form zu überführen (Superoxid-assistierte FENTON-Reaktion) (Gutteridge et al., 1990; Halliwell und Gutteridge, 1992). $O_2^{\bullet-}$ haben eine geringe Reaktivität, eine direkte Interaktion mit DNA, Lipiden oder Aminosäuren ist nur mit geringer Effektivität möglich.

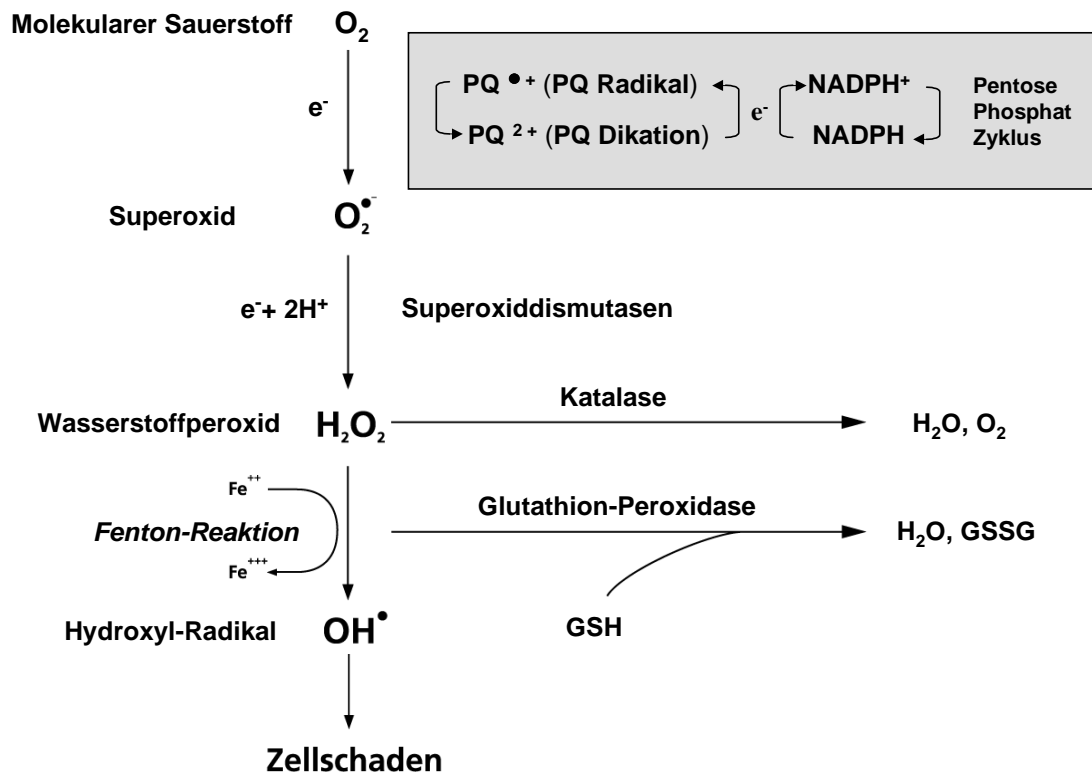


Abb. 4: Reduktion des molekularen Sauerstoffs und Generierung von ROS durch PQ.

Sauerstoff wird in einer Ein-Elektronen-Übertragung (z.B. durch PQ) zum Superoxid-Anion reduziert. Eine weitere Reduktion führt zum Wasserstoffperoxid. Ist zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) vorhanden wird in einer FENTON-Reaktion aus Wasserstoffperoxid das Hydroxyl-Radikal (reaktivstes Radikal) gebildet. Superoxid ist in der Lage Fe^{3+} in Fe^{2+} zu überführen.

Das PQ-Radikal ist in der Lage ein Elektron auf O_2 zu übertragen und kann durch Verbrauch von Reduktions-Äquivalenten (z.B. NADPH) zyklisch weitere Superoxid-Anionen generieren.

(Gram, 1997 und Minikata et al., 1988)

Wasserstoffperoxid aus der Gruppe der nichtradikalischen ROS entsteht unter physiologischen Bedingungen vorrangig in den Peroxisomen, bei verschiedenen Enzymreaktionen als Endprodukt von Oxidationsreaktionen (Chance et al., 1979). Es ist wasserlöslich und sehr gut membranpermeabel. Die biologische Halbwertszeit ist abhängig von den H_2O_2 -abbauenden Enzymen wie Katalase und Glutathionperoxidase, welche für ein Gleichgewicht zwischen Entstehung und Abbau sorgen. Es kann sowohl Oxidations- als auch Reduktionsmittel sein, ist aber selbst wenig reaktiv. Nur ein Teil der Schäden, welche durch H_2O_2 ausgelöst werden, kann auf eine direkte Wirkung zurückgeführt werden, da DNA-Moleküle, Lipide und die meisten Proteine nach einer Inkubation mit H_2O_2 keine Oxidationschäden zeigen (Halliwell und Gutteridge, 2000). Wasserstoffperoxid kann jedoch Metallionen-katalysiert über die FENTON-Reaktion Hydroxyl-Radikale generieren und so z. B. indirekte DNA-Schädigungen verursachen (Schraufstatter et al., 1986; Spencer et al., 1995).

Das Hydroxylradikal entsteht neben der Metallionen-katalysierten Spaltung von Wasserstoffperoxid (FENTON-oder FENTON-ähnliche-Reaktion), aber auch bei Metallionen-unabhängigen Reaktionen, wie der Radiolyse von Wasser (von Sonntag, 1987), z. B. beim Bestrahlen der Haut mit UV-Licht. Das Hydroxylradikal ist das stärkste bekannte ROS und kann nur ein einziges Mal reagieren. Durch sein hohes positives Reduktionspotenzial ist es äußerst reaktiv und kann mit allen Molekülen in einer Zelle sehr schnell reagieren. Schäden werden fast nur am Entstehungsort verursacht, da der Aktionsradius bei ca. 1 nm (eine durchschnittliche Zelle hat einen Durchmesser von ca. 10.000 nm) liegt. Die biologische Halbwertszeit wird auf ca. 1 Nanosekunde geschätzt. Auf Grund der hohen Reaktivität ist OH^\bullet in der Lage, direkt DNA- und Membranmoleküle zu schädigen (Breen und Murphy, 1995; Sancar, 1996; von Sonntag, 1987).

Da die Bildung von ROS eine Begleiterscheinung aerober Lebensweise darstellt, besteht unter normalen Bedingungen in Säugetierzellen ein Gleichgewicht zwischen Oxidanzien und antioxidativ wirkenden Substanzen, zu denen Enzyme (z. B. Superoxiddismutasen, Katalasen, das Glutathionredoxsystem) und nicht enzymatische Antioxidanzien (z. B. GSH, Vitamin A, C, und E, Harnstoff, Bilirubin u. a. m.) gezählt werden. Sie sind die Gegenspieler für Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, aus denen, wie oben beschrieben, entweder spontan oder über enzymatische Reaktionen zelltoxische Sauerstoffradikale entstehen können. Oxidativer Stress entsteht also immer dann, wenn die ROS-Generierung die antioxidative Kapazität übersteigt.

1.7.1. Paraquat

Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid oder Methylviologen), ein quaternäres Ammonium-Herbizid aus der Gruppe der Bispyridinium-Verbindungen zählt zu den wirkungsvollsten aber zugleich hoch humantoxischen Herbiziden. Paraquat (PQ) wurde erstmalig im späten 19. Jahrhundert beschrieben, als Redoxindikator genutzt und ist seit den fünfziger Jahren als Methylviologen bekannt. Seitdem findet es eine breite Anwendung als schnell wirkendes Kontaktherbizid, das seine Wirkung vor allem auf oberirdische Pflanzenteile entfaltet. Es wird im Boden von verschiedenen Mikroorganismen inaktiviert. Die biologische Wirksamkeit dieser Verbindungen resultiert aus der Generierung von oxidativen Stressoren. Im Prozess der Photosynthese findet die Übertragung eines Elektrons (Photosystem I oder über eine Ferredoxin-NADPH⁺ Reduktase) auf Paraquat statt. Das entstehende Radikal ist in der Lage, ein Elektron auf molekularen Sauerstoff zu übertragen, wobei Superoxid entsteht. Das in den Chloroplasten

über diesen Redoxzyklus generierte Superoxid wird zu einem Großteil durch Superoxiddismutasen in H_2O_2 umgewandelt. Da Chloroplasten keine eigene Katalase besitzen und die hohen H_2O_2 -Spiegel nicht durch andere Mechanismen inaktiviert werden können ist das entstehende H_2O_2 für das schnelle Absterben der Pflanzen verantwortlich (Streb et al., 1998).

Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Toxizität in Tieren und dem Menschen angenommen (Abbildungen 4 und 5). Sie ist Resultat der Reduktion von PQ durch verschiedene Enzymsysteme (z. B. NADPH-Cytochrom C-Reduktasen). Die Addition eines einzelnen Elektrons an das PQ-Dikation (PQ^{2+}) führt zum Methylviologen, dem PQ-Radikal ($PQ^{\bullet+}$). $PQ^{\bullet+}$ wiederum kann ein Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen, was zum Superoxid führt und das PQ-Dikation regeneriert. Der Zyklus kann neu beginnen und generiert Superoxid-Anionen, solange ein elektronenübertragendes System, PQ und O_2 vorhanden sind.

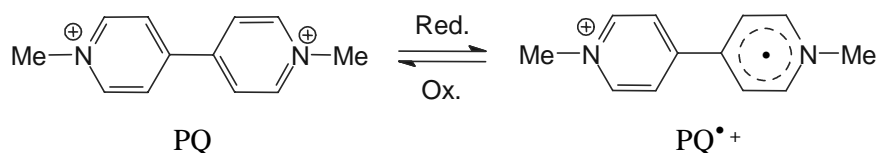


Abb. 5: Paraquat und das Paraquat-Radikal. Die Übertragung eines Elektrons auf Paraquat (PQ) führt zum PQ-Radikal ($PQ^{\bullet+}$). Das zusätzliche Elektron liegt delokalisiert im aromatischen System des PQ-Moleküls vor und kann auf Sauerstoff übertragen werden, wodurch Superoxid entsteht. (Minikata et al., 1988)

Die Aufnahme von PQ erfolgt durch Absorption (Haut), Inhalation oder Ingestion. Es wird gut und schnell vom Gastrointestinal-Trakt resorbiert, Vergiftungserscheinungen können dadurch bereits vor Ablauf einer Stunde auftreten. PQ besitzt einen niedrigen Dampfdruck, wodurch die Gefahr einer Vergiftung durch Inhalation relativ gering ist. Durch die unverletzte Haut können nur kleinere Mengen absorbiert werden. Aufgenommenes PQ verursacht im Säugetierorganismus ein breites Spektrum toxischer Effekte. Betroffen sind vor allem stoffwechselaktive Organe, wie Nieren, Leber, Nervensystem, Herz und Muskelgewebe. Im Mittelpunkt der Schädigungen steht die Lunge, in der die höchsten Konzentrationen von PQ gefunden werden. Es wird in den AI- und AII-Zellen sowie Clara-Zellen über einen energieabhängigen Transportmechanismus akkumuliert, der physiologisch für die Aufnahme biogener Amine wie Putrescin verantwortlich ist. Die Konzentrationen von PQ in der Lunge sind dadurch bis zu fünfzigmal höher als im Blutplasma. Diese selektive Anreicherung und Persistenz im Lungengewebe ist

verantwortlich für die vordergründige Schädigung der Lunge. Die Patienten entwickeln Lungenfunktionsstörungen, erkennbar an Dyspnoe oder Tachypnoe sowie einem nichtproduktiven Husten. Der fibrotische Prozess entwickelt sich dann sekundär zur proliferativen Alveolitis. Der Ausgang ist in den meisten Fällen letal (Ameno et al., 1994; Baldwin et al., 1975; Chen et al., 1992; Hayes und Laws, 1991; Hoet et al., 1993 und 1994; Sion et al., 1989; Smith, 1986).

Zielsetzung

In der Lunge finden zusätzlich zum Gasaustausch verschiedene physiologisch bedeutsame Prozesse statt, z.B. die Umsetzung biogener Amine oder die Clearing-Funktionen gegenüber Stäuben, Fasern oder Aerosolen aus der Atemluft. Die feingewebliche Struktur der Lunge ist durch eine außerordentliche große Oberfläche des respiratorischen Epithels sowie der kapillären Oberfläche gekennzeichnet. Daraus resultiert eine enge Verbindung zwischen Außenmilieu (Atemluft) und Kreislaufsystem (Gefäßlumen). Die sehr komplexe Gewebsstruktur, die für dieses Organ typische topographische Gliederung in Trachea, Bronchien, bronchioläre und alveoläre, d.h. respiratorische Bereiche sowie die polarisierte Verteilung biochemisch-physiologischer Funktionen zwischen verschiedenen Zelltypen und zwischen basalen und apikalen Membranen tragen dazu bei, daß relativ wenig über die Expression von ABC-Transportern und deren Regulation in der Lunge bekannt ist.

Aus primären Hepatozyten-Zellkulturen ist für „multi drug resistance“ Proteine – speziell die *mdr1b*-Isoformen – bekannt, daß Peptidwachstumsfaktoren, Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies an der Regulation von *mdr1b* beteiligt sind. Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch inhalierte Schadstoffe oder im Zusammenhang mit dem „respiratory burst“ bei der Aktivierung von freien pulmonalen Alveolarmakrophagen (PAM) wird als wesentlicher Mechanismus für eine Lungenschädigung durch sogenannte Pneumotoxikantien angesehen. Ziele der vorliegenden Dissertationsarbeit waren daher die Expression der „multi drug resistance“ Proteine MDR1-P-gp, MRP1 und LRP in humanen Lungenzellkulturen und die Sensitivität gegenüber Promotoren reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu untersuchen.

Die Untersuchungen sollten an Primärzellkulturen aus proximalen (Bronchialepithel) und distalen (Pulmonalgewebe) Abschnitten der Humanlunge durchgeführt werden. Die Befunde sollten mit permanenten humanen Lungentumorlinien und mit Primärzellen der Rattenlunge (Alveolar Typ II-Zellen) verglichen werden.

Die Detailziele waren wie folgt:

- Vergleich der *mdr1b* mRNA-Expression in AII-Zellen der Ratte mit Vorbefunden aus Hepatozytenkulturen, insbesondere Adaptation an Primärkultur und Reaktion auf oxidativen Streß
- Expression von funktionell mit dem „multi drug resistance“ Phänomen verwandten Transportern LRP und MRP in Alveolar Typ II-ähnlichen Zellen, H358- und A549-Linien sowie Clarazell-ähnlichen H322-Linie.
- Ermittlung der interindividuellen Variabilität in der Expression von LRP, MRP und P-gp (MDR) in Humanlungenzellkulturen
- Adaptation der Expression von LRP, MRP und P-gp in humanen Lungenzellen in Primärkultur verschiedener Explant-Generationen und Zellpassagen
- Sensitivität von Humanlungenzellkulturen gegenüber Promotoren von ROS auf die LRP-, MRP- und P-gp-Expression in vitro

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.2. Versuchstiere

Für die Präparation von Alveolar Typ II-Zellen (AII-Zellen) der Rattenlunge wurden männliche Ratten (Wistar Hannover) mit einem Gewicht von 100-160 g eingesetzt. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit abwechselnden Hell- und Dunkelperioden von jeweils 12 Stunden gehalten und erhielten Standardfutter (Haltungsdiät Standard, Nr. 1320, Altromin, Lage/ Lippe) und Wasser *ad libitum*.

2.1.3. Zelllinien

Die Zelllinien A549, H358 und H322 (humane Lungentumorzellen) wurden von Professor Wiebel, Institut für Toxikologie, Gesellschaft für Strahlenforschung, München zur Verfügung gestellt. Ursprung der A549 Zellen (+p53) war ein Adenokarzinom der Lunge. Die Zelllinie H358 stammt von einem nicht-kleinzelligen Lungentumor. Dabei handelt es sich um p53 negative Zellen mit AII-Zell-Ursprung. Ebenfalls von einem nicht-kleinzelligen Lungentumor stammen die Zellen der Linie H322. Vom Zelltyp her handelt es sich um Clara-Zellen (nicht zilienträgendes Bronchialepithel) mit einer endogenen p53 Mutation.

2.1.4. Normale humane Bronchialepithelzell- und Lungenzellkulturen

Zur Gewinnung von humanen Bronchialepithelzellkulturen (NHBEZ-Kulturen) und von Lungenzellkulturen (PLZ-Kulturen) wurden Bronchusresektate und Lungengewebsresektate tumorfreier Regionen von Lungenteilresektionen verwendet. Die Patienten wurden aus Krankenhäusern der Umgebung von Halle an das Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität (Herz-Thorax-Chirurgie, Prof. Silber) zur Operation aus klinischer Indikation überwiesen. Der Gewebegewinn zum Anlegen der Kulturen erfolgte aus Resektaten, die nach Gesichtspunkten der Tumorchirurgie entfernt wurden (keine gezielte Gewebsentnahme für Versuche). Alter, Geschlecht, Einnahme von Medikamenten, Rauchgewohnheiten, berufliche Exposition und andere Besonderheiten waren keine Ausschlusskriterien. Personenbezogene Daten wurden protokolliert und anonymisiert. Die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Halle für die Nutzung der Proben zu Forschungszwecken liegt vor.

2.1.5. Chemikalien und Biochemikalien

Alle im folgenden nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Boehringer (Mannheim) und Serva (Heidelberg) bezogen.

Reagenzien für die Zellpräparation und Zellkultur

3,3',5'-Triiodo-L-thyronin (T ₃)	Sigma, Taufkirchen
AECG-Medium	Promo Cell, Heidelberg
Desoxyribonuklease I, Typ 4	Sigma, München
Detach Kit	Promo Cell, Heidelberg
DMEM Trockensubstanz	Gibco, Berlin
epith-o-ser Medium	c-c-pro GmbH, Neustadt/ W.
Fetales Kälberserum	Seromed, Berlin
Fibronektin	Sigma, Taufkirchen
DMEM / HAM-F12 - Fertigpulver	Biochrom, Berlin
HEPES	Seromed, Berlin
Humantransferrin	Sigma, Taufkirchen
Hydrocortisonhemisuccinat	Sigma, Taufkirchen
Kollagen Typ I aus Rattenschwanz	Serva, Heidelberg
L15-Leibovitz Puffer	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen
Liquemin N 25000	Hoffmann/La Roche, Grenzach Wyhlen
N-Acetylcystein	Sigma, Taufkirchen
Natriumselenit	Sigma, Taufkirchen
PBS Instand	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	c-c-pro GmbH, Neustadt/ W.
Pentobarbital	Serva, Heidelberg
Percoll 1,124 g/ml	Pharmacia, Freiburg

Rinderinsulin	Sigma, Taufkirchen
Rinderserumalbumin Fraktion V	Paesel & Lorei, Frankfurt
Trypsin 0,25 % aus Schweinepankreas	Sigma, Taufkirchen
Trypsininhibitor Typ II S	Sigma, Taufkirchen

Effektorzusätze in den Kulturmedien

H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Paraquat (Methylviologen)	Sigma, Taufkirchen

AII-Zellfärbungsreagenzien

Gerbsäure	Sigma, Taufkirchen
Osmiumtetroxid	Sigma, Taufkirchen

Reagenzien für die RNA-, und Protein-Analytik

Für die RNA-Analytik wurden nur DNase- und RNase-freie Chemikalien verwendet. HPLC-Wasser wurde mit Diethylpyrokarbonat versetzt und autoklaviert. Lösungen für die Western-Blot-Analytik wurden aus mikrofiltriertem bidestilliertem Wasser hergestellt.

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Bio-Rad, München
Agarose NEO	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Taufkirchen
Antipain	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
DNase RQ1	Promega, Mannheim
dNTP-Mix	Hybaid-AGS, Heidelberg
E64	Sigma, Taufkirchen
ECL-Reagenzien	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EDTA	Sigma, Taufkirchen

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
High-Range Rainbow Molecular Weight Marker (14-220 kDa)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MMLV-Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg
Natriumvanadat	Sigma, Taufkirchen
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt
Phenanthrolin	Sigma, Taufkirchen
PMSF	Appllichem, Darmstadt
Random Hexamere	Promega, Mannheim
Rinderserumalbumin Fraktion V	Paesel & Lorei, Frankfurt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Sodiurn Dodecyl Sulfate	Boehringer, Mannheim
β 2-Mikroglobulin (180kDa Standard)	Sigma, Taufkirchen
Taq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Tris-Puffer	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
TRIzol TM -Reagenz	Life Technologies, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

RNA-/ Proteinisolierung

Die Isolierung der gesamt-RNA erfolgte nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mittels Trizol-Reagenz (Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion). Aus dem selben Ansatz konnte Gesamt-Protein gewonnen werden. Die Plasmamembranpräparation erfolgte nach Simpson et al. (1983). Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951).

Primer für die PCR

Für die RT-PCR wurden folgende Primer verwendet:

MDR1 (human):	5' CCT ATC ATT GCA ATA GCA GG 3' und 5' GTT CAA AC T TCT GCT CCT GA 3' 167 bp Fragment (Noonan et al., 1990)
MRP1 (human):	5' CTG AGA AGG AGG CGC CCT G 3' und 5' GTG TCC GGA TGG TGG ACT G 3' 614 bp Fragment (Barrand et al., 1994)
LRP (human):	5' CCC CCATAC CAC TAT ATC CAT GTG 3' und 5' TGG AAA AGC CAG TCA TCT CCT G 3' 405 bp Fragment (Stein et al., 1997)
β-Aktin (human):	5' ACG GCT CCG GCA TGT GCA AG 3' und 5' TGA C GA TGCCGT GCT GCA TG 3' 196 bp Fragment (Jantsch, 1997)
mdr1b (Ratte)	5' GAA ATA ATG CTT ATA TGA ATC CCA AAG 3' 5' GGT TTC ATG GTC GTC GTC TCT TGA 3' 325 bp Fragment (Zhang et al., 1996)
β-Aktin (Ratte)	5' TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC 3' 5' GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC 3' 630 bp Fragment (Raff et al., 1997)

Die Primer wurden nach Möglichkeit so gewählt, daß sie in unterschiedlichen Exonen lagen, um cDNA-Amplifikate von DNA-Verunreinigungen unterscheiden zu können. Die Synthese erfolgte durch die Firma Genaxis (Göttingen).

Antikörper

LRP wurde mit dem monoklonalen Antikörper LRP56 (Monosan) nachgewiesen. Als sekundärer Antikörper diente ein Peroxidase gekoppelter, human-präabsorbierter Antikörper (Ziege, anti-Maus; Sigma). Für die MRP-1 Detektion wurde der primäre monoklonale Antikörper MRPr1 (Ratte; Kamiya Biomedical Company,) eingesetzt. Der sekundäre, Peroxidase gekoppelte Antikörper (Ziege, anti-Ratte) stammte von ICN Biomedicals GmbH, Eschwege.

Photochemikalien

Die Entwicklung der ECL-Filme erfolgte mit D-19 Entwickler und Fixierer von Kodak.

2.1.6. Geräte/ Materialien

-Analysenwaage BP 221 D	Sartorius, Göttingen
-Auswertungssoftware Tina 2.09	Raytest, Berlin
-Autoklav 3.021	Schütt, Göttingen
-Axioskop 20 mit Fluoreszenzleuchte	Zeiss, Jena
-Biofuge fresco Kühlzentrifuge	Heraeus-Instruments, Hanau
-Chamber Slides, Lab Tek II	Nunc, Wiesbaden
-Brutschrank BBD 6220	Heraeus-Instruments, Hanau
-Einmal-Kunststoffpipette: 1, 5, 10, 25 ml	TPP, Schweiz
-Einmal-Küvetten, 1,5 ml Halbmikro, PS	Brand, Wertheim
-Entsorgungsbeutel aus PP	Brand, Wertheim
-Eppendorf-Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
-Filter-Pipettenspitzen	Peqlab, Erlangen
-Flachbett-Scanner	Hewlett Packard
-Folienschweißgerät „Folio“	Severin, Sundern
-Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Brand, Wertheim
-Gewebehomogenisatoren 2, 10, 30 ml	Wheaton
-GS-15R Zentrifuge	Beckman, USA
-Taumler Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
-horizontale Elektrophoresekammer	Biotech Fisher, Reiskirchen
-Homogenisator Ultrathurrax T25	IKA Labortechnik, Staufen

-HPLC-Apparatur	Merck, Darmstadt
-Hybridisierungssofen OV5	Biometra, Göttingen
-Hyperfilm-ECL	Amersham, Braunschweig
-Imaging plates cassette, Fuji	Amersham, Braunschweig
-Inversmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
-Kaltlichtlampe Halolux 150	Faust, Schaffhausen, Schweiz
-Kryostat Haake KT2 mit Umlaufpumpe	Haake, Karlsruhe
-Kulturgefäße	Nunc, Wiesbaden und TPP, Schweiz
-Laminarbank Gelaire	Gelman-Instruments
-Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
-Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
-Vertikal Elektrophorese Hoefer SE 280	Amersham, Braunschweig
-Mikroliterspritzen	Hamilton Deutschland, Darmstadt
-Mikroskop Technival 2	Zeiss, Jena
-Mikroskopkamera MC 80	Zeiss, Jena
-Naßtransfer-Einheit Hoefer TS 22	Amersham, Braunschweig
-Nylonnetze, Nytal Monofilament 250 µm und 60 µm,	Schweizerische Seidengazefabrik Thal, Schweiz
-PCR-Gefäße, 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
-Photometer DU 7500	Beckman, München
-Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnbrecht und TPP, Schweiz
-Quarz Küvetten 1 ml	Hellma, Müllheim
-Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
-Rodent Ventilator 7025	HSE-Hawardt, March-Hugstetten
-Sartolab-P-plus Filter (0,2+0,45 µm)	Sartorius AG
-Schlauchpumpe Cyclo I	Roth, Karlsruhe
-Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
-Sterilbank HERA-safe	Heraeus-Instruments, Hanau
-Sterilbank HERA-safe H12	Heraeus-Instruments, Hanau
-Stromversorgungsgeräte Phero Stab	Biotech Fisher, Reiskirchen

-Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
-Tiefkühlschrank -80°C , „Herafreeze“	Heraeus-Instruments, Hanau
-Tierhaltungsschrank Scantainer	Scanbur, Dänemark
-Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
-Trockenschrank SUT 6200	Heraeus Instruments, Hanau
-Ultrazentrifuge XL-100	Beckmann, USA
-Umlaufwasserbad Haake DC1/ B3	Haake, Karlsruhe
-UV WinLab Software	Perkin Elmer, Überlingen
-UV/ VIS Spektrometer Lambda 14	Perkin Elmer, Überlingen
-UV-Tisch + CSC-Kamer	Raytest, Berlin
-Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
-Waage BL 150	Sartorius, Göttingen
-Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
-Whatmann 3MM Chromatographiepapier	Biometra, Göttingen

2.2. Methoden

2.2.1. Sterilisation von Materialien und Lösungen

Einmalartikel für die Zellpräparation sowie Zellkultur wurden steril verpackt gekauft. Hitzebeständige Glas- und Plastikmaterialien sowie Lösungen wurden durch Autoklavieren bei 120°C sterilisiert. Nicht hitzebeständige Lösungen konnten sterilfiltriert werden, wobei sich die eingesetzten Sterilfilter von 0,45 µm oder 0,2 µm Porenweite nach Grad der Sterilität und Konsistenz der Lösungen richteten.

2.2.2. Splitten und Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in 58 cm² Kulturflaschen in DMEM ("Dulbeccos's minimal essential medium") mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 20.000-30.000 Zellen pro cm², Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche. Bei Erreichen von 80 % konfluentem Wachstum (etwa alle 7-10 Tage) wurden die Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,1 % in PBS) abgelöst und subkultiviert. Für Induktions-Experimente wurden 10 cm² bzw. 21 cm² Kulturschalen verwendet und die Zellen in einer Dichte von 50.000 Zellen pro cm² ausplattiert. Alle Inkubationsansätze wurden bei 80 % subkonfluentem Wachstumsstadium (3. oder 4. Kulturtag) durchgeführt.

PBS: 136 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 8,2 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,4

2.2.3. Isolierung von AII-Zellen der Rattenlunge

Die AII-Zell-Isolierung erfolgte in Anlehnung an die von Dobbs et al. 1986 beschriebene und von Richards et al. 1987 modifizierte Methode. Die gesamte Isolation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und dauerte im Mittel 5 h. Mit Ausnahme der Enzyme wurden alle Lösungen eisgekühlt eingesetzt und die Petrischalen mittels einer eigens angefertigten, in die Sterilbank eingelassenen Kühlkammer auf 4°C temperiert. Sämtliche Zentrifugationen wurden bei 4°C durchgeführt. Die in der Isolation verwendete DMEM-Lösung wurde zur Protektion der Zellen mit 3 % Rinderserumalbumin versetzt. Eine Übersicht der durchgeführten Isolationsschritte gibt die Abb. 6.

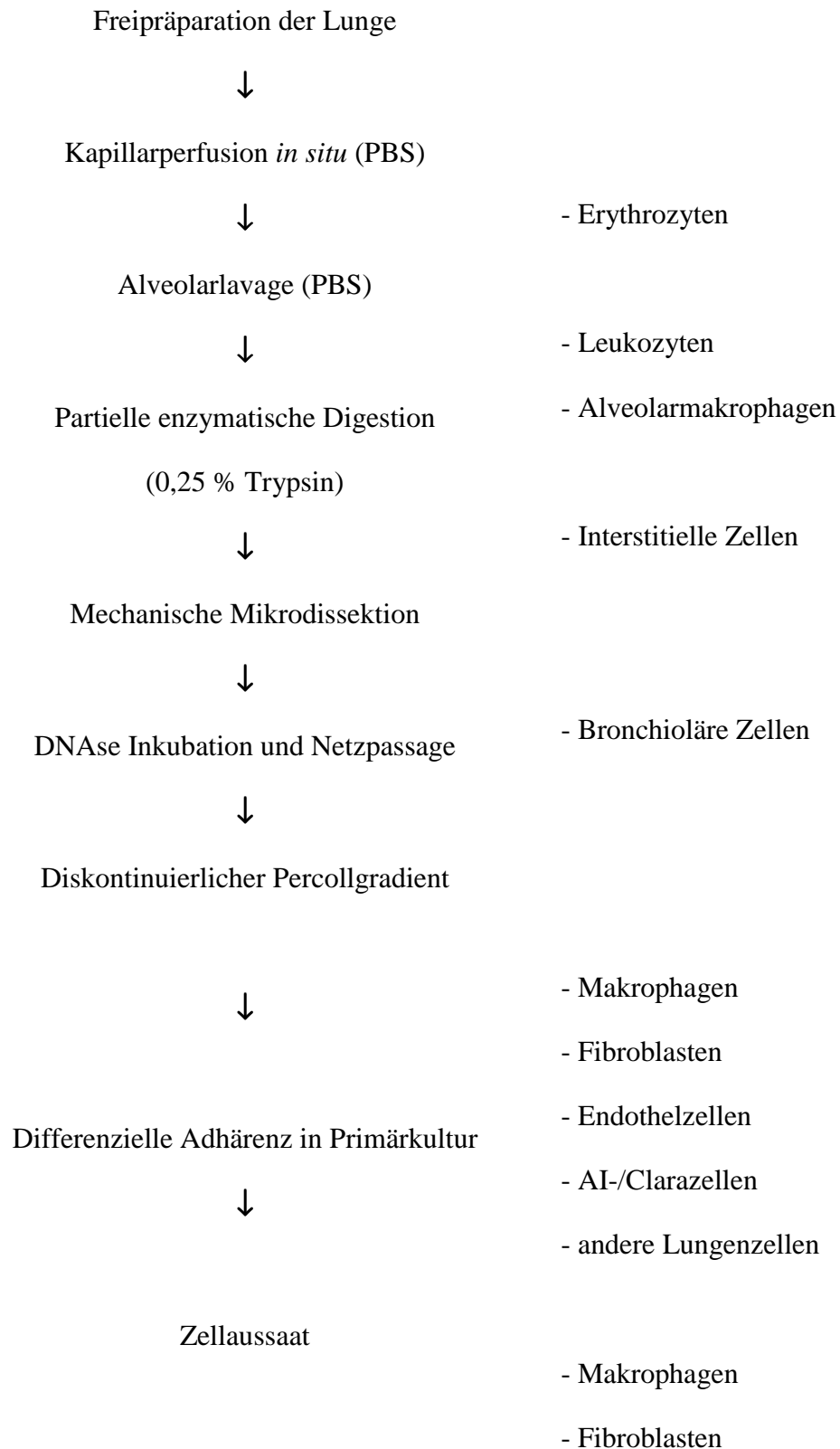


Abb. 6: Schematische Darstellung der Isolierung von AII-Zellen aus pulmonalem Gewebe von Ratten.

Vor Operationsbeginn wurden die Tiere durch Injektion von Pentobarbital-Na (intraperitoneal, 50 mg/kg Rattengewicht) narkotisiert. Die anschließende Gabe von Heparin (2500 I.E./kg) diente der Verhinderung einer intraoperativen Blutgerinnung. Anschließend erfolgte die Darstellung der Trachea, eine Tracheotomie und die Einbindung eines Katheters. Nach Eröffnung des Brustkorbes wurde die Lunge über den Trachealkatheter mit 60 x 1,2 ml Luft pro min ventiliert. Nach der Thorakotomie wurde ein weiterer Katheter durch eine Inzision in der rechten Herzkammer in den Truncus pulmonalis platziert. Der Katheter wurde fixiert und die Lunge sofort mit kalter PBS-Lösung perfundiert. Anschließend wurden die linke Herzkammer und der linke Vorhof entfernt. Durch stumpfe Präparation erfolgte die Mobilisierung der Lunge und der Trachea en bloc.

Nach Isolierung der Lungen wurden die Lungenpräparate in ein mit eiskalter PBS-Lösung gefülltes Plastikzentrifugenröhrchen überführt und über den Trachealkatheter an einen Adapter im Verschlussdeckel des Röhrchens gehängt. Um ein Kollabieren der Lungenflügel zu vermeiden, wurden über den Adapter mit einer aufgesetzten Spritze ca. 6 ml PBS-Lösung instilliert. Zur Entfernung von Makrophagen und Leukozyten erfolgte eine Alveolarlavage. Dazu wurden die Lungen über den Trachealkatheter dreimal mit je 8 ml PBS-Puffer gefüllt und wieder entleert. Anschließend wurden die Lungen in ein neues Röhrchen überführt und in einem Wasserbad bei 37°C für zweimal 15 min mit jeweils 7 ml Trypsinlösung inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Lungen wieder in eine mit kalter PBS gefüllte Petrischale überführt und mit 10 ml eiskalter Trypsininhibitor-Lösung gefüllt. Trachea, Bronchien, Ösophagus und verbliebenes Myocard wurden entfernt und die einzelnen Lungenlappen voneinander separiert. Die sich anschließende Mikrodissektion des Gewebes wurde unter 4-6facher Vergrößerung und Verwendung zweier Mikropinzetten vorgenommen. Dabei wurden von dem am Bronchialgewebe gehaltenen Lungenlappen kleinere Gewebestückchen abgezupft, Bronchial- und Bindegewebe wurde verworfen.

Das auf der Oberfläche aufschwimmende Alveolargewebe wurde mit einer abgeschnittenen Transferpipette in 20 ml vorgewärmte DNase (Deoxyribonuklease) 250 Lösung überführt und für 10 min bei 37°C auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min inkubiert. Um eine endgültige Gewebelyse zu erreichen, schloss sich eine zweimalige Netzpassage der Zellaggregate durch Nylonnetze der Porengröße 250 µm und 60 µm an, bei der zum Verreiben des Gewebes die Schultern von 10 ml Glaspipetten verwandt wurden. Während der Netzpassage wurde DMEM-Lösung zugegeben, die resultierende

Zellsuspension 8 min bei 140 g zentrifugiert und die Zellen erneut in 10 ml DMEM-Lösung aufgenommen. Zur Aufreinigung der AII-Zellen wurden zwei diskontinuierliche Percolldichtegradienten mit je 5 ml der Suspension überschichtet und für 30 min ohne Bremse bei 250 g zentrifugiert. Anschließend wurden die sich zwischen den beiden Percolldichten als weißer Ring darstellenden AII-Zellen unter Kaltlicht mit einer 1 ml-Spritze mit aufgesetzter Kanüle abgesaugt und in 3 ml DNase 50 plus 5 ml DMEM-Lösung resuspendiert. Nach Zentrifugation für 8 min bei 140 g wurde der Überstand dekantiert und das AII-Zell-Pellet in 5 ml Medium aufgenommen.

<u>PBS ohne Ca/Mg (10fach)</u>	1,38 M	NaCl
	27 mM	KCl
	80 mM	Na ₂ HPO ₄
	15 mM	KH ₂ PO ₄

Autoklavierung der 10-fach konzentrierten Stammlösung und Einstellung des pH-Wertes (7,4) nach Versetzen mit Ca²⁺/Mg²⁺

<u>PBS mit Ca/Mg (pH 7,4):</u>	138 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,0 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	0,5 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	0,9 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O

Sterilfiltration der Lösung durch einen 0,2 µm Filter

<u>DMEM-Lösung:</u>	0,99 % (w/v)	DMEM
	11 mM	NaHCO ₃
	10 mM	HEPES
	3 % (w/v)	Rinderserumalbumin
	50 I.E./ml	Penicillin/Streptomycin

DMEM-Lösung wurde mit 1 M HEPES-Puffer (pH 7,4) versetzt. Die Lösung wurde vor Zugabe von Penicillin/Streptomycin durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert. Vor dem

Sterilfiltrieren wurden 5 ml der sterilen, gebrauchsfertigen Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 I.E./ml) in der Flasche vorgelegt. Die fertige Lösung wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch in 5 ml Portionen aliquotiert.

Trypsin (0,25 %): Trypsin wurde gebrauchsfertig in Lösung bezogen, in Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

Trypsininhibitor: 500 mg Trypsininhibitor wurden in 100 ml DMEM-Lösung gelöst, durch 0,45 µm Filter sterilfiltriert und in je 20 ml aliquotiert (Lagerung bei -20°C).

<u>DNase 250:</u>	75 % (v/v)	PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
	0,025 % (w/v)	DNase
	25 % (v/v)	Fetales Kälberserum
	10 I.E./ml	Penicillin/Streptomycin

Nach Lösen der DNase in PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ und Sterilfiltration der Lösung durch 0,45 µm Filter erfolgte die Zugabe von sterilem fetalen Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (Lagerung in 20 ml Aliquots bei -20°C).

<u>DNase 50:</u>	20 % (v/v)	DNase 250
	60 % (v/v)	PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
	20 % (v/v)	Fetales Kälberserum
	10 I.E./ml	Penicillin/Streptomycin

Lagerung in 4 ml Aliquots bei -20°C

<u>Percoll (hohe Dichte, pH 7,4):</u>	61,28 % (v/v)	Percoll
	9,44 % (v/v)	PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
	4,72 % (v/v)	Fetales Kälberserum

<u>Percoll (niedrige Dichte, pH 7,4):</u>	25,90 % (v/v)	Percoll
	9,52 % (v/v)	PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
	4,76 % (v/v)	Fetales Kälberserum

Die Percoll-Lösungen wurden auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, durch 0,45 µm Filter steril filtriert, zu je 10 ml aliquotiert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

<u>AII-Medium:</u>	<u>Endkonzentrationen</u>	<u>Stammlösungs-</u> <u>konzentrationen</u>	
	12,11 g/l	DMEM / HAM F-12	
	29 mM	NaHCO ₃	
	10 I.E./ml	Penicillin/Streptomycin	
	3 % (v/v)	Fetales Kälberserum	
	0,5 ‰ (w/v)	Humantransferrin	5 mg/ml
	4,75 pM	3,3',5'-Triiodo-L-thyronin	95 nM
	50 nM	Na-Selenit	5 mM
	50 nM	Hydrocortison	2 mM
	10 mM	HEPES	1 M (pH 7,4)
	0,5 ‰ (w/v)	Insulin	1 mg/ml

DMEM / HAM F-12 Fertigpulver wurde in 800 ml bidestilliertem H₂O gelöst, mit NaHCO₃ und HEPES Stammlösung versetzt, mit bidestilliertem H₂O auf 970 ml aufgefüllt, durch 0,2 µm Filter sterilfiltriert, portioniert (50 bzw. 100 ml) und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Von den Supplementierungen wurden jeweils Stammlösungen hergestellt, die angegebenen Volumina zusammenpipetiert und in Aliquots aufgeteilt. Das fetale Kälberserum wurde in 1,5 ml und 3 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor jeder Zellaussaat wurden 48 ml der DMEM/HAM F-12-Lösung mit 355 µl des Supplementcocktails und 1,5 ml des fetalen Kälberserums versetzt.

Differenzielle Adhärenz

Für die weitere Aufreinigung der isolierten Zellen wurde ausgenutzt, dass AII-Zellen eine im Vergleich zu Makrophagen und Fibroblasten verzögerte Adhärenz aufweisen. Für die differenzielle Adhärenz wurden die pro Präparation isolierten Zellen in 5 ml AII-Medium in einer unbeschichteten 58 mm Kulturschale ausplattiert und für 1 h inkubiert (5 % CO₂, 95 % Luft, 37°C, H₂O-Sättigung). Nach Abnehmen der überstehenden Suspension mit den nicht adhärennten Zellen erfolgte die Bestimmung von Anzahl und Anteil vitaler Zellen (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer). Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens einer

0,25 %igen Trypanblaulösung zu der Zellsuspension konnten dabei zwischen lebenden Zellen (ungefärbt), toten Zellen und Zelltrümmern (blau) unterschieden werden.

2.2.4. Kultivierung von AII-Zellen

Unter Standardbedingungen wurden die Polystyrol-Petrischalen zur Kultivierung der AII-Zellen mit aus Rattenschwänzen gewonnenem Typ I Kollagen beschichtet. Dazu wurde die kommerziell verfügbare Kollagen-Lösung mit sterilfiltrierter Essigsäure (0,02 %) auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und 40 µl pro 35 mm Kulturschale mit einem sterilen Glasspatel verteilt. Die Kulturschalen wurden vor der Zellaussaat unter der Sterilbank getrocknet. Routinemäßig wurden die aus der Präparation zweier Versuchstiere gewonnenen Zellen in AII-Medium verdünnt. Zur Zellaussaat wurden je 2,5 ml Zellsuspension pro 35 mm Kulturschale ausgesät (Zelldichte: $0,3 \times 10^6$ - $0,4 \times 10^6$ Zellen/cm²) und die Zellen durch leichtes Schwenken gleichmäßig auf der Kulturschale verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % Luft und H₂O-Sättigung. Der Medienwechsel erfolgte alle 24 h. Nach Beendigung der gewünschten Kulturdauer oder Effektorbehandlung wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden entweder sofort der RNA- bzw. Protein-Isolierung zugeführt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5. Gewinnung und Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen und Lungenparenchymzellen

Durch Vorarbeiten von Herrn Thomas Stock (Etablierung der Kultivierungsmethode) und Frau Dr. Dorothee M. Runge (erste Anwendungsversuche), wurde die Methode der Kultivierung normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und peripherer Lungenzellen (PLZ) (modifiziert nach Lechner und La Veck, 1985) im Institut für Umwelttoxikologie etabliert.

Die Bronchus- und Lungen-Resektate stammen von Lungenteilresektionen. Sofern ein Tumor den Resektionsgrund darstellte, wurde nach pathologischer Begutachtung nur gesundes Gewebe distal des tumorösen Bereiches gewählt. Die Organstücke wurden nach der Entnahme mehrmals mit kalter PBS gewaschen und gekühlt in L-15-Puffer transportiert. Der Bronchusbaum wurde vom übrigen Lungengewebe mechanisch, mittels Scheren und Pinzetten, unter sterilen Bedingungen getrennt und gesäubert. Der Bronchus und das Lungengewebe wurden in ca. 0,2 - 0,5 cm² große Stücke geteilt. Die so erhaltenen

Gewebestücke wurden auf beschichteten Kulturschalen (Kollagen 2 %; Fibronectin 1 %; Rinderserumalbumin 0,1 % in L15-Medium) ausgebracht. Nach einer Antrocknungszeit von 5 Minuten wurde serumfreies Medium hinzugegeben. NHBEC-Kulturen erhielten epith-o-ser Medium (10 µg/ml Insulin; 0,205 µg/ml Dexamethason; 10 µg/ml IGF; Rinder-Epiphysenextrakt). Die Zellen der peripheren Lunge wurden in AECG-Medium (0,4 % Rinderhypophysenextrakt; 0,5 ng/ml EGF; 5 µg/ml Insulin; 0,5 µg/ml Hydrocortison; 0,5 µg/ml Epinephrin; 6,7 ng/ml Triiodothyronin; 10 µg/ml Transferrin; 0,1 ng/ml Retinolsäure) kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte zweimal wöchentlich.

Nach zwei bis drei Wochen zeigte sich ein subkonfluent (80 - 90 %) Zellrasen (1. Generation). Die Gewebestücke konnten zum Auswachsen weiterer Generationen mehrmals auf neue Kulturschalen umgesetzt werden, PLZ-Monolayer konnten enzymatisch abgelöst und passagiert werden. Zum Passagieren wurde der Detach-Kit (Promo Cell, Heidelberg) verwendet.

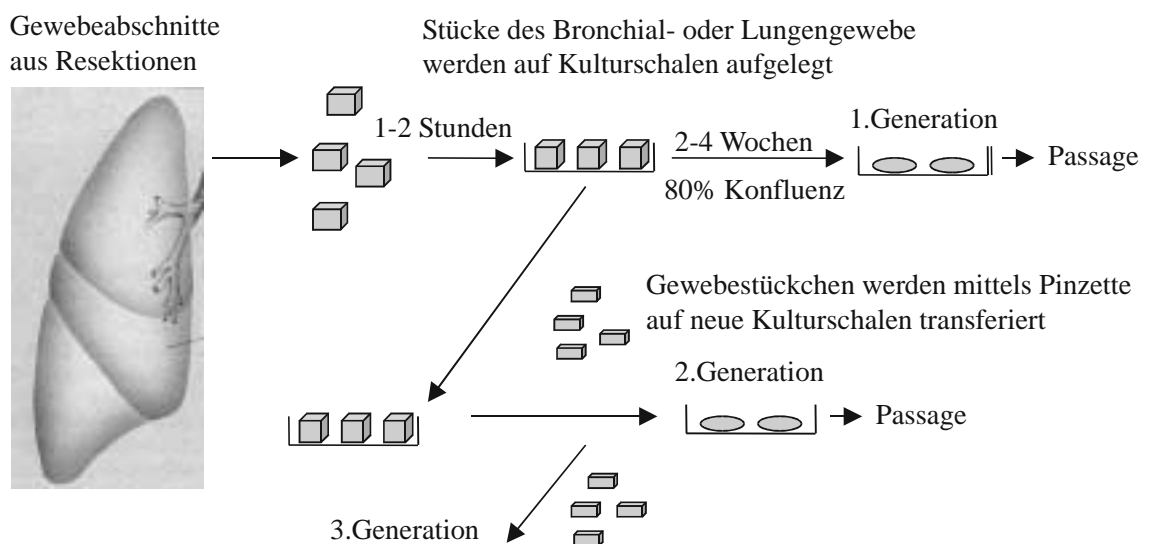


Abb.7: Schema der Gewinnung von Auswachskulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen und Lungenparenchymzellen aus Resektionsmaterial

2.2.6. AII-Zell-Charakterisierung

Um einen morphologischen Nachweis über die Reinheit der AII-Zellkulturen zu führen, wurden die charakteristischen osmiophilen Lamellenkörperchen in den Zellen mittels Osmiumtetroxid-Tanninsäure-Färbung nach Mason et al. (1995), nachgewiesen. Während sich die Lamellenkörperchen der AII-Zellen durch diese Färbung als schwarze Punkte im Lichtmikroskop darstellen, werden eventuell cokultivierte Fibroblasten sowie Makrophagen nicht angefärbt. Zur Färbung war es notwendig, die kultivierten AII-Zellen nach 72 h Kultur mit 1,5 % Glutaraldehyd-Lösung (in PBS) für 15 min zu fixieren. Die Kulturen wurden anschließend 2 x mit PBS gewaschen und mit 1 % Osmiumtetroxid (in PBS) für 1,5 h inkubiert. Nach erneutem 2 maligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen für 12 h einer Inkubation mit frisch angesetzter Gerbsäurelösung (1 % in PBS, pH 6,8) unterzogen. Nach diesem Färbeschritt wurde 2 x in PBS und 2 x in destilliertem Wasser gewaschen und die Präparate in 0,1 % Natriumazid (in H₂O) aufbewahrt. Die Zellen konnten unter dem Lichtmikroskop beurteilt und zur Dokumentation fotografiert werden.

2.2.7. Charakterisierung der NHBEZ- und PLZ-Kulturen

Die eindeutige Charakterisierung dieser Epithelzellkulturen erfolgte mittels immunhistochemischer Methoden. Dazu wurden die Kulturen mittels Antikörpern gegen CD 68 (Monozyten und Makrophagen), Desmin (Muskel), LCA (T-Zellen, Leukozyten), SMA (Fibroblasten), Vimentin (Mesoderm) und die Zytokeratine 7, 8/ 18 und 19 (Epithelium) untersucht (Frau Dr. C. Taeye, Institut für Pathologie).

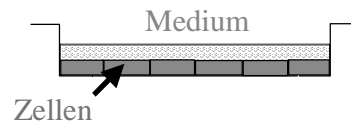
Die Zellkulturen wurden in Chamber Slides (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Nach Fixierung mit 70 %igem Ethanol (5 min) erfolgten die Inkubationen mit den primären (50 min, RT) und den Biotin-gekoppelten sekundären Antikörpern (30 min, RT). Zur Visualisierung wurden die Zellen mit Avidin-Biotin-Komplex-Reagenz (30 min, RT) und Aminoethylkarbazol inkubiert. Abschließend erfolgte eine Hematoxylin-Gegenfärbung. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit PBS gewaschen.

2.2.8. Kollagengelherstellung

Um den Einfluß von Kultur- und Matrixbedingungen zu untersuchen wurden die Zellen zusätzlich zu den Normalbedingungen (s.o.) auf Kollagengelen und auf Filterinserts mit Kollagengelen ausgesät. Das Herstellen der Gele erfolgte nach Herstellervorschrift (Serva, Heidelberg). Dazu wurden 10fach konzentriertes Medium mit 0,34 M NaOH (Verhältnis 2:1) versetzt und davon 0,4 ml mit 1,7 ml Kollagenlösung (2 mg/ml) gemischt und auf eine 21 cm² Kulturschale gegeben. Das Gel wurde zum Festwerden 30 min im Brutschrank inkubiert. Vor Gebrauch wurde 24 h mit Medium dialysiert. Für die Filterinserts wurde der Fläche entsprechend weniger Gel angesetzt. Eine Übersicht der verschiedenen Kulturbedingungen gibt Abb. 8.

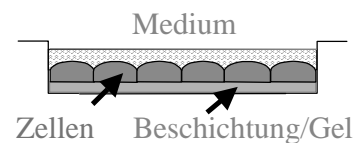
Kultur auf Plastikoberflächen

(Lungentumorlinien A549, H358, H322)



Kultur auf beschichteten Schalen oder auf Kollagengel

(Epithelzellen: NHBEC, PLC, AII-Zellen)



Kultur auf Kollagengel-Filterinserts

(Spezialmethode für Lungenpithelzellen: zB. AII-Zellen) Möglichkeit der Aufrechterhaltung und Wiedergewinnung der Morphologie und lungenspezifischer Funktionen (z.B.Surfactantproduktion von AII-Zellen)

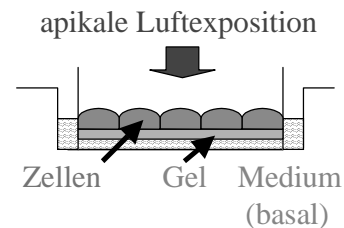


Abb. 8: Überblick über verwendete Zellkulturmethoden

2.2.9. Elektronenmikroskopie

Um weitere Rückschlüsse auf die Morphologie der Kulturen zu erhalten, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt (Fr. Dr. D.B. Stolz, Fachbereich Zellbiologie, Universität Pittsburgh, PA). Dazu wurden die auf beschichteten Kammerdeckgläsern kultivierten Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 2,5 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Nach einstündiger Inkubation mit 1 % Osmiumtetroxid in PBS erfolgten Aufnahmen (80 kV) mit einem JOEL JEM 1210 Elektronenmikroskop.

2.2.10. Behandlung der Zellkulturen

Für die Expositionsversuche wurde eine 100 mM PQ-Stammlösung (in 0,8 % NaCl) hergestellt, kühl und dunkel gelagert. Die Herstellung einer 100 mM Wasserstoffperoxidlösung erfolgte erst kurz vor Versuchsbeginn aus einer 30 %igen Lösung.

Die Stammlösungen wurden den Kulturmedien zum Erreichen der gewünschten Konzentrationen zugegeben.

2.2.11. Bestimmung der Zytotoxizität

Als Zytotoxizitäts- bzw. Vitalitätsnachweis diente der MTT-Test (Carmichael, 1987; Gerlier, 1986; Moosmann, 1983). Er basiert auf der Umwandlung des schwach gelben 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromids (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen zum dunkelblauen, Wasser-unlöslichen Formazan. Die Farbstoffbildung ist der Aktivität der Dehydrogenasen und damit der Überlebensrate der Zellen proportional. Hierbei kann jedoch nicht zwischen der Gesamtreaktion einer Zellpopulation und der Reaktion einzelner Zellen der Population unterschieden werden.

Nach Abnahme des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Kulturen mit MTT-Lösung (0,7 mg/ml in PBS) für 30 min im Brutschrank inkubiert. Dem Entfernen der Überstände und dem zweifachen Spülen mit PBS folgte das Lösen des gebildeten blauen Formazans aus den Zellen mit einem Gemisch aus Isopropanol/ Ameisensäure (19:1). Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde die Extinktion bei 570 nm gegen Isopropanol / Ameisensäure vermessen (Dreifachbestimmungen).

2.2.12. HPLC-Analytik von Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) im Kulturmedium wurde mittels einer modifizierten HPLC-Methode nach Drapper et al. (1993) bestimmt. Die Medienüberstände wurden mit 25 mM Phosphatlösung, einer gesättigten Thiobarbitursäure-Lösung (100 mM) und 0,2 % Butylhydroxytoluol versetzt und 30 min bei 93°C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe wurden jeweils 20 µl bei Raumtemperatur auf eine Nova Pak C18 Stahl-Säule (3,9 x 150 mm, 4 µm Partikelgröße) aufgetragen. Der TBS-MDA Komplex wurde mit einer mobilen Phase aus Acetonitril (20 %) und Tetrahydrofuran (9,6 %) in Phosphat-Lösung (5 mM, pH 6,7) bei 553 nm mittels Reversed-Phase-HPLC quantifiziert. Die Retentionszeit betrug 3,10 - 3,20 min. Tetrahydropropan diente als Standard.

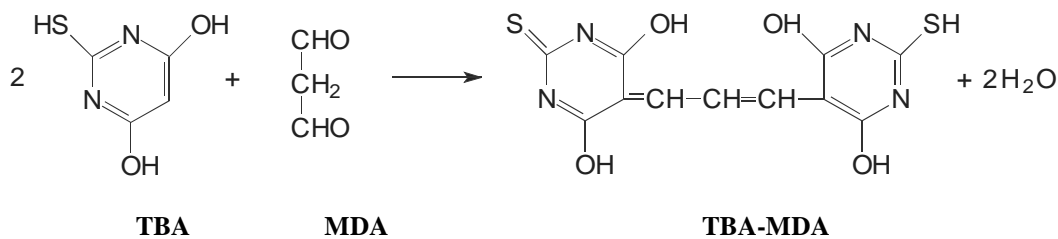


Abb. 9: Nachweisreaktion von Malondialdehyd (MDA). Prinzip der Bestimmung mittels HPLC, Thiobarbitursäure (TBA) + MDA zum TBA-MDA Farbstoffkomplex.

2.2.13. Quantitative Paraquatbestimmung im Kulturmedium

Der Nachweis wurde in Abwandlung einer einfachen spektrophotometrischen Methode durchgeführt, welche in der klinischen Toxikologie zur Quantifizierung von PQ in Körperflüssigkeiten Verwendung findet (Daldrup et al., 1995; Kneipil, 1977). Das Prinzip basiert auf der Messung des PQ-Radikals, das nach Zugabe eines Reduktionsmittels unter alkalischen Bedingungen stabilisiert wird. Als Reduktionsmittel dient Natriumdithionit. Zum Luftabschluss wurde Hexan über die Proben geschichtet. Die Reduktionsmittellösung (1% Natriumdithionit in 0,1 mM Natronlauge) wurde immer erst kurz vor Gebrauch hergestellt und auf Eis gehalten. Als Extraktionsmittel und zur Protein-Denaturierung diente ein Gemisch aus 80 % Chloroform und 20 % Ethanol (96 %). In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden zu 1 ml Probe 750 µl Extraktionsmittel pipettiert und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden ca. 0,5 g Natriumthiosulfat-5-hydrat zugegeben und so lange intensiv geschüttelt bis sich das Salz vollständig gelöst hatte. Nach Zentrifugation bei 2.000 g für 10 min wurden 200 - 600 µl vom Überstand in eine Quarzküvette überführt. Das Küvettenvolumen (1 ml) wurde mit Natriumdithionit-Lösung aufgefüllt,

kurz verrührt und sofort mit Hexan (100 µl) überschichtet. Die Extinktion wurde bei 396 nm gegen den Reagenzienleerwert Medium ohne PQ vermessen. Zur Erstellung einer Eichgerade dienen verschiedene PQ-Konzentrationen im Medium.

2.2.14. RNA-Isolierung

Gesamtzelluläre RNA wurde nach einer Modifikation der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mittels Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des Trizol-Reagenz isoliert. Zur Isolierung wurden in der Regel ca. 100 mg Gewebe, 5 bis 15 Millionen frisch isolierte Zellen oder kultivierte Zellen einer 35 mm Petrischale eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten die einzelnen Isolierungsschritte bei Raumtemperatur unter ausschließlicher Verwendung RNase-freier Lösungen und Materialien.

Gewebematerial wurde zunächst in flüssigem N₂ in einer Porzellanschale mit einem Mörser zerkleinert und unter sofortiger Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Kultivierte Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz pro 10 cm² Kulturfläche durch mehrmaliges Pipettieren der Lösung abgelöst und ebenfalls in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolierung von RNA aus frisch isolierten Zellen wurde die bei -80°C gelagerten AII-Zell/Trizol-Reagenz-Aliquots eingesetzt.

Die Proben wurden zur vollständigen Lyse 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 s durchmischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben weitere 2 - 3 min inkubiert und danach bei 12000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige, RNA-enthaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt, die untere phenolische Phase sowie die Zwischenphase für die Proteinisolierung bei -20°C aufbewahrt. Die wässrige Phase wurde zur RNA-Fällung mit 0,5 ml Isopropylalkohol versetzt, durchmischt und für 10 min inkubiert. Nach der sich anschließenden Zentrifugation (12.000 g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (10.000 g bei 4°C für 5 min) wurde der Überstand entfernt, das Pellet für ca. 10 min an der Luft getrocknet. Die Gesamt-RNA wurde je nach Menge und Ausgangsmaterial in 20 - 40 µl DEPC-H₂O₂ aufgenommen und abschließend für 10 min bei 60°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei sofortiger Weiterverarbeitung auf Eis, oder bei -80°C.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl RNA-Probe auf 1 ml mit DEPC-H₂O verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient 260 nm / 280 nm diente zur Qualitätskontrolle der Präparation und lag zwischen 1,8 und 2. Die Konzentration der RNA ergab sich aus der optischen Dichte bei 260 nm ($1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \text{ µg/ml}$).

2.2.15. Reverse Transkription und PCR

Vor der Reversen Transkription wurden je 2 µg Gesamt-RNA für 30 min bei 37°C mit RNase-freier DNase (1 unit/ µg RNA) inkubiert (10 µl Ansatz: 40 mM Tris HCl pH 8; 1 mM MgSO₄; 1 mM CaCl₂. Der DNA-„Verdau“ wurde durch Zugabe von 1 µl Stop-Puffer (20 mM EGTA, pH 8,0) und Behandlung für 10 min bei 65°C beendet. Zur Probe wurden anschließend 500 ng Random-Hexamere gegeben und für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 5x Reaktionspuffer (50 mM Tris HCl, pH 8,0; 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT) und dNTP-Mix wurde die cDNA-Synthese bei 37°C für 60 min durchgeführt und bei 94°C für 5 min beendet. Die so erhaltene cDNA wurde als Template für die PCR verwendet. Zur Amplifikation wurden 10 µl 1 : 5 verdünnter cDNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 50 µl (110 mM Tris HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1% Triton^R-X-100, 1,5 mM MgCl₂, je 200 µM dNTP, 500 nM Primer und 1,2 Units Taq-DNA-Polymerase).

Zielgen	Fragmentgröße	Annealing- Temperatur	Zyklenanzahl
MDR1-human	167 bp	55°C	35-40
MRP-human	613 bp	55°C	28-30
LRP-human	405 bp	55°C	27-30
β-Aktin-human	196 bp	55°C	22-25
mdr1b-Ratte	325 bp	55°C	30
β-Aktin-Ratte	630 bp	58°C	24

Tab. 4: PCR-Bedingungen der einzelnen Zielgene je nach Zelltyp.

Die PCR begann mit einer initialen Denaturierung bei 94°C für 1,5 min gefolgt von 22 - 40 Zyklen von jeweils 30 s Denaturierung (94°C), 30 s Annealing (Bedingungen s.u.) und

45 s Elongation (72°C). Nach dem letzten Zyklus wurde eine 15 minütige Inkubation bei 72°C durchgeführt.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels 2% bzw. 3%igen Agarosegelen mit TBE als Laufpuffer. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid wurden die Gele mit einer Kamera aufgenommen und densitometrisch (Programm TINA 2.09) ausgewertet.

2.2.16. Gesamt-Protein-Isolierung

Die Isolierung des zellulären Gesamtproteins erfolgte aus der nach der RNA-Isolation zurückbehaltenen phenolischen Phase. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte bei 4°C ausgeführt. Vor der Proteinisolierung wurde die ebenfalls in der Lösung enthaltene DNA durch Zugabe von 300 µl Ethanol (100 %ig) und 2 - 3minütiger Inkubation ausgefällt. Die Proben wurden 5 min bei 2.000 g zentrifugiert und der Überstand nach Überführen in ein neues Reaktionsgefäß mit 1,5 ml Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 10 min inkubiert und das ausgefallene Protein 10 min bei 12.000 g abzentrifugiert. Zur Reinigung wurden zum Proteinpellet 2 ml einer 0,3 M Guanidinhydrochloridlösung in 95 %igem Ethanol gegeben. Anschließend wurden die Proben für 20 min inkubiert und 5 min bei 7.500 g zentrifugiert. Waschen und Zentrifugation wurden noch zweimal wiederholt und das gereinigte Pellet mit 2 ml Ethanol versetzt, 2 min inkubiert, mittels Vortex-Mixer durchmischt und 5 min bei 7.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet unter Vakuum getrocknet und je nach Größe in 30 - 150 µl 1 %igem SDS gelöst. Die Proben wurden für 10 min bei 50°C inkubiert und durch Zentrifugation (10 min bei 7.500 g) von unlöslichen Bestandteilen gereinigt.

2.2.17. Präparation von Zellmembranen

Für die Präparation der Plasmamembranen wurde eine differenzielle Ultrazentrifugation nach Simpson et al. (1983) durchgeführt. Dazu wurden die kultivierten Zellen mit steriler PBS-Lösung gewaschen, die Schalen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Zuerst wurden die Zellen homogenisiert. Dabei wurden diese mit 3 x 3 ml eiskaltem TES-Puffer (mit PMSF) abgeschabt und in ein 30 ml Homogenisationsgefäß überführt.

Das Volumen wurde mit TES-Puffer auf 20 ml ergänzt und durch jeweils 10 Hübe bei 1400 U/min mit einem Teflonpistill aufgeschlossen. Die erhaltenen Homogenate wurden

bei 4°C mit 17.000 g 30 min zentrifugiert (Festwinkelrotor Ti 70) und der Überstand (Mikrosomen-enhaltende zytoplasmatische Fraktion) abgenommen. Das Sediment, welches die Plasmamembranen, Zellkerne und Mitochondrien enthält, wurde nach Resuspension in 2 ml TES-Puffer in ein 2 ml Wheaton Homogenisationsgefäß überführt und durch 12 Hübe bei 2.000 U/min homogenisiert. Nach dem Spülen von Glasgefäß und Pistill (1 ml TES-Puffer, 5 Hübe 2000 U/min) wurde das Homogenat auf ein vorgelegtes 38,3 %iges Saccharosekissen aufgeschichtet. Anschließend folgte eine Dichtegradientenzentrifugation in einem Ti 40 SW Ausschwingrotor (Beckman) für 1 h bei 4°C mit 100.000 g. Die sich in der Interphase befindliche Plasmamembranfraktion wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit 4 - 5 ml TES-Puffer aufgefüllt, austariert und ein weiteres Mal 1 h mit 100.000 g bei 4°C zentrifugiert. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte in TES-Puffer mit zugesetztem Proteaseninhibitorcocktail. Anschließend wurde für die Proteinbestimmung ein Aliquot abgenommen und der Hauptteil in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

<u>TES-Puffer:</u>	<u>Saccharosekissen (38,3 %)</u>
254 mM Saccharose (8,7 %)	1,12 M Saccharose
20 mM Tris	20 mM Tris
1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM PMSF	1 mM PMSF
pH 7,4 bei 4°C, sterilfiltriert	pH 7,4 bei 4 °C, sterilfiltriert

PMSF (gelöst in Ethanol) wurde kurz vor Gebrauch zugesetzt.

2.2.18. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde in Anlehnung an die Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Je Ansatz wurden 2 - 10 µl Proteinlösung eingesetzt, in einer Einmalküvette mit H₂O auf ein Volumen von 50 µl verdünnt und mit 150 µl 0,1 M NaOH auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Lowry-Gemisch. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, welches mit dem gleichen Volumen an bidestilliertem H₂O vorverdünnt worden war, hinzupipettiert, der Testansatz gut gemischt und nach einer Inkubationszeit

von 30 min bei Raumtemperatur die Absorption bei 578 nm gemessen. Die Quantifizierungen wurden jeweils mittels einer parallel bestimmten Konzentrationsreihe (Human- oder Rinderserumalbumin) geeicht. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen.

Das Lowry-Gemisch (189 mM Na₂CO₃, 0,6 mM CuSO₄, 0,7 mM Kalium-Natriumtartrat) wurde vor der Bestimmung frisch hergestellt.

2.2.19. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zum immunologischen Nachweis im Western-Blot mußten die Proteine vorher in SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch. aufgetrennt werden (Methode nach Laemmli et al., 1970). Hierfür wurde ein diskontinuierliches Vertikalelektrophoresesystem mit einem Acrylamidanteil im Gel von 7,5 % verwendet.

Herstellung von vertikalen SDS-Polyacrylamid-Minigelen

Die Gele wurden in der Elektrophoresekammer (Hoefer SE 280, Plattengröße 120 x 100 mm) gegossen. Die Verwendung eines Fußgels (1 % Agarose in TBE) verhinderte das Auslaufen der Gellösung. Nach dreiminütigem Entgasen im Wasserstrahlvakuum wurde durch Zusatz von TEMED die radikalische Polymerisation der aus den angegebenen Volumina erstellten Lösung eingeleitet und das Trenngel gegossen. Unmittelbar anschließend wurde das Trenngel mit 0,5 %iger SDS-Lösung überschichtet. Nach Auspolymerisation bei RT wurde das SDS mit einer stumpfen Kanüle abgesaugt, der Gelkamm eingesetzt (12-zählig oder 15-zählig; 1,5 mm dick) und das entgaste und mit TEMED versetzte Sammelgel gegossen. Nach Abschluß der Polymerisation wurde die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt, der Gelkamm gezogen und die Auftragstaschen mit einer stumpfen Kanüle mehrmals abgesaugt und wieder mit Puffer gefüllt.

<u>Trenngel 8 %</u>		<u>Sammelgel 5%</u>	
Acrylamidlösung	8 ml	Acrylamidlösung	1,66 ml
1,5 M Tris pH 8,8	7,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
bidest. H ₂ O	14 ml	bidest. H ₂ O	5 ml
10 % SDS	300 µl	10 % SDS	100 µl
10 % APS	15 µl	10 % APS	5 µl
TEMED	150 µl	TEMED	50 µl

HCl diene zur Einstellung des pH-Wertes des Trenn- bzw. Sammelgelpuffers.

Probenvorbereitung/ Elektrophorese

Von den Proben wurde jeweils ein 40 µg Protein enthaltendes Volumen abgenommen, mit 1 %iger SDS-Lösung auf ein einheitliches Volumen gebracht und mit Probenpuffer (4 x) versetzt. Nach 5minütiger Denaturierung im Heizblock bei 95°C und anschließendem kurzen Zentrifugieren wurden die Proben mit einer Mikroliterspritze auf das Gel aufgetragen. Als Anhalt für das Molekulargewicht wurden immer Molekulargewichtsstandards (Rainbowmarker: 14 - 220 kDa; β2-Makroglobulin: 180 kDa) mitgeführt, die der gleichen Behandlung wie die Proben unterlagen.

Die Vertikal-Elektrophorese wurde mit 15 mA/ Gel (Sammelgel) bzw. nach Übertritt der Proteinbanden in das Trenngel mit 25 mA/ Gel unter Verwendung eines einheitlichen Elektrophoresepuffers durchgeführt. Der Probenpuffer wurde aliquotiert bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde er mit Dithiothreitol (Endkonzentration 6 % w/v) versetzt.

<u>Probenpuffer (4 fach, pH 6,8):</u>	200 mM	Tris
	8 % (w/v)	SDS
	40 % (w/v)	Glycerin
	0,04 % (w/v)	Bromphenolblau

<u>Elektrophoresepuffer (pH 8,4)</u>	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS

Der Elektrophoresepuffer wurde als 10 fache Stammlösung hergestellt und jeweils vor Gebrauch mit bidestilliertem H₂O verdünnt.

2.2.20. Nass-Transfer/ Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine sind im Gel für immunologische Analysen schwer zugänglich. Daher wurden die Proteine nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mittels Nass-Transfer unter Beibehaltung des vorhandenen Bandenmusters aus dem Gel auf Nitrozellulose-Membranen immobilisiert.

Gele, Schwamm-Pads und die Filterpapierbögen wurden 10 min im Transferpuffer eingelegt. Die Membranen wurden in bidestilliertem H₂O gespült und im Transferpuffer äquilibriert. Beim Schichten des „Sandwichs“ wurden die Luftblasen mit einer Pipette ausgerollt. Der Transfer war wie folgt aufgebaut:

Kathode - Spannrahmen – Schwamm - 3MM Filterpapier - Gel -

Membran - 3MM Filterpapier - Schwamm - Spannrahmen - Anode

Der Transfer erfolgte über Nacht mit 350 mA unter Kühlung und Pufferumwälzung (Verhinderung eines Temperaturgradienten).

Transferpuffer: 50 mM Tris, 95 mM Glycin, 0,05 % SDS, 15 % Methanol, pH 8,3

2.2.21. Protein-Färbungen

Nach dem Transfer wurden die Membranen mit Ponceau-S angefärbt und anschließend der Hintergrund mit bidestilliertem H₂O von der Membran gewaschen. Die Banden der Molekulargewichtsstandards wurden markiert und die Membranen eingescannt.

<u>Ponceau-S-Färbelösung</u> :	0,1 % (w/v)	Ponceau-S
	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig

Um die Effizienz und Gleichmäßigkeit des Transfers zu überprüfen, wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Blau gefärbt und anschließend mittels Entfärber differenziert.

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	0,25 % (w/v)	Coomassie-Brillantblau R 250
	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig

<u>Entfärbelösung:</u>	40 % (v/v)	Methanol
	7,5 % (v/v)	Eisessig

Die Färbelösungen wurden vor Gebrauch filtriert und die Entfärbelösung durch Filtration über Aktivkohle regeneriert.

2.2.22. Immunochemischer Nachweis der Proteine

Nach mehrmaligem Waschen der Membranen in Spül-Puffer wurden freie Proteinbindungsstellen über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur in Spül-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween 20 + 5 % Magermilchpulver blockiert. Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten bei RT. Die Inkubation der Membranen mit je 10 ml der Antikörperlösungen erfolgte unter leichtem Schütteln eingeschweißt in Folienbeuteln. Die abgesättigten Membranen wurden 2 h mit dem primären Antikörper (MRP 1:1500, LRP 1:1000) in Spül-Puffer + 5 % Magermilchpulver inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden 3 x 5 min mit Spül-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween + 1 % Magermilchpulver abgewaschen. Der sekundäre, mit Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelte Antikörper wurde anschließend 1 h in einer 1: 5000 Verdünnung in Spül-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween + 1 % Magermilchpulver inkubiert.

Vor Behandlung mit dem Peroxidasesubstrat erfolgte ein erneutes Waschen der Membranen (3 x 10 min) mit Spül-Puffer+ 0,1% (v/v) Tween (Horizontalschüttler). Das Peroxidasesubstrat Luminol und das Cosubstrat H₂O₂ wurden durch Mischung gleicher Volumina der fertigen Substratlösungen des ECL-Kit zusammengebracht und die Membran darin 1 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Überschüssige Substratlösung wurde anschließend durch Filterpapier aufgenommen und die Membranen blasenfrei auf eine Glasplatte gelegt und in Haushalt-Folie eingeschlagen. Die unter enzymatischer Umsetzung der Substrate auftretende Chemolumineszenz im Bereich der gebundenen Immunkomplexe konnte durch die Exposition von ECL-Filmen in einer Autoradiographiekassette detektiert (30 sec bis 1 h) werden. Zur Visualisierung wurden die belichteten Filme in einer Dunkelkammer entwickelt. Die Filme wurden eingescannt und die Banden mit Auswertesoftware (TINA 2.09) bearbeitet. Die eingescannten Membranen (Ponceau-Färbung) dienten als Kontrollen für eine gleichmäßige Gelbeladung und zur Relativierung der eingesetzten Proteinmengen.

Spül-Puffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4

2.2.23. Auswertung der durchgeführten Experimente

Die Experimente wurden, wenn möglich, als Mehrfachbestimmung unabhängig geführter Kulturplatten innerhalb verschiedener Experimente durchgeführt. Um Schwankungen der mRNA- und Protein-Grundexpression zwischen den Versuchen zu relativieren, wurden die Kontrollwerte jeweils 100 % gesetzt und die Meßwerte der Versuchspunkte auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

Die Signifikanz der erhaltenen Daten wurde unter Verwendung der ANOVA-Varianzanalyse, des t-Tests nach Student und dem Bonferoni-Test ermittelt. Als Signifikanzniveaus dienten dabei $p < 0,05$; $p < 0,01$ und $p < 0,005$. (Sachs, 1984)

2.2.24. Probengewinnung und Probenauswahl

Wie in den Abschnitten 1.1.3. und 1.2.5. beschrieben, erfolgte die Gewinnung humaner Lungenzellkulturen (NHBEZ, PLZ) aus Resektionsmaterial. Die während der Operation nach tumorchirurgischen Gesichtspunkten entfernten Gewebe wurden sofort im Schnellschnittlabor des Universitätsklinikums Kröllwitz durch den diensthabenden Pathologen beurteilt und Proben für die Diagnostik entnommen. Vom verbleibenden Gewebestück wurden durch den Pathologen tumorfreie Bereiche entnommen und Mitarbeitern des Instituts zum Transport übergeben. Dementsprechend konnte kein Einfluß auf Größe der erhaltenen Probe und genaue Lokalisation des Entnahmeortes genommen werden. Aus einer Patientenprobe konnten pro Ausgangsgewebe zwischen 1 und 20 Kulturschalen angesetzt werden. Vor Beginn einer Effektorbehandlung wurde jeweils Art und Dauer der Behandlung festgelegt. Diesem Umstand ist zu schulden, daß in den Experimenten nicht für alle Zeitpunkte und Stressoren Werte angegeben werden konnten.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Kultursysteme

3.1.1. AII-Zell-Primärkultur

Alveolar Typ II-Zellen (AII-Zellen) stellen zahlenmäßig einen nur geringen Teil verschiedener Zellpopulationen der Säugerylunge dar, je nach Spezies 10 - 15 % (Crapo et al., 1982). Daher war die Ausbeute der Zellen mit im Mittel 12 Millionen Zellen pro Präparation nach der vielstufigen Abtrennung der AII-Zellen aus der Zellsuspension anderer Lungenzellpopulationen begrenzt. Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an die von Dobbs et al. 1986 beschriebene und von Richards et al., 1987 modifizierte Methode. Die Zellzählung erfolgte nach der Zellselektionierung durch differenzielle Adhärenz und unmittelbar vor Aus-plattierung. Bei Anfärbung mit Trypan-Blau zeigten die Zellen vor Aussaat eine Lebensfähigkeit von > 90 %. Die nach differenzieller Adhärenz gewonnenen Zellen hefteten sich auf den beschichteten Kulturschalen an, wobei zunächst abgerundete Formen erhalten blieben. Nach 24 bis 48 h breiteten sich die Zellen unter Abflachung und Ausbildung einer polygonalen Zellstruktur auf der Kulturschale aus. Die meist vereinzelt adhätierenden Zellen bildeten durch Proliferation mehrzellige Inseln. Zwischen 48 und 72 h in Kultur kam es zu einer ausgeprägten Proliferation der kultivierten AII-Zellen, so dass sich ein subkonfluent bis konfluent Zellerasen ausbildete.

Zum Nachweis, dass es sich bei den Zellkulturen um ein reines AII-Zell-Epithel handelte, wurden die Monolayer nach 72 h Kultur mit Osmiumtetroxid und Tanninsäure angefärbt. Aufgrund der Osmiophilie, der in ihnen enthaltenen Hauptbestandteile des Surfactant, färbten sich dabei die für die AII-Zell-Morphologie typischen Lamellarkörperchen schwarz an (Abb. 10b). Die Zellkulturen bestanden zu > 90 % aus AII-Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ließen ebenfalls deutlich die typischen Lamellarkörperchen (Surfactant-Einschlüsse) erkennen (Abb. 10a). In diesem Stadium wurden die Zellen mit Paraquat und H₂O₂ behandelt.

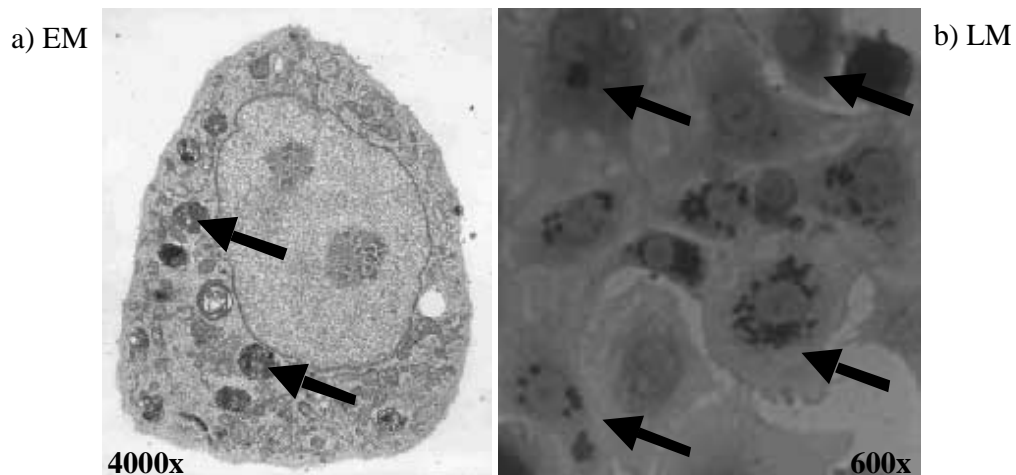


Abb. 10: Charakterisierung kultivierter AII-Zellen. Drei Tage alte AII-Zell-Kulturen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und mit OsO_4 behandelt. Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen erfolgten mit einem JOEL JEM 1210 Elektronenmikroskop (80 kV). Für die Lichtmikroskopie (LM) wurden die Zellen zusätzlich mit Tanninsäure inkubiert und dann fotografiert. Die Pfeile zeigen die AII-Zell-typischen Lamellarkörperchen.

3.1.2. Kulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und peripherer Lungenzellen (PLZ)

Durch das Auswachsen von Zellen aus den Gewebestücken bildeten sich nach zwei bis drei Wochen Inseln subkonfluenter (80 - 90 %) Zellen (1. Generation). Zweimal wöchentlich erfolgte ein Medienwechsel und die Sichtkontrolle der Kulturen bezüglich Auswachsen der Zellen aus den Resektaten, Kontaminationen mit Mikroorganismen sowie unerwünschter Kokultivierung anderer Zellen (z.B. Fibroblasten). Die spindelförmigen Fibroblasten waren dabei deutlich von den Epithelzellen zu unterscheiden. Die Gewebestücke konnten zum Auswachsen weiterer Generationen mehrmals auf neue Kulturschalen umgesetzt werden. Daraus resultierten für die Gewebestücke Kulturzeiten von durchschnittlich 10-12 Wochen. Die PLZ-Kulturen konnten außerdem enzymatisch abgelöst und passagiert (subkultiviert) werden.

Die Auswuchszeiten bis zum Erreichen der Subkonfluenz differierten zum Teil erheblich zwischen den Zellkulturen der verschiedenen Patienten (2 bis > 4 Wochen). Auch innerhalb der einzelnen Gewebestücke eines Patienten und vor allem zwischen NHBEZ- und PLZ-Kulturen waren Unterschiede festzustellen. Die Lungen-Zell-Kulturen wuchsen nach kurzer Verzögerung schneller als die Bronchialepithelzellen.

Mit zunehmender Generationszahl verlängerten sich die Auswuchszeiten kontinuierlich bis zum völligen Einstellen des Wachstums. War nach 4 Wochen kein Auswachsen von Zellen aus den Gewebestücken zu beobachten, wurde die Kultivierung abgebrochen.

3.1.3. Charakterisierung von NHBEZ- und PLZ-Kulturen

Bei jedem Medienwechsel erfolgte eine mikroskopische Überprüfung der Kulturen, schon dabei war in den NHBEZ-Kulturen eine einheitliche Zellpopulation mit epitheliale Charakter (Pflasterstruktur) (Abb. 11a, Hoffman-Kontrast-Aufnahmen) zu erkennen. Zur eindeutigen Identifizierung erfolgten immunhistochemische Untersuchungen (Abb. 11a), die diesen Befund unterstrichen. Die Antikörper gegen die Zytokeratine (CK) 7, 8/18 und 19 (Marker für respiratorisches Epithel; Moll, 1993) reagierten positiv. Inkubationen mit Antikörpern gegen Monozyten/ Makrophagen (CD68), T-Zellen/ Leukozyten (LCA), Muskelzellen (Desmin), Fibroblasten (SMA – smooth muscle actin) und mesodermale Zellen (Vimentin) waren negativ. Bei den Kulturen der normalen humanen Bronchialepithelzellen konnte ein > 95 %iger epithelialer Charakter angenommen werden. Kulturen von peripherem Lungengewebe waren schon lichtmikroskopisch (LM) als Mischpopulationen (Abb. 11b, LM) zu erkennen, immunhistochemisch konnten neben Epithelzellen auch Muskelzellen, Fibroblasten und Mesodermzellen angefärbt werden (Abb. 11b). PLZ-Kulturen bestanden hauptsächlich (70 - 80 %) aus Epithelzellen. Die Kokultivierungen nicht-epithelialer Zellen führten in einigen Fällen zu morphologisch gut von Epithelzellen zu unterscheidenden Zellklustern. Dieser Effekt könnte gegebenenfalls die experimentelle Basis für Untersuchungen möglicher Zell-zu-Zell-Interaktionen darstellen.

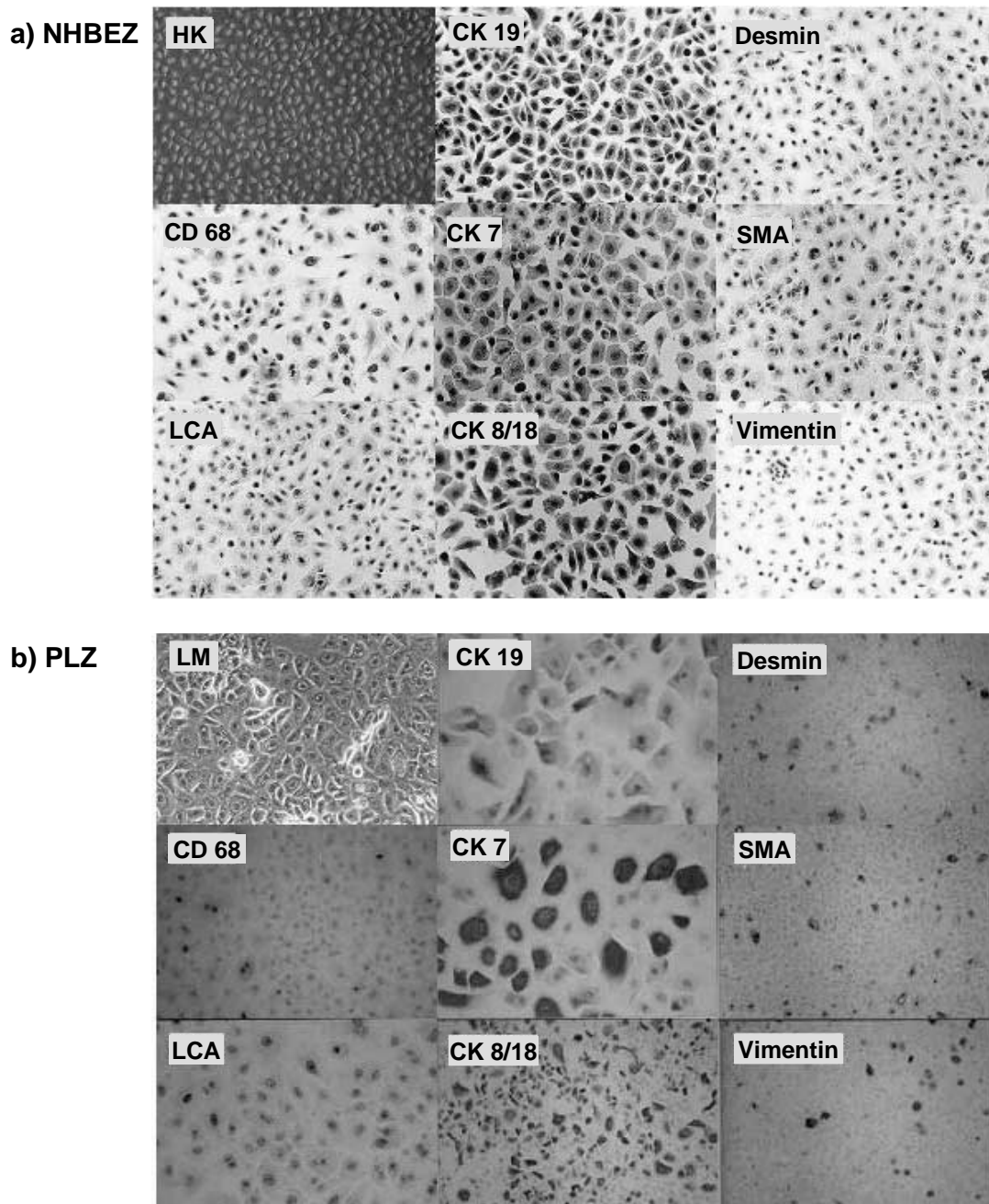


Abb. 11: Charakterisierung von NHBEZ-Kulturen und PLZ-Kulturen mittels Immunzytochemie/ Hoffman-Kontrast-Aufnahme (HK) und Lichtmikroskopie (LM). Bronchialepithelzellen und periphere Lungenzellen wurden auf beschichteten Kammerdeckgläschen kultiviert und immunhistochemisch untersucht. **a)** Die HK zeigt einen epithelialen Monolayer ("Pflasterstruktur"). Antikörper gegen die Zytokeratine (CK) 19, 7 und 8/18 detektieren epitheliale Strukturen. Negativnachweise erfolgten gegen CD 68 (Monozyten/ Makrophagen), LCA (T-Zellen, Leukozyten), Desmin (Muskelzellen), SMA (smooth muscle actin) (Fibroblasten) und Vimentin (Mesoderm). **b)** Die LM zeigt einen epithelialen Zellverband. Antikörper gegen die Zytokeratine 19, 7 und 8/18 detektierten epitheliale Strukturen. CD 68 und LCA waren nicht detektierbar, Zellen mit Desmin, SMA, und Vimentin wurden vereinzelt nachgewiesen.

3.2. Vitalitäts- und Toxizitätstests

Um die subtoxischen und toxischen Bereiche für die in den Experimenten einzusetzenden Agenzien zu erhalten, wurde die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration mittels MTT-Test untersucht. Der Test beruht auf dem Nachweis der Bildung von Formazan aus Methyltetrazolium (MTT) durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen in vitalen Zellen. Die Inkubation der Kulturen von primären AII-Zellen und den Tumorkulturen H322 und H358 unter Standardbedingungen mit PQ (zwischen 50 μ M und 1 mM) sowie H₂O₂ (zwischen 100 μ M und 1 mM) über 24 h, führte zur konzentrationsabhängigen Verminderung der Vitalität (Abb.12). Dabei waren die humanen Tumorkulturen unempfindlicher als die Primärkulturen von AII-Zellen der Ratte. Die in den Induktionsexperimenten eingesetzten Konzentrationen (10 μ M und 50 μ M PQ; 50 μ M und 100 μ M H₂O₂) wurden aus diesen Daten festgelegt. Dabei wurde eine Überlebensrate von über 80 % angestrebt. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erlangen, wurden in allen Untersuchungssystemen die gleichen Konzentrationen eingesetzt.

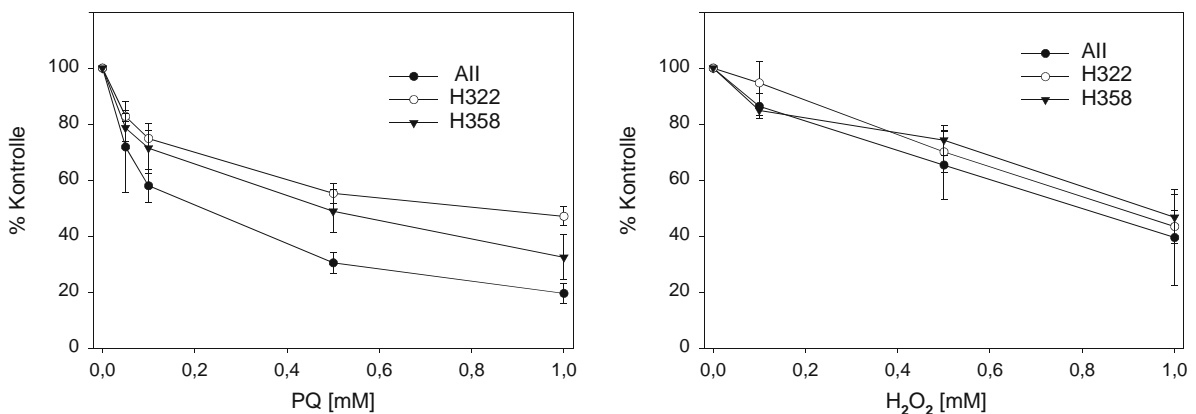


Abb. 12: Einfluss von PQ- und H₂O₂-Inkubation auf die Vitalität im Kulturmedium von AII-Zellen und Kulturen von H322 und H358 Zellen. Zellkulturen von AII-Zellen, H322 und H358 wurden für 24 h mit PQ oder H₂O₂ inkubiert. Mittelwerte und SEM der zur Kontrolle relativierten Werte (n=5-7). Kulturen mit effektorfreiem Medium sind Kontrollen gleich 100 %.

3.3. Malondialdehydbestimmung im Kulturmedium

Malondialdehyd (MDA), ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation, kann als ein Marker einer radikalischen Schädigung im Medium von Zellkulturen bestimmt werden. Die Analytik von MDA im Kulturmedium erfolgte mittels HPLC (Draper et al., 1993). Nach Behandlung mit PQ (0,05; 0,1; 0,5; und 1 mM) sowie H₂O₂ (0,1; 0,5; 1 mM) für je 24 h

wurde MDA im Kulturmedium bestimmt (Abb.13). In den Kulturmedien der AII-Zellen konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg von MDA nach PQ und H₂O₂ gemessen werden. In den Karzinomlinien H358 und H322 wurde erst ab 1 mM H₂O₂ eine signifikante Erhöhung des MDA-Spiegels auf etwa 1 pM gemessen. Auch bei Konzentrationen bis 5 mM und entsprechenden Überlebensraten unter 10% blieb die gemessene MDA-Konzentration ebenfalls auf diesem Niveau (Werte nicht dargestellt). In den Medien der mit PQ behandelten Tumorlinien wurde kein Anstieg von MDA gemessen. Bei den Kontrollwerten erwiesen sich die basalen MDA-Spiegel bei den Karzinomlinien signifikant kleiner als in der Primärkultur von AII-Zellen. Die MDA-Konzentrationen der Karzinomlinien untereinander zeigten nur geringe Unterschiede.

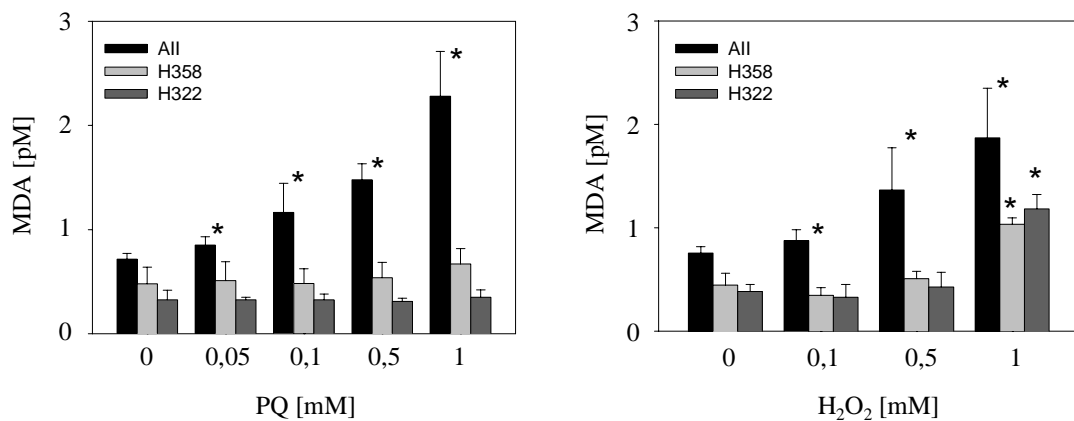


Abb. 13: Einfluss von PQ- und H₂O₂-Inkubation auf die Malondialdehyd-Entstehung (MDA) im Kulturmedium von AII-Zellen und Kulturen von H322 und H358. AII-Zellen, H322 und H358 wurden für 24 h mit PQ oder H₂O₂ inkubiert. Die Kontrollen erhielten Normalmedium, Mittelwerte \pm SEM der Messwerte in pM (n=3). *, p<0,05 zur Kontrolle ohne Behandlung.

Aus methodischen Gründen erfolgte die MDA-Bestimmung in den Lungentumorlinien in AII-Zell-Medium. Dabei zeigte sich eine fast 50 %ige Erhöhung der metabolischen Aktivität (MTT-Test) im Vergleich zum Standardmedium (DMEM).

3.4. Quantitative Paraquatbestimmung im Kulturmedium

Um das Verhalten von PQ im Kulturmedium von Zellkulturen zu untersuchen, wurde die PQ-Konzentration im Medium bestimmt. Dazu wurden Kulturen von H358 und H322 mit 50 μ M, 100 μ M und 500 μ M PQ inkubiert. Die Konzentration von PQ, gemessen zu den Zeitpunkten 1/2, 1, 2, 8, 24 und 48 h, blieb im Kulturmedium von H322 und H358 über 48 h konstant (nicht dargestellt).

3.5. Expression von *mdr1b* mRNA in AII-Zellen der Rattenlunge

3.5.1. Zeitabhängige *mdr1b* mRNA-Expression in AII-Zell-Kultur

Die Primärkultur isolierter AII-Zellen ermöglicht es, eine wichtige Zellpopulation der Lunge zu untersuchen. Physiologisch wichtige Funktionen (z.B. Surfactant-, Enzym- und Matrix-Komponenten-Produktion) sind in AII-Zellen sehr stark von den Kulturbedingungen abhängig. So kommt es während der Kultur zur allmählichen Einstellung der Surfactantproduktion und einer Differenzierung in Richtung Typ I-Epithel. Für die *mdr1b*-Expression ist bekannt, dass es in Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen zum Anstieg während der Kultur kommt (Ziemann et al., 1999). Primärkulturen von AII-Zellen zeigten unter den gewählten Kulturbedingungen eine von der Kulturdauer abhängige intrinsische *mdr1b* mRNA-Überexpression. In frisch kultivierten Zellen war eine schwache *mdr1b* Expression detektierbar, die im Verlauf der Kultur drastisch anstieg (Abb. 14a und b).

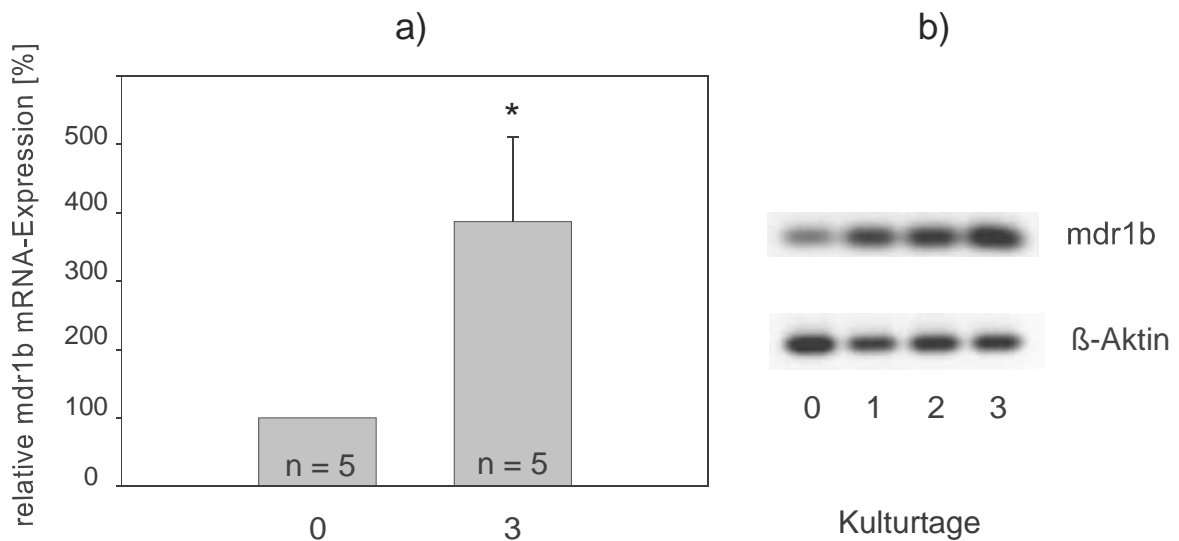


Abb. 14: Einfluss der Kulturdauer auf die *mdr1b* mRNA Expression in AII-Zellen der Ratte. Gesamt-RNA von frisch isolierten Zellen (0 Kulturtage) und von AII-Zell-Kulturen (Kulturtage 1-3) wurde isoliert. Nach RT-PCR, Auftrennung in Agarosegelen und Anfärbung wurden die erhaltenen Banden aufgenommen (b) und densitometrisch (a) ausgewertet. MW \pm SEM der gegen β -Aktin normierten Messwerte (a); Intensität der Bande am Kulturtag 0 = 100 %; *, $p < 0,05$

Um auszuschließen, dass die Veränderung der Expression von *mdr1b* auf einer unspezifischen Erhöhung der mRNA-Synthese beruht, wurde β -Aktin als sogenanntes „housekeeping-gene“ mit amplifiziert. β -Aktin ist ein wichtiger Bestandteil der Mikrofilamente und am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. Aufgrund der essenziellen Bedeutung des Zytoskeletts für die Zelle unterliegt β -Aktin mRNA einer hohen Expressionsrate, die

zur Kontrolle des allgemeinen Zellstatus herangezogen werden kann. Wie in Abb. 14b ersichtlich ist, blieb die β -Aktin-Expression in Kultur stabil. Somit konnte eine unspezifische Erhöhung der mRNA-Expression ausgeschlossen werden.

3.5.2. Mdr1b mRNA-Expression in AII-Zellen der Rattenlunge nach Paraquat- und H₂O₂-Inkubation

Mediatoren von ROS führen in Rattenhepatozyten zu einer Erhöhung der intrinsischen Expression von mdr1b P-Glykoprotein. Die intrinsische als auch die durch ROS induzierte Expression lassen sich durch die Gabe von Antioxidanzien vermindern (Bae et al., 1997; Hirsch-Ernst, 1998). Die Versuche sollten zeigen, ob auch in kultivierten AII-Zellen ROS Einfluss auf die Expression von mdr1b haben.

Als Modellsubstanzen für die Erzeugung von oxidativem Stress dienten H₂O₂ und das Herbizid Paraquat. Das kurzlebige Wasserstoffperoxid wird unter physiologischen Bedingungen in biologischen Systemen gebildet, durch zelleigene Systeme (Enzyme, GSH, Vitamine) aber auch schnell wieder „entgiftet“. Paraquat wurde wegen seiner spezifischen Anreicherung in Lungenzellen (Hoet et al., 1994) und der kontinuierlichen intra-zellulären Bildung von Superoxidradikalen, H₂O₂ und Hydroxylradikalen ausgesucht. Den Zellkulturmedien wurden am 3. Kulturtag 10 μ M bzw. 50 μ M Paraquat oder 50 μ M bzw. 100 μ M H₂O₂ zugesetzt. Die Medien wurden 24 h auf den Kulturen belassen. Nach Entfernen des Medium erfolgte die Weiterverarbeitung der Zellen.

Primärkulturen von AII-Zellen reagierten sowohl auf den kurzlebigen Stressor H₂O₂ (Nachweisdauer in serumhaltigen Kulturmedien nur 10 - 30 min; Simon et al., 1991; Engstrom et al., 1990) als auch auf PQ mit einem konzentrationsabhängigen Anstieg der mdr1b mRNA-Expression (Abb. 15 und 16). Dabei waren die Zellen empfindlicher gegenüber PQ. Um den gleichen Effekt zu erzielen (50 % Steigerung der relativen mdr1b Expression) war eine 10fach höhere H₂O₂ Konzentration notwendig (10 μ M zu 100 μ M). β -Aktin als Marker für den allgemeinen Zellstatus blieb bei niedrigen Konzentrationen weitestgehend stabil, die hohen Konzentrationen führten zu einem Abfall des β -Aktin Signals (Abb. 15b und 16b).

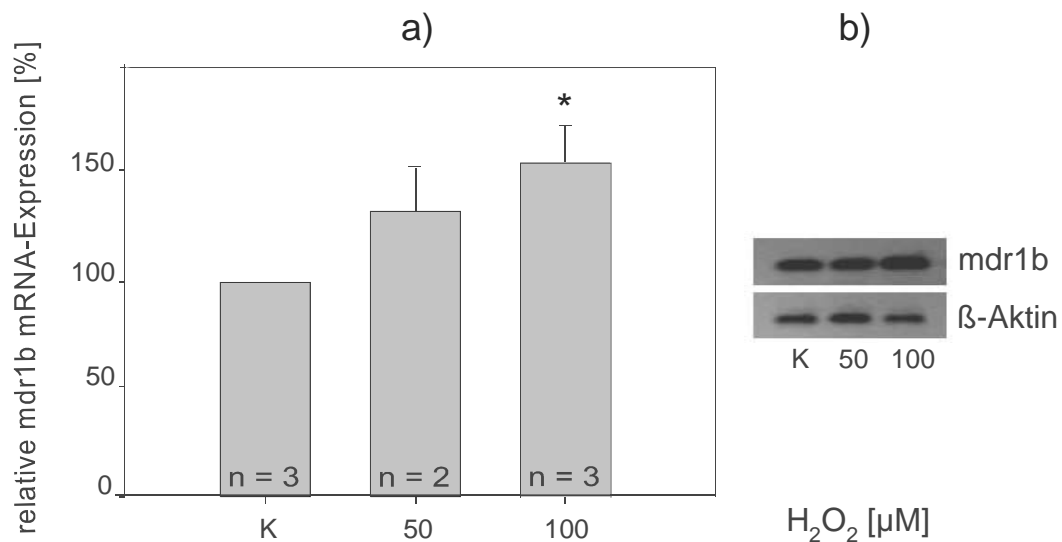


Abb. 15: Überexpression von mdr1b mRNA in AII-Zellen der Ratte nach H₂O₂ Inkubation.

Drei Tage alte Kulturen wurden für 24 h mit 50 μM oder 100 μM H₂O₂ inkubiert, Gesamt-RNA wurde isoliert. Nach RT-PCR, Auftrennung in Agarosegelen und Anfärbung wurden die erhaltenen Banden aufgenommen (b) und densitometrisch (a) ausgewertet. MW, SEM und Signifikanzniveau der gegen β-Aktin normierten Messwerte (a); K = 100 %; *, p<0,05

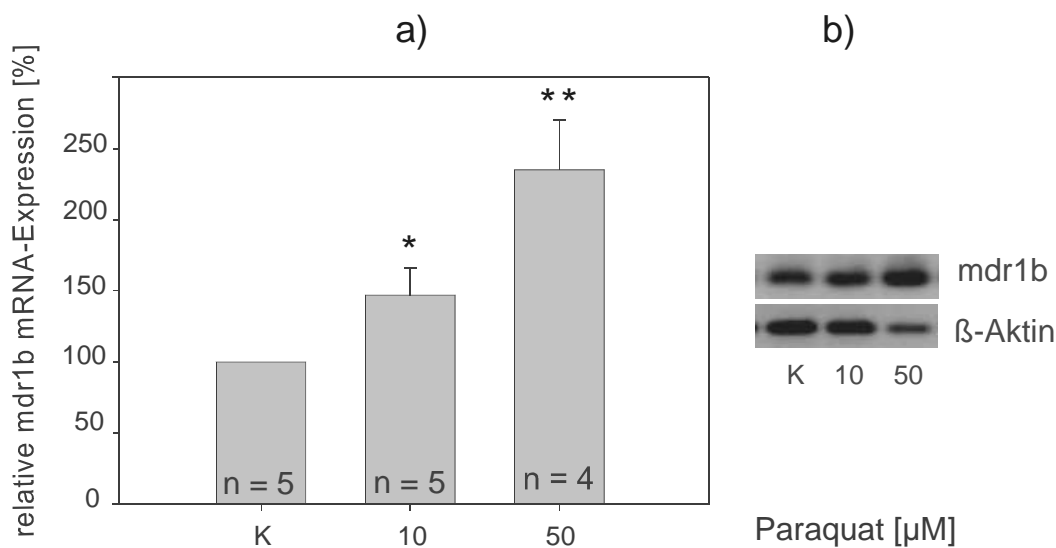


Abb. 16: Überexpression von mdr1b mRNA in AII-Zellen der Ratte nach PQ-Inkubation.

Drei Tage alte Kulturen wurden für 24 h mit 10 μM oder 50 μM PQ inkubiert, Gesamt-RNA wurde isoliert. Nach RT-PCR, Auftrennung in Agarosegelen und Anfärbung wurden die erhaltenen Banden aufgenommen (b) und densitometrisch (a) ausgewertet. MW, SEM und Signifikanzniveau der gegen β-Aktin normierten Messwerte (a); K = 100 %; *, p<0,05; **, p<0,01

3.6. Einfluß der Kulturbedingungen auf die Expression von LRP, MRP und P-gp in humanen Lungentumorzelllinien

Um den Einfluß der Zelldichte auf die Expression der Transporter zu untersuchen, wurden die Zelllinien H358 und A549 in unterschiedlicher Dichte ausplattiert und für 4 Tage kultiviert. MDR1, MRP, LRP und β -Aktin mRNA konnten detektiert werden (Abbildung 17). β -Aktin mRNA blieb bei steigender Zelldichte unverändert. Im Falle der MRP mRNA waren Unterschiede zwischen den Zelllinien zu erkennen. So blieb in den H358 Zellen die Intensität der Banden unverändert, in den A549-Zellen konnte ein Anstieg des Signals mit zunehmender Dichte der kultivierten Zellen beobachtet werden. Die LRP und Pgp mRNA Expression war in beiden Zelllinien von der Zelldichte unbeeinflusst.

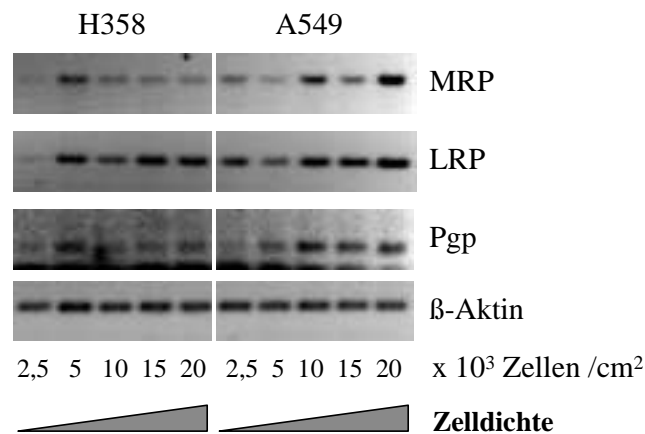


Abb. 17: Einfluss der Zelldichte auf die Expression von MRP, LRP und MDR1 (P-gp) mRNA in Lungentumorlinien. H358 und A549 Zellen wurden in unterschiedlicher Dichte (2,5; 5; 10; 15; 20 x 10³ Zellen/cm²) ausplattiert. Gesamt-RNA wurde nach 4 Tagen isoliert. Nach RT-PCR, Auftrennung der Banden in Agarosegelen und Anfärbung wurden die erhaltenen Banden aufgenommen.

Zur Untersuchung des Einflusses der extrazellulären Matrix auf die Expression der untersuchten Transportproteine wurden die Tumorlinien abweichend von der Standardmethode (unbeschichtete Plastikoberfläche) auf mit Kollagen beschichteten Kulturschalen, auf Kollagengelen und auf mit Kollagengelen beschichteten Filterinserts kultiviert (Methoden siehe Abbildung 8, Kap. 2.2.8.). Durch die Möglichkeit der apikalen Luftexposition erlaubt die letztgenannte Methode *in vivo*-nahe Kulturbedingungen mit einer apikalen Luft-Medium-Grenzschicht.

Die Beschichtung der Kulturoberfläche mit Kollagen hatte in den drei verwendeten Tumorlinien einen unterschiedlichen Einfluss auf die MRP Expression (Abbildung 18). In H358-Zellen wurde MRP in auf rigidem Kollagen im Vergleich zu auf Plastik kultivierten Zellen verstärkt exprimiert. Hingegen kam es unter diesen Bedingungen in A549- und H322-Zellen zu einer Verringerung des Signals. Zusätzlich zu den Auswirkungen auf die

Stärke der Expression von MRP in den drei Tumorlinien, konnte ein unterschiedliches Laufverhalten im Polyacrylamidgel festgestellt werden. So wurde in den A549 Zellen zusätzlich eine zweite kleinere Bande detektiert. Festzustellen war außerdem, dass MRP in der Tumorlinie bronchialen Ursprungs (H322) mit einem größeren Molekulargewicht detektiert wurde.

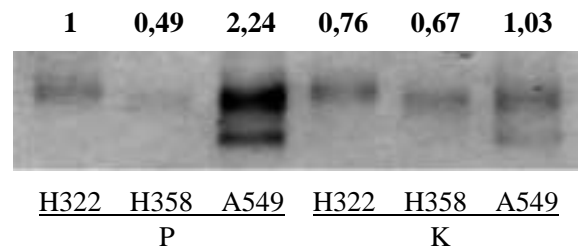


Abb.18: Einfluss einer Kollagenbeschichtung auf die Expression von MRP in Lungentumorlinien. Tumorzellen wurden auf unbeschichteten (**P**) oder Kollagen-beschichteten (**K**) Plastik-Zellkultur-schalen kultiviert. Plasmamembranproteine wurden isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die MRP-Detektion erfolgte mittels Antikörpern (MRPr1) und ECL-Detektion. Zum besseren Vergleich wurde der Wert H322, unbeschichtet gleich 1 gesetzt und die anderen Werte auf ihn bezogen.

Die Auswirkungen der Kultivierung auf Kollagengelen auf die Expression von MRP1, LRP und MDR1 mRNA zeigt Abbildung 19. Die mRNA für LRP für β -Aktin blieben für dieses Kultursystem in allen drei Linien unbeeinflusst. MRP zeigte in allen drei Linien unterschiedliche Reaktionen. In H322-Zellen kam es zu einer verminderten, in H358-Zellen zu einer verstärkten mRNA-Expression. A549-Zellen zeigten keine Veränderung der MRP mRNA. MDR1 mRNA blieb in H358 Zellen unverändert. In H322 und A549 Zellen kam es durch die veränderte extrazelluläre Matrix zu einer Verringerung des MDR1 mRNA-Signals.

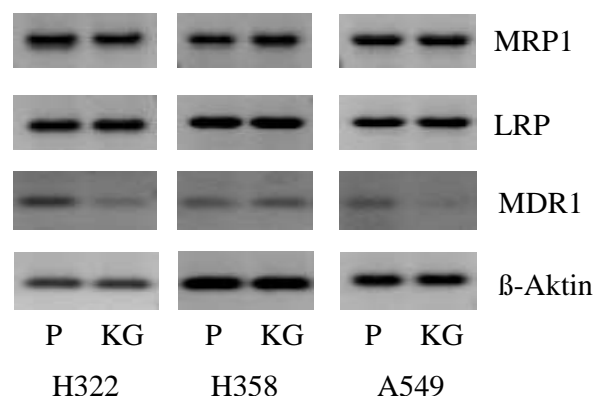


Abb. 19: Einfluss der Kulturbedingungen auf die Expression von MRP, LRP und MDR (P-gp) mRNA in Lungentumorlinien. Die Tumorlinien wurden auf Plastik-Zellkulturschalen (**P**) oder auf Kollagengelen (**KG**) kultiviert. Nach Isolierung der gesamt-RNA, RT-PCR, Auftrennung der Amplifikate in Agarosegelen und Anfärbung wurden die erhaltenen Banden aufgenommen.

Um möglichst *in vivo* nahe Kulturbedingungen zu simulieren, erfolgte die Kultur der Tumorzellen auch auf Filterinserts mit Kollagengelen (Abbildung 20). Nach einer Anwachsphase (24 - 48 h) war es dann möglich, die Zellen mit apikaler Luftexposition zu kultivieren. Dabei kam es in A549 Zellen zu einem drastischen Anstieg des β -Aktin Signals. Auch das Signal für die LRP mRNA erhöhte sich, MRP blieb fast unverändert. Nach Normierung der Transporter-Daten gegen β -Aktin war jedoch zu beobachten, daß die Signale der LRP und MRP mRNA-Expression erniedrigt waren.

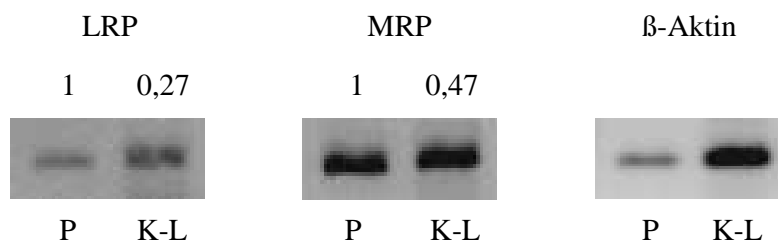


Abb. 20: Einfluss *in vivo* naher Kulturbedingungen auf die Expression von LRP und MRP mRNA in A549 Zellen. Die Zellen wurden auf Plastik-Zellkulturschalen (**P**) oder auf Kollagengelen auf Filterinserts mit apikaler Luftexposition (**K-L**) kultiviert. Gesamt-RNA wurde isoliert. Nach RT-PCR, Auftrennung in Agarosegelen und Anfärbung wurden die erhaltenen Banden aufgenommen und densitometrisch ausgewertet. Die Zahlenangaben zeigen die gegen β -Aktin normalisierten Daten; Kultur auf Plastik = 1 gesetzt (Normalbedingungen).

3.7. Interindividuelle Expression von LRP, MRP und P-gp in Auswachskulturen der menschlichen Lunge

Zur Untersuchung der individuellen Expression von LRP, MRP1 und P-gp wurden subkonfluente Zellen der 1. Generation mit Trizol abgelöst, Gesamt-RNA und Gesamtprotein isoliert. Die Gewebestücke wurden zum Auswachsen weiterer Generationen auf neue Kulturschalen umgesetzt, PLZ-Monolayer konnten enzymatisch abgelöst und passagiert werden.

LRP und LRP mRNA wurde in allen Proben detektiert. Bei Vergleich der methodischen Parameter (Zyklenzahlen der PCR und Inkubations- und Belichtungszeiten beim Western-Blot), zeigte sich, daß LRP in den untersuchten Kultursystemen am stärksten exprimiert wurde. MRP und LRP mRNA wurden mit ähnlichen Zyklenzahlen (LRP 27-30, MRP 28-30) in der PCR amplifiziert, die erhaltenen MRP-Banden im Agarosegel waren aber schwächer als die für LRP. Die Belichtung der Filme nach der immunochemischen Detektion mittels ECL mußte im Vergleich zum LRP für MRP bis zu dreimal länger erfolgen. P-gp mRNA war nicht in allen untersuchten Proben nachweisbar. Zur Verstärkung schwacher Signale mußten zudem die Amplifikationszyklen (> 35 für P-gp, 30 für LRP und MRP) erhöht werden. Eine systematische Untersuchung der P-gp-Expression konnte wegen Limitierungen des Probenmaterials und den insgesamt geringen Expressionsraten nicht erfolgen.

3.7.1. Individuelle Expression von LRP in humanen Lungenzellkulturen

LRP und LRP mRNA wurde in den untersuchten Zellkulturen von NHBEZ und PLZ gleichermaßen nachgewiesen. Dabei wurde festgestellt, daß es unabhängig vom Ursprung des Ausgangsmaterials (NHBEZ-Bronchien und PLZ-Parenchym) individuelle Unterschiede zwischen den Zellkulturen der einzelnen Patienten gab. Die Abbildungen 21 und 22 verdeutlichen, dass die einzelnen Proben (Protein und mRNA) um den Faktor 2, in Einzelfällen um Faktor 2,5 differierten (Probe 83 zu 43).

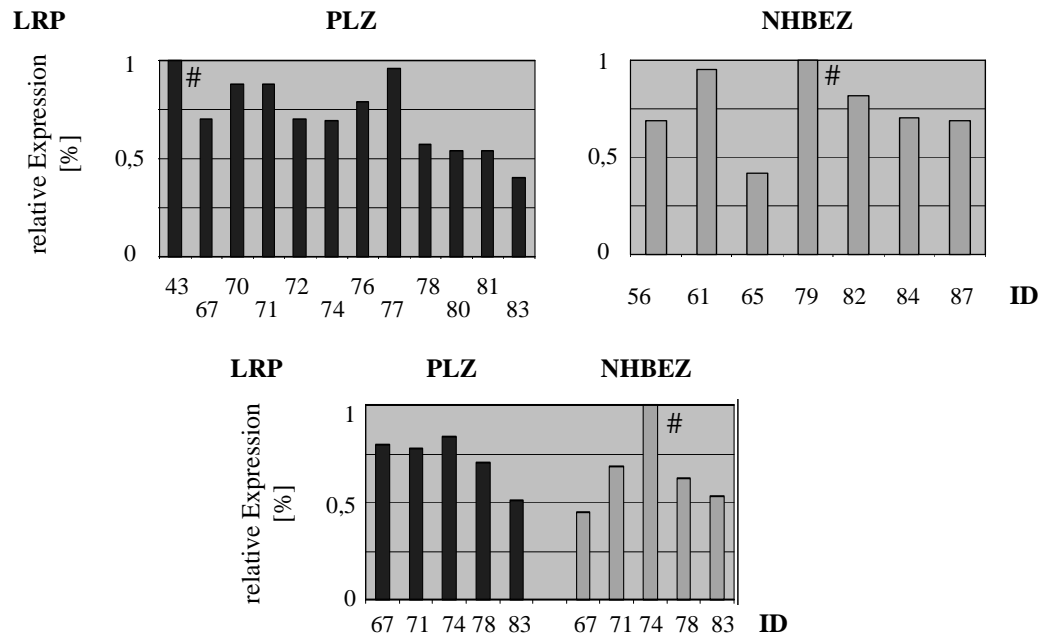


Abb. 21: LRP-Expression in NHBEZ und PLZ verschiedener Patienten. Das Gesamt-Protein der jeweils ersten Auswachskultur (1. Generation) wurde mittels PAGE aufgetrennt und LRP immunochemisch mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Nach ECL-Detektion und densitometrischer Auswertung konnten die Zellkulturen verschiedener Patienten (ID) miteinander verglichen werden. Der größte detektierte Wert jedes Gels wurde dabei als Bezugsgröße (1) festgelegt (#).

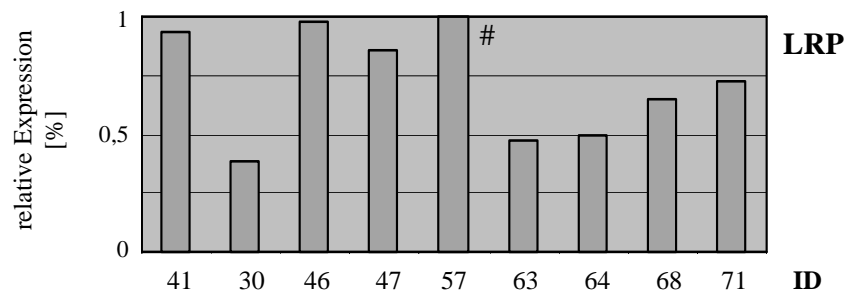


Abb. 22: LRP mRNA in NHBEZ verschiedener Patienten. Gesamt-RNA der jeweils 1. Generationen wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Nach Auftrennung der Amplifikate, Färbung mit Ethidiumbromid und densitometrischer Auswertung wurden die Patienten (ID) miteinander verglichen. Der größte detektierte Wert des Gels wurde dabei als Bezugsgröße (1) festgelegt (#).

Die Expression von LRP mRNA konnte ebenfalls in NHBEZ-Kulturen höherer Generationen mittels RT-PCR untersucht werden. Auch hier waren zwischen den Proben der einzelnen Patienten nur geringe Unterschiede detektierbar (Abb. 23). Diese fielen in den untersuchten Proben geringer aus (maximaler Faktor 1,4 zwischen Probe 16/4 und 18/4) als in den Kulturen der 1. Generation.

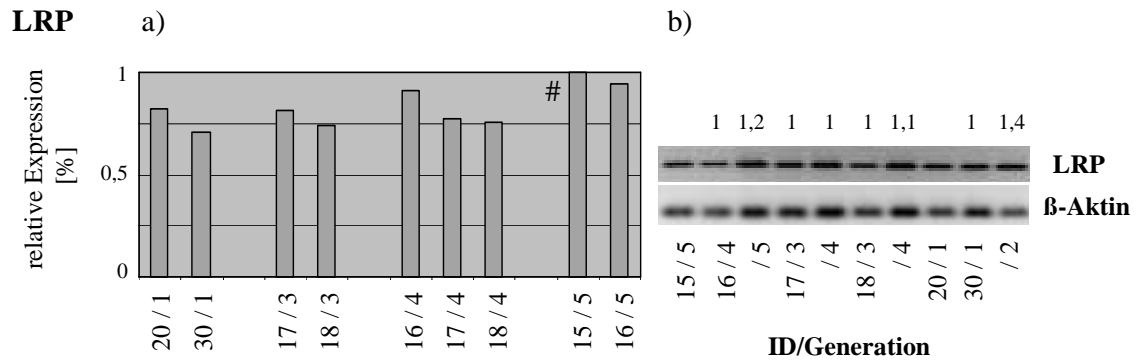


Abb. 23: LRP mRNA in NHBEZ-Kulturen verschiedener Patienten. Gesamt-RNA der angegebenen Generationen wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Nach Auftrennung der Amplifikate, Färbung mit Ethidiumbromid (b) und densitometrischer Auswertung (a) konnten Zellkulturen verschiedener Patienten (ID) und Generationen miteinander verglichen werden. a) Vergleich zwischen den Patienten, der größte detektierte Wert des Gels wurde dabei als Bezugsgröße (1) festgelegt (#). b) Vergleich der Generationen, die jeweils früheste Generation wurde mit 1 festgelegt und die nachfolgende(n) Generationen mit ihr verglichen (siehe auch Abschnitt 1.8.1.).

3.7.2. Individuelle Expression von MRP in humanen Lungenzellkulturen

MRP und MRP mRNA konnte in allen untersuchten Patientenproben nachgewiesen werden. Dabei wurde festgestellt, dass es große inter-individuelle Unterschiede gab (Faktor 4, in Einzelfällen Faktor 6, Abb. 24). Diese Unterschiede waren in den Zellen des Bronchialbaumes (NHBEZ) als auch in denen des Lungenparenchyms (PLZ) zu finden. Bei direktem Vergleich (Abb. 25) schien MRP in den PLZ stärker exprimiert zu sein. Beim direkten Vergleich von mRNA- und Protein-Expression konnten keine Korrelationen gefunden werden. So zeigte z.B. Patient 30 sowohl niedrige RNA- als auch Proteinwerte, Patient 46 ein hohes mRNA-Signal aber wenig detektierbares Protein, Patient 71 für beide Parameter große Werte. Die interindividuellen Schwankungen der mRNA-Expression lagen in einem ähnlichen Bereich wie die der Proteine: Faktor von maximal 6, Patienten 64 und 46.

Wie für LRP wurde auch die Expression von MRP mRNA in NHBEZ-Kulturen höherer Generationen mittels RT-PCR untersucht. Auch hier waren zwischen den einzelnen Patienten Unterschiede nachweisbar (Abb. 26). Diese fielen in gleichen Dimensionen aus (maximal Faktor 7; 5. Generation der Patienten 15 und 16) wie in den Kulturen der 1. Generationen.

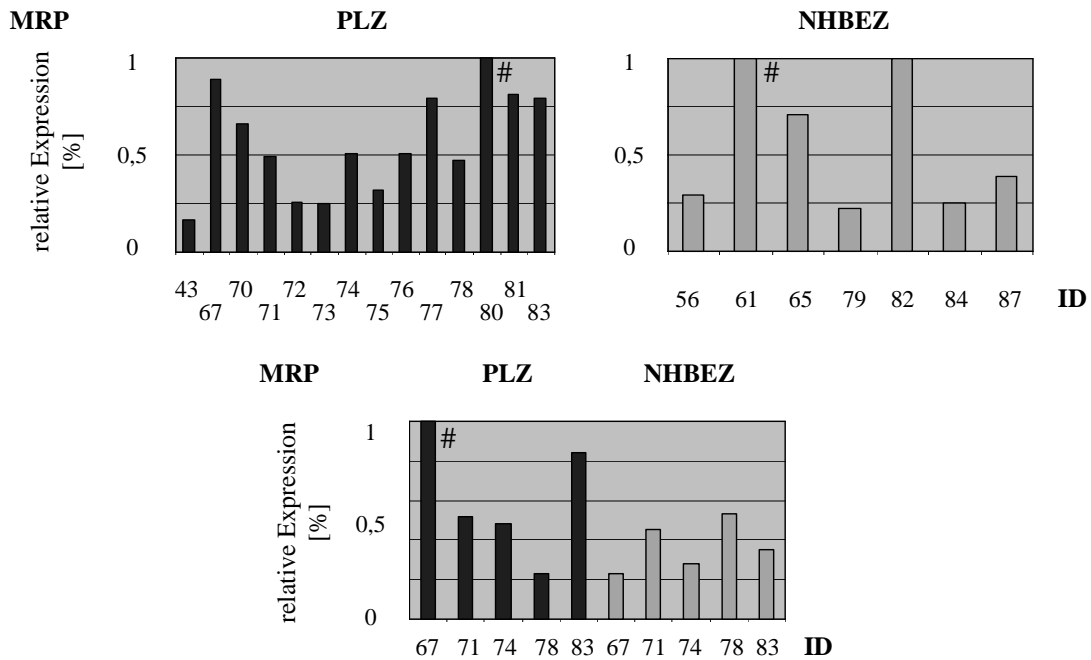


Abb. 24: MRP-Expression in NHBEZ und PLZ verschiedener Patienten. Gesamt-Protein der jeweils 1. Generationen wurde mittels PAGE aufgetrennt und immunochemisch mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Nach ECL-Detektion und densitometrischer Auswertung konnten die Zellkulturen verschiedener Patienten (ID) miteinander verglichen werden. Der größte detektierte Wert jedes Gels wurde dabei als Bezugsgröße (1) festgelegt (#).

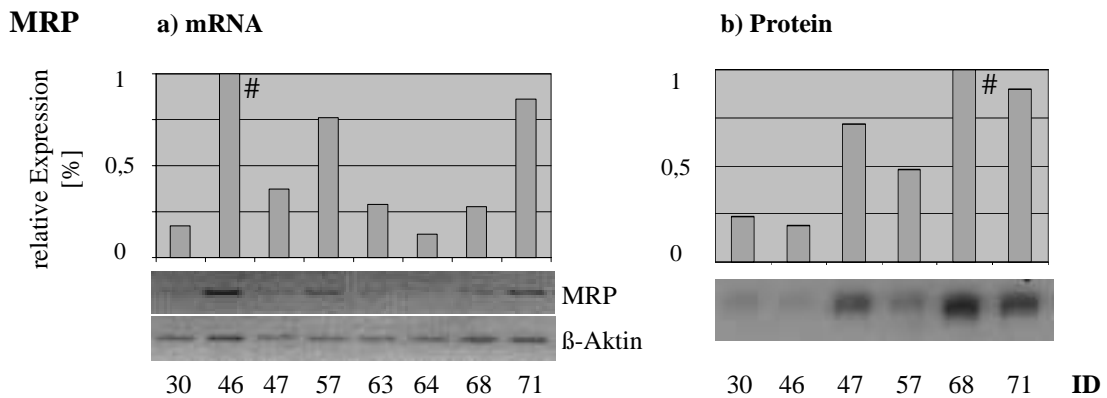


Abb. 25: Inter-individuelle Variabilität von MRP in NHBEZ. Gesamt-RNA und Gesamt-Protein von NHBEZ der 1. Generationen wurden mittels RT-PCR (a) und Western-Blot-Analyse (b) aufgearbeitet. Zur Quantifizierung wurden die Banden densitometrisch ausgewertet. Zum Vergleich der NHBEZ-Kulturen verschiedener Patienten (ID) wurde der größte detektierte Wert eines Ansatzes als Bezugsgröße (1) festgelegt (#).

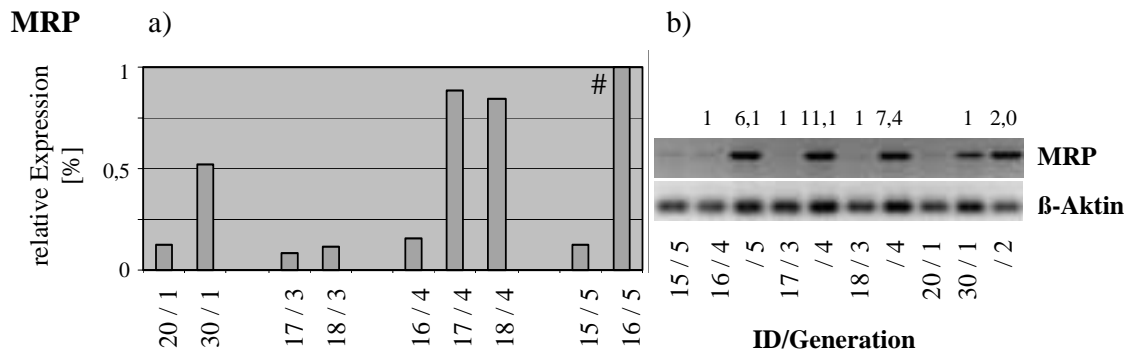


Abb. 26: MRP mRNA in NHBEZ-Kulturen verschiedener Patienten. Gesamt-RNA der angegebenen Generationen wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Nach Auftrennung der Amplifikate, Färbung mit Ethidiumbromid (b) und densitometrischer Auswertung (a) konnten NHBEZ-Kulturen verschiedener Patienten (ID) und Generationen miteinander verglichen werden. a) Vergleich zwischen den Patienten, der größte detektierte Wert des Gels wurde dabei als Bezugsgröße (1) festgelegt (#). b) Vergleich der Generationen. Die jeweils früheste Generation wurde als 1 festgelegt und die nachfolgende(n) Generationen mit ihr verglichen (siehe auch Abschnitt 1.8.2.).

3.7.3. Individuelle Expression von P-gp in humanen Lungenzellkulturen

Für die Untersuchung der P-gp-Expression stand nur die RT-PCR zur Verfügung. Die interindividuellen Schwankungen waren für die P-gp-Expression im Vergleich zum LRP und MRP am stärksten ausgeprägt. In einigen Proben (Patient 41, Abb 27 und Patient 20, Abb. 28) waren selbst nach 40 PCR-Zyklen keine Signale detektierbar. Diese Unterschiede waren bei Kulturen höherer Generationen noch deutlicher ausgeprägt (Abb. 28a). Hier konnte in 5 von 9 Proben kein quantifizierbares mRNA-Signal nachgewiesen werden.

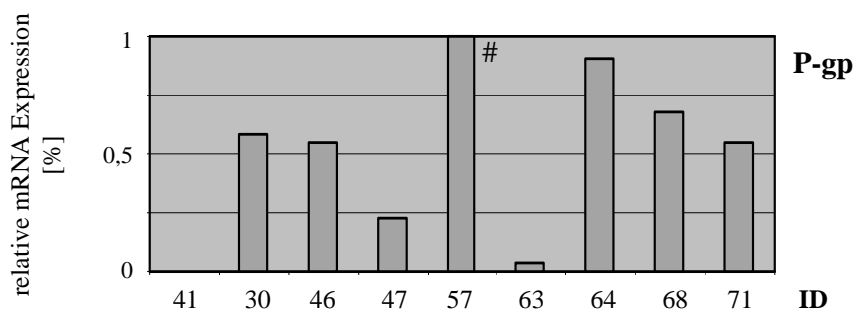


Abb. 27: P-gp mRNA in NHBEZ-Kulturen verschiedener Patienten. Gesamt-RNA der jeweils 1.Generationen wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Nach Auftrennung der Amplifikate, Färbung mit Ethidiumbromid und densitometrischer Auswertung konnten die NHBEZ-Kulturen verschiedener Patienten miteinander verglichen werden. Der größte detektierte Wert des Gels (#) wurde dabei als Bezugsgröße (1) festgelegt.

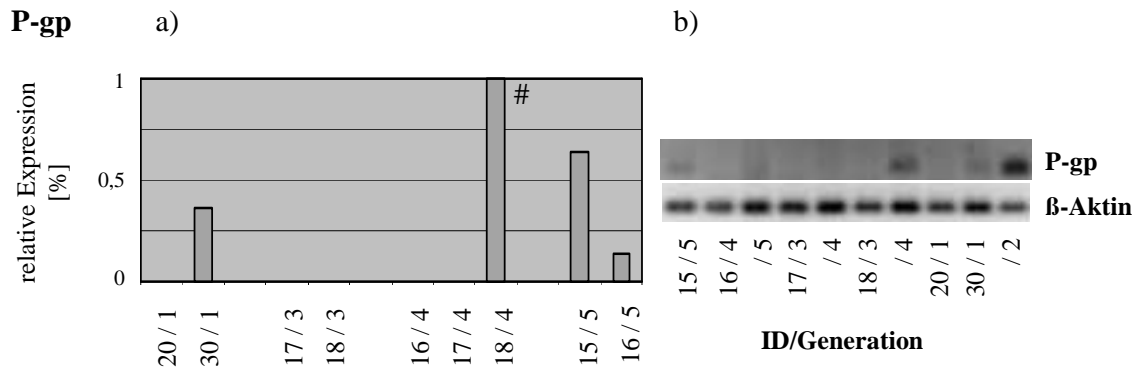


Abb. 28: P-gp mRNA in NHBEZ-Kulturen verschiedener Patienten. Gesamt-RNA der angegebenen Generationen wurde mittels RT-PCR amplifiziert. Nach Auftrennung der Amplifikate, Färbung mit Ethidiumbromid (b) und densitometrischer Auswertung (a) konnten Zellkulturen verschiedener Patienten (ID) und Generationen miteinander verglichen werden. a) Vergleich zwischen den Patienten, der größte detektierte Wert des Geles wurde dabei als Bezugsgröße (1) festgelegt (#). b) Vergleich der Generationen. Die jeweils früheste Generation wurde mit 1 festgelegt und die nachfolgende(n) Generationen mit ihr verglichen (siehe auch Abschnitt 1.8.3).

3.8. Expression von LRP, MRP und P-gp in Auswuchskulturen verschiedener Generationen und Passagen von NHBEZ und PLZ

3.8.1. LRP-Expression in Kultur humaner Lungenzellen

Die Auswertung der LRP Protein- und mRNA-Expressionsdaten (Abb. 29) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultur-Generationen und Passagen. Es war aber sowohl in den Zellen der peripheren Lunge als auch der Bronchialbereiche eine tendenzielle Erhöhung der LRP-Expression in den Auswuchskulturen der ersten Umsetzungen und Passagen im Vergleich zur 1. Generation zu erkennen (Abb. 29 a). Die LRP mRNA-Expression in NHBEZ-Kulturen (Abb. 29 b) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturstadien.

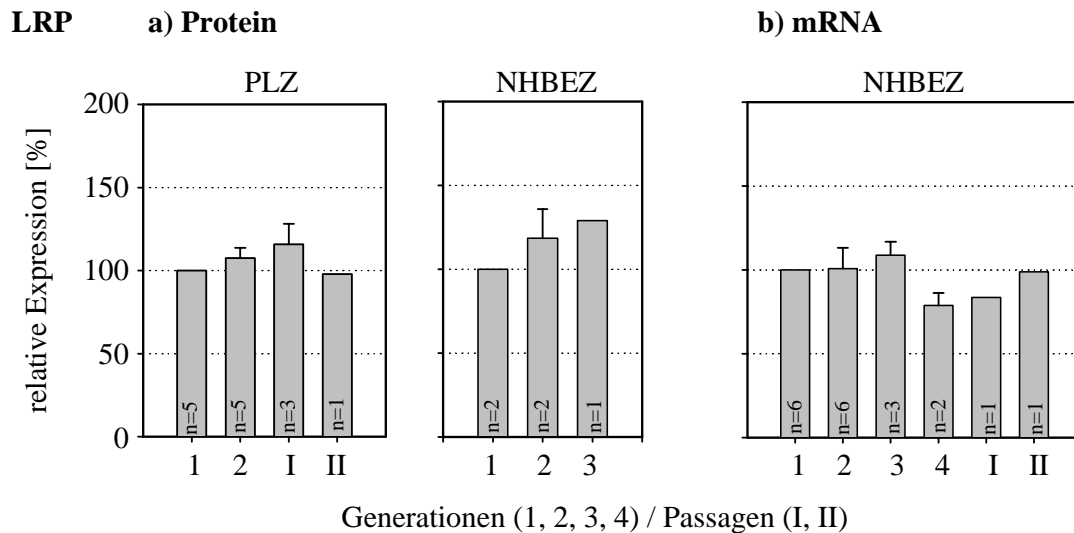


Abb. 29: LRP-Expression in humanen PLZ und NHBEZ-Kulturen. Densitometrische Auswertung von Western-Blot (a) und RT-PCR (b) Analysen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der angegebenen Kulturen verschiedener Patienten (n). Die Werte der höheren Kulturen wurden mit denen der jeweils 1. Generation (100 %) verglichen.

NHBEZ-Kulturen einiger Patienten konnten bis in höhere Generationen und Passagen gehalten werden. Es zeigte sich für die ersten Kulturabschnitte eine leicht erhöhte LRP-Expression. In Kulturen hoher Passagen fiel der LRP-Proteingehalt dann kontinuierlich ab (Abb. 30a). Demgegenüber stieg die mRNA-Expression nach anfänglicher Stabilität (bis V. Passage) in den Kulturen höherer Generationen an (NHBEZ 16, 17, 18, 30, Abb. 23b; NHBEZ Patient 85, Abb. 30b).

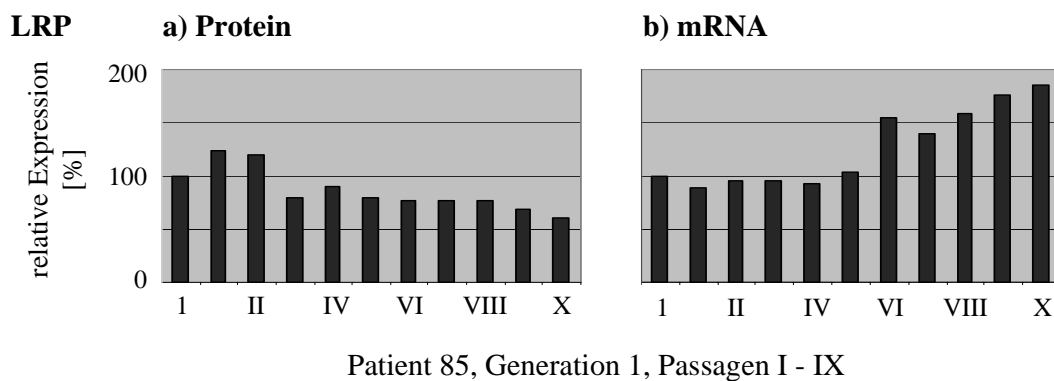


Abb. 30: LRP-Expression in NHBEZ-Kulturen (Patient 85). Densitometrische Auswertung von Western-Blot (a) und RT-PCR (b) Analysen. Aus der ersten Auswuchskultur (1. Generation) wurden durch Ablösen und Neuaussaat mehrere Schalen mit Subpassagen generiert. Jeweils eine Schale wurde nach Erreichen der Subkonfluenz aufgearbeitet, die verbleibenden wieder passagiert. Die 1. Generation wurden als Bezug (100 %) genommen und die Passagen mit ihr verglichen.

3.8.2. MRP-Expression in Kultur humaner Lungenzellen

Sowohl in den Zellen der peripheren Lunge als auch in den Bronchialepithelzellen wurde eine erhöhte MRP-Expression in den Auswachskulturen der ersten Umsetzungen (Generationen >2) im Vergleich zur 1. Generation gemessen. Diese Erhöhungen waren für die 2. Generationen der PLZ und die 2. und 3. Generation der NHBEZ signifikant, $p < 0,01$ (Abb. 31a). Demgegenüber fiel die mRNA Expression in Kulturen der Bronchialepithelzellen mit Anstieg der Generationszahl von der 2. - 4. Generation kontinuierlich ab, in der vierten Generation signifikant, $p < 0,005$ (Abb. 31b). Bei Betrachtung der Einzelwerte war zu beobachten, dass bei zwei der untersuchten Patientenproben der 2. Generation ein Anstieg der mRNA-Expression zu verzeichnen war.

Bei längerer Sub-Kultivierung (Passagen) konnte eine relativ unveränderte MRP-Expression beobachtet werden (Patient 85, Abb. 32a), nur der Wert für die erste Passage war erhöht. Die mRNA-Expression dagegen stieg sprunghaft an, blieb in den nächsten Passagen weitestgehend stabil und stieg bei späteren Passagen weiter an. Ein ähnlicher sprunghafter Anstieg konnte auch bei Kulturen höherer Generationen (NHBEZ 16/4-5, 17/3-4, 18/3-4, 30/1-2; Abb. 26b) beobachtet werden.

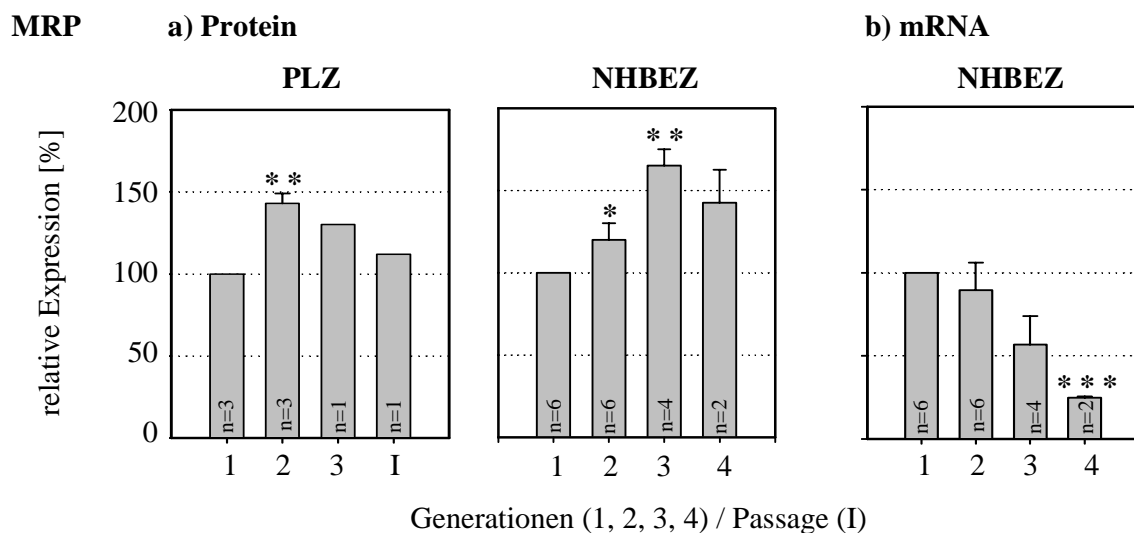


Abb. 31: MRP-Expression in humanen PLZ und NHBEZ-Kulturen. Densitometrische Auswertung von Western-Blot (a) und RT-PCR Analysen (b). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der angegebenen Kulturen verschiedener Patienten (n). Die Werte der höheren Kulturen wurden mit denen der jeweils 1. Generation (100 %) verglichen. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$

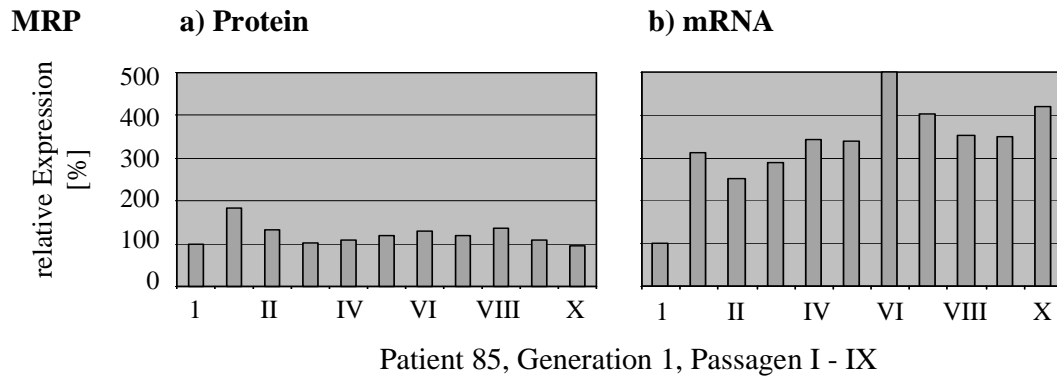


Abb. 32: MRP-Expression in NHBEZ-Kulturen (Patient 85). Densitometrische Auswertung von Western-Blot (a) und RT-PCR (b) Analysen. Aus der ersten Auswaskkultur (1. Generation) wurden durch Ablösen und Neuaussaat mehrere Schalen mit Subpassagen generiert. Jeweils eine Schale wurde nach Erreichen der Subkonfluenz aufgearbeitet, die verbleibenden wieder passagiert. Die 0. Generation wurden als Bezug (100 %) genommen und die Passagen mit ihr verglichen.

3.8.3. P-gp mRNA-Expression in Kultur humaner Lungenzellen

Die P-gp-Expression konnte nur auf mRNA-Ebene untersucht werden. In allen Proben stieg diese in der 2. Generation an ($1,8 \pm 0,2$; $p < 0,005$ zur 1. Generation), wobei drei (63, 68, 71) der sieben Proben stärker anstiegen. Eine ähnliche Gruppierung war auch in der 3. Generation zu sehen. Die Expression in den NHBEZ-Kulturen der Patienten 68 und 71 waren wie in den 2. Generationen erhöht, die der Patienten 66 und 67 hingegen vermindert.

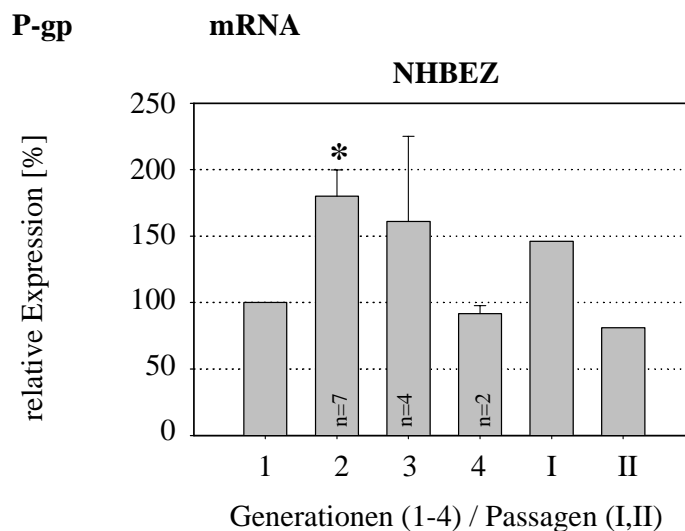


Abb. 33: P-gp-Expression in humanen NHBEZ-Kulturen. Densitometrische Auswertung von RT-PCR Analysen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der angegebenen Kulturen verschiedener Patienten (n). Die Werte der höheren Kulturen wurden mit denen der jeweils 1. Generation (100 %) verglichen. Signifikanzniveau, * $p < 0,005$

3.9. Einfluß reaktiver Sauerstoff-Spezies auf die Expression von LRP, MRP und P-gp in Kulturen humaner Lungenzellen

3.9.1. Einfluß von Paraquat auf die Expression von LRP in NHBEZ und PLZ

Kulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen reagierten auf eine Inkubation mit 10 μ M PQ nach 24 h mit einer Verringerung der LRP-Expression (4 Patienten, Abb. 34a). Die mRNA-Expression (Abb. 34b) konnte methodisch bedingt an einer größeren Probenzahl untersucht werden als die LRP Protein-Expression. Die statistische Auswertung für alle 10 Proben ergab für den 24 h-Wert nur eine tendenzielle Erhöhung (128 % \pm 24,6 %, MW \pm SEM). In 6 der untersuchten Kulturen war nach PQ-Inkubation ein Abfall der mRNA-Expression zu verzeichnen (Abb. 34b,I), darunter 2 Proben (ID 57, 62) für die auch das LRP Protein untersucht werden konnte. In den anderen vier Kulturen stieg die LRP mRNA-Expression nach 12- und 24stündiger Exposition signifikant an (Abb. 34b,II). Dazu gehörte eine Patientenprobe (ID 67) für die auch die Protein-Expression (erniedrigt) untersucht wurde.

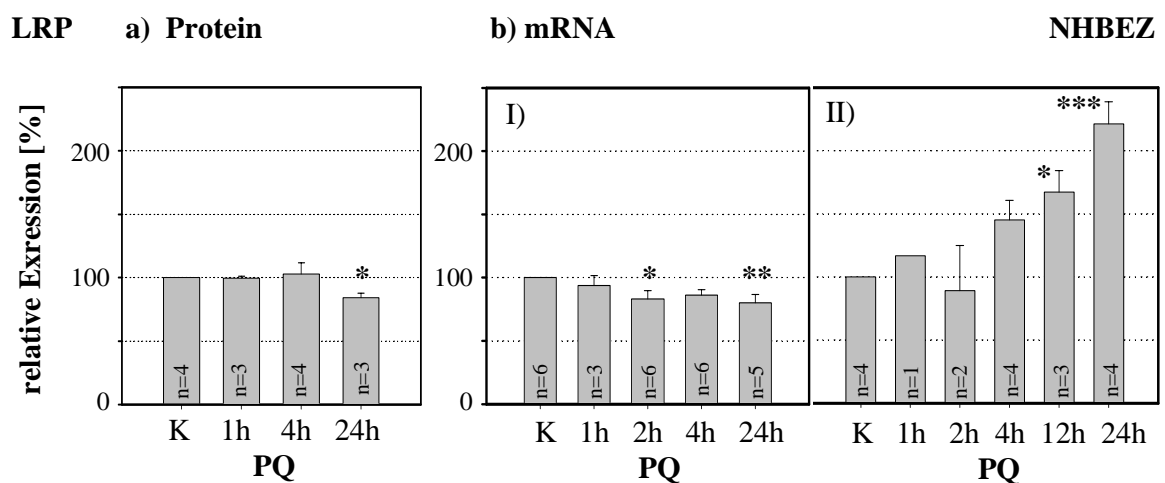


Abb. 34: LRP-Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach Paraquatinkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit 10 μ M PQ im Medium. Statistische Auswertung von (a) Western-Blot (57, 62, 67, 75) und (b) von RT-PCR Analysen (I ; 41, 57, 62, 66, 68, 71)(II ; 65, 67, 72, 74). Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen (Mittelwerte \pm SEM). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$;

Kulturen peripherer Lungenzellen reagierten nach 24 h Behandlung mit 10 μ M PQ mit einem Anstieg der LRP-Expression (Abb. 35a). Die mRNA blieb im untersuchten Kulturintervall unverändert (Abb. 35b). Dabei konnten für 3 Resektate sowohl RNA als auch Protein untersucht werden (L67, L69, L70).

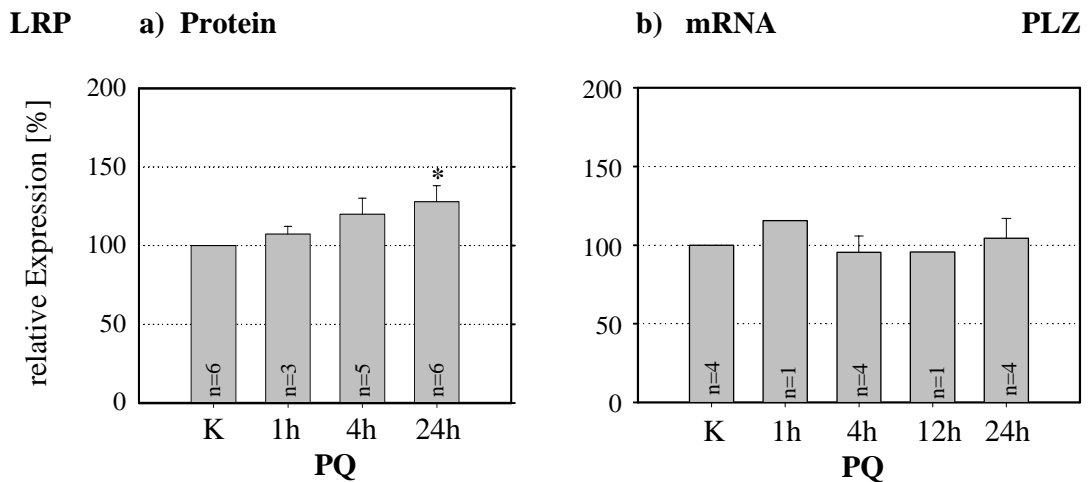


Abb. 35: LRP-Expression in humanen PLZ-Kulturen nach PQ-Inkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen mit 10 μ M PQ im Medium. Statistische Auswertung von (a) Western-Blot (L67, L69, L70, L71, L75, L89) und (b) RT-PCR Analysen (L67, L69, L70, L74). Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen. (Mittelwerte \pm SEM). Signifikanzniveau: *, $p < 0,005$

3.9.2. Einfluß von H₂O₂ auf die Expression von LRP in NHBEZ und PLZ

NHBEZ-Kulturen wurden mit 100 μ M H₂O₂ inkubiert. Es konnten nur 2 Proteinproben untersucht werden. Dabei blieb bei Patient 75 die Expression innerhalb der 24 h stabil, bei Patient 89 stieg das detektierbare LRP-Signal auf 160 % der des Ausgangswertes an (ohne Abbildung). Die RNA-Untersuchungen erbrachten bei statistischer Auswertung aller Daten (n=6) keine signifikanten Veränderungen (Abb. 35b). Die Einzelwertbetrachtung ergab dagegen folgenden Befund: Es kam bei den Proben der Patienten 41 und 62 zu einem schnellen Anstieg des Signals (1,67 und 1,25 fach, innerhalb 1h), gefolgt von einer Normalisierung innerhalb der nächsten 3h. In den Patientenproben 68 und 71 blieb die mRNA-Expression stabil, es wurde nur ein leichter Abfall des 1 h-Wertes detektiert. Bei den Patientenproben 72 und 71 war nach 12 h bzw. 24 h (24 h 1,67; 1,32 fach) ein Anstieg der LRP mRNA zu beobachten.

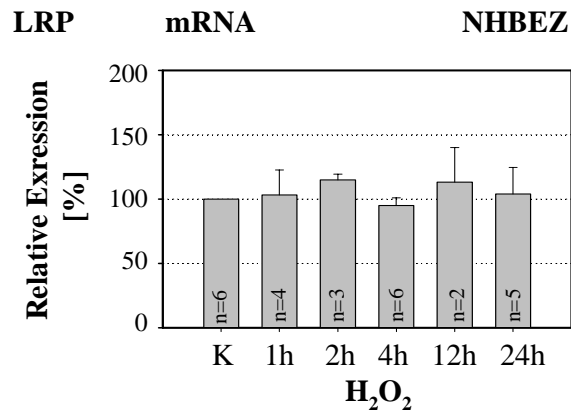


Abb. 36: LRP-Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach H₂O₂-Inkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit 100 μ M H₂O₂ im Medium. Statistische Auswertung von RT-PCR Analysen (41, 62, 68, 71, 72, 74). Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen (Mittelwerte \pm SEM).

Wurden PLZ-Kulturen mit 100 μ M H₂O₂ inkubiert, kam es nach einem tendenziellen Anstieg des Signals nach 1 h, nach 24 h zu einer signifikanten Verringerung von immun-detektierbarem LRP (Abb. 37a). Die untersuchten mRNA-Proben nach 24 h waren erhöht (L70 auf 128,3 % und L74 auf 120,1 % der Kontrolle) (Abb. 37b).

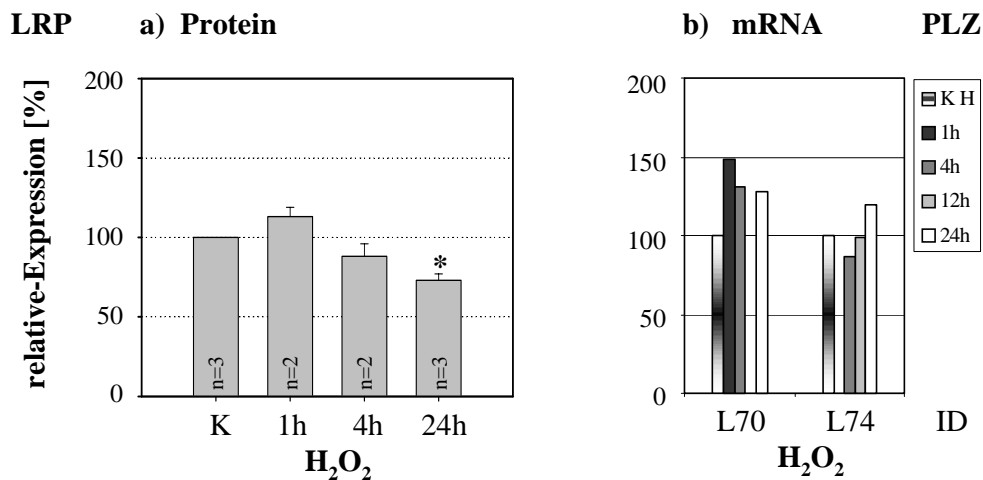


Abb. 37: LRP-Expression in humanen PLZ-Kulturen nach H₂O₂-Inkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit 100 μ M H₂O₂ im Medium. Statistische Auswertung (a) von Western-Blot (L70, L75, L89) und densitometrische Auswertung (b) von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen (Mittelwerte \pm SEM). Signifikanzniveau: *, p<0,005

3.9.3. Einfluß von Paraquat auf die Expression von MRP in NHBEZ und PLZ

Die Inkubation von NHBEZ-Kulturen mit 10 μ M PQ führte nach 24 h zu einem Anstieg der MRP-Expression (Abb. 38). Dies obwohl nur drei von sechs Einzelwerten erhöht waren (Pat. 71, 74, 89 - Werte 1,87, 1,38, 1,51), die Werte der anderen Proben war unverändert (Pat. 67, 72, 75 - Werte 0,99, 1,06, 1,03). Die Auswertung der RNA Proben erbrachte keine statistischen Unterschiede. Es kam nach einem schnellen Abfall (1h Werte) zu einer Erholung nach 4 h, mit einem Anstieg der 12 h und 24 h Werte. Auch hier gab es zwischen den einzelnen Proben unterschiedliche Reaktionen. Bei Vergleich von Protein- und mRNA-Daten für identische Proben (n=5) konnte festgestellt werden, dass die Proben 67, 68, 72 (unveränderte Expression) und 71 (Erhöhung) für beide Parameter gleichsinnig verliefen. Bei Probe 74 war nach 24 h das Proteinsignal erhöht (1,5 faches der Kontrolle), und die 4 h, 12 h und 24 h Werte der mRNA waren erniedrigt (66,3 %; 59,6 %; 61,8 %).

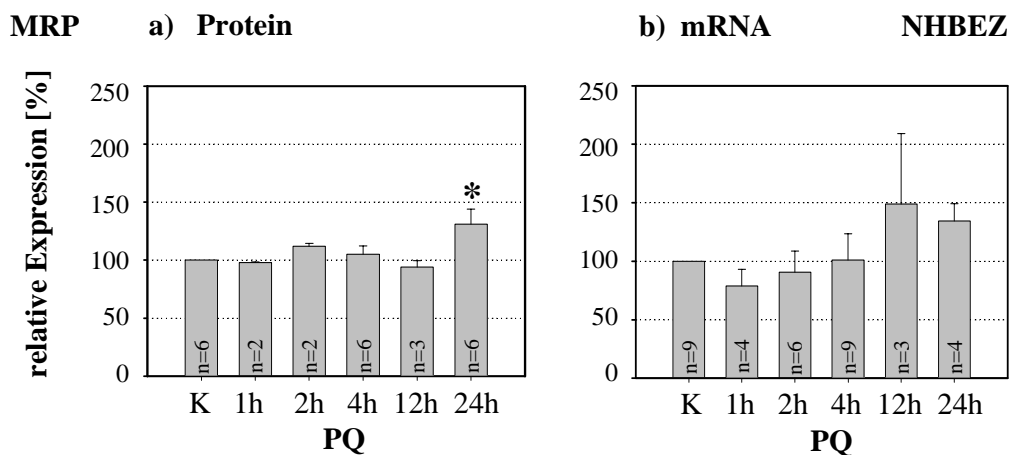


Abb. 38: MRP-Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach PQ-Inkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit 10 μ M PQ im Medium. Statistische Auswertung von (a) Western-Blot (67, 68, 71, 72, 74, 75, 89) und (b) von RT-PCR Analysen (41, 57, 62, 65, 66, 67, 68, 71, 72, 74). Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen (Mittelwerte \pm SEM). Signifikanzniveau: *, $p < 0,05$

Die Expression von MRP in PLZ-Kulturen nach PQ-Inkubation zeigt Abbildung 39a. Es war ein tendenzieller Anstieg nach 4 h Inkubation mit PQ zu verzeichnen. Innerhalb der Gruppe waren 4 von 7 Proben (L70, L71, L72, L75) weitgehend unverändert und bei Proben L69, L74 und L89 ergab sich eine deutliche Erhöhung. Dies kommt in den insgesamt großen Standardabweichungen zum Ausdruck. Die Werte für die mRNA-Expression (Abb., 39b) zeigen ebenfalls einen tendenziellen Anstieg der MRP mRNA nach 1 h Inkubation. Dieses Signal fiel dann wieder ab, ohne im experimentellen Zeitfenster den Kontrollwert wieder zu erreichen. Auch hier standen wieder Proben für eine parallele

Betrachtung von Protein- und mRNA-Expression zur Verfügung. Es konnten jedoch für die untersuchten Zeitpunkte beim Vergleich der verschiedenen Proben keine eindeutigen Korrelationen festgestellt werden. So exprimierten PLZ-Kulturen von Patient 69 nach 24 h verstärkt Protein, die mRNA-Expression war unverändert (1 h, 24 h) oder erniedrigt (4 h). Bei Kultur L70 blieb die Proteinexpression unverändert, das mRNA-Signal war jedoch nach 1 h bzw. 4 h verstärkt (2,4faches der Kontrolle), der 24 h Wert war ebenfalls leicht erhöht (1,5 fach).

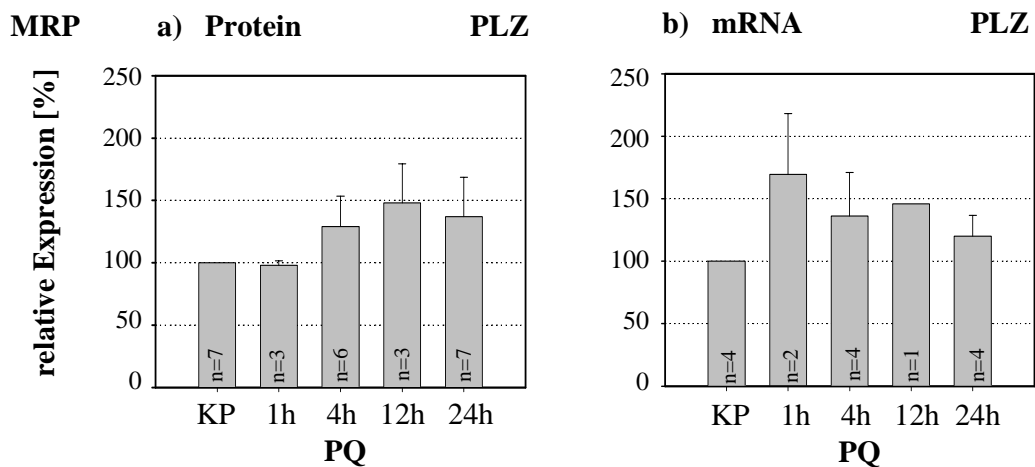


Abb. 39: MRP-Expression in humanen PLZ-Kulturen nach PQ-Inkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen mit 10 μ M PQ im Medium. Statistische Auswertung von (a) Western-Blot (L69, L70, L71, L72, L74, L75, L89) und (b) RT-PCR Analysen (L67, L69, L70, L74). Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen. (Mittelwerte \pm SEM)

3.9.4. Einfluß von H₂O₂ auf die Expression von MRP in NHBEZ und PLZ

Die Zugabe von H₂O₂ in das Kulturmedium (100 μ M) führte in NHBEZ-Kulturen zu einer verringerten MRP-Expression (Abb. 40a). 4 h nach Versuchsbeginn kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme des detektierbaren Proteinsignals, nach 12 h und 24 h war dieses statistisch gesichert ($p < 0,01$, $p < 0,001$ zur Kontrolle). Im Gegensatz zum Protein stieg die mRNA-Expression in 5 von 6 untersuchten Zellkulturen während der beobachteten 24 h an. Es konnte aber kein einheitlicher Verlauf der mRNA-Expression innerhalb der Beobachtungszeit festgestellt werden (Abb. 40b). So stieg in den NHBEZ-Kulturen der Patienten 41 und 71 die mRNA nach 4 h auf das 1,5 fache der Kontrolle an, im weiteren Verlauf der Kultur fiel das Signal wieder ab (Patient 71, nach 24 h auf 0,75faches der Kontrolle). Bei den NHBEZ-Kulturen 68, 72 und 74 kam es innerhalb der ersten Stunden zu einem Abfall der Expression, nach 24 h lagen die Werte über denen der Ausgangswerte.

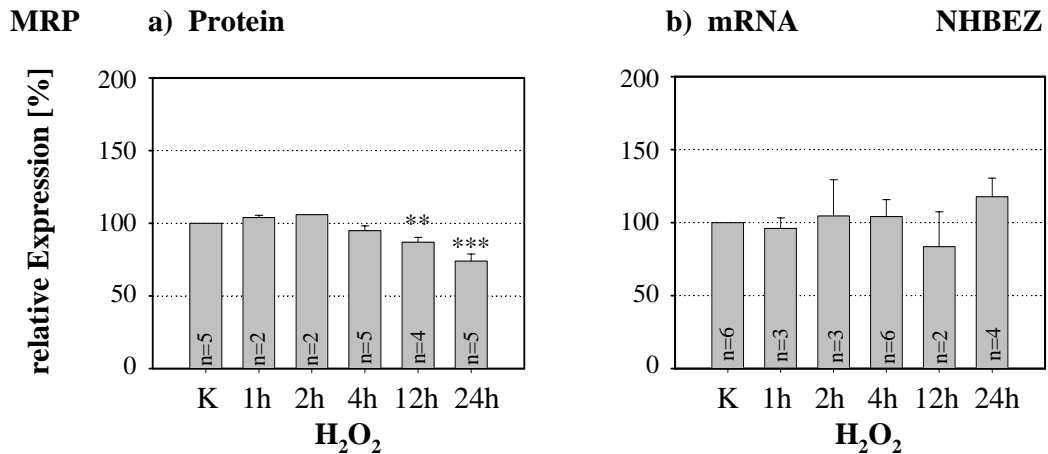


Abb. 40: MRP-Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach H₂O₂-Inkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit 100 µM H₂O₂ im Medium. Statistische Auswertung (a) von Western-Blot (68, 71, 72, 74, 75) und (b) von RT-PCR Analysen (41, 62, 68, 71, 72, 74). Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen (Mittelwerte ± SEM). Signifikanzniveau: **, p<0,01; ***, p<0,001

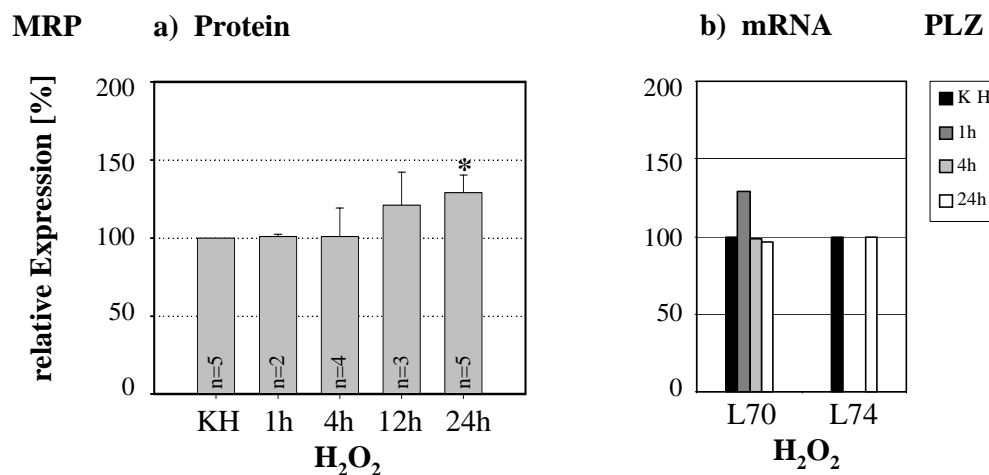


Abb. 41: MRP-Expression in humanen PLZ-Kulturen nach H₂O₂-Inkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen mit 100 µM H₂O₂ im Medium. Statistische Auswertung von (a) Western-Blots (L70, L72, L74, L75, L89) und (b) densitometrische Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen. (Mittelwerte ± SEM) Signifikanzniveau: *, p<0,05

Die Zellkulturen der peripheren Lunge reagierten auf Inkubation mit 100 µM H₂O₂ mit einem allmählichen Anstieg der MRP-Expression (Abb. 41a). Nach 24 h war diese um 25 % erhöht (p <0,05). Zur Untersuchung der mRNA standen nur zwei Kulturen zur Verfügung (Abb. 41b). In beiden Fällen konnte 24 h nach Inkubation mit H₂O₂ keine Veränderung der mRNA-Expression beobachtet werden. Bei Probe 70 kam es nach 1 h zu einer Erhöhung des Signals.

3.9.5. Einfluss von Paraquat auf die P-gp mRNA-Expression in NHBEZ und PLZ

Für Untersuchungen der P-gp-Expression standen nur RNA-Proben zur Verfügung. Die Kultivierung von NHBEZ-Kulturen mit 10 μ M PQ im Medium erbrachte keine signifikanten Veränderungen. Es konnte aber eine Einteilung in zwei Gruppen erfolgen. Bei 4 der 7 untersuchten Kulturen kam es innerhalb der beobachteten 24 h zu einer deutlichen mRNA Expressionserhöhung (Patienten 41, 67, 68, 74 auf 1,5 - 3,5 faches der Kontrollen), wobei es zeitliche Unterschiede gab. Bei den anderen 3 Patienten fiel die mRNA-Expression im Verlauf von 24 h ab.

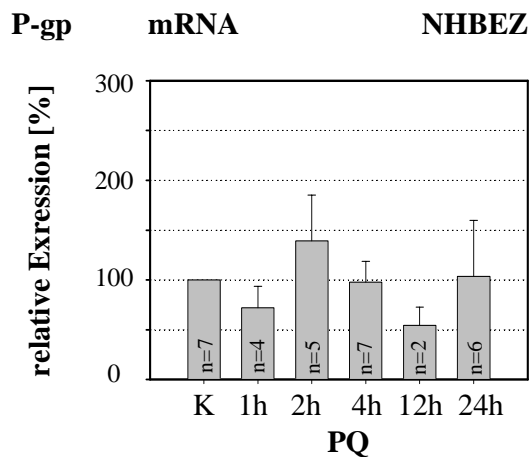


Abb. 42: P-gp mRNA-Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach PQ-Inkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen (41, 62, 66, 67, 68, 71, 74) mit 10 μ M PQ im Medium. Statistische Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen. (Mittelwerte \pm SEM)

Auch für die mit 10 μ M Paraquat inkubierten PLZ konnte eine Gruppierung hinsichtlich der Reaktion auf den gegebenen Stressor vorgenommen werden. Wie in Abb. 43 zu sehen ist, reagierten die Kulturen L67 und L69 mit einer Verringerung und die Kulturen L70 und L74 mit einer Erhöhung der Pgp mRNA-Expression.

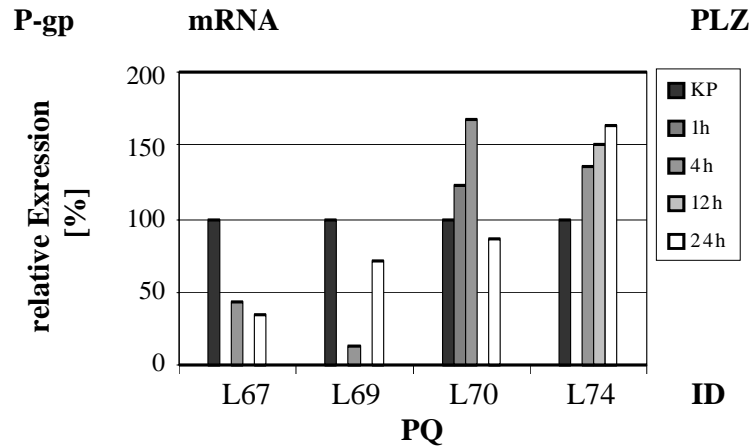


Abb. 43: P-gp mRNA-Expression in humanen PLZ-Kulturen nach PQ-Inkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen mit 10 μM PQ im Medium. Densitometrische Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen.

3.9.6. Einfluss von H_2O_2 auf die Expression von P-gp mRNA in NHBEZ und PLZ

Normale humane Bronchialepithelzellen reagierten in allen untersuchten Kulturen mit einer erhöhten mRNA-Expression auf die Behandlung mit 100 μM H_2O_2 (Abb. 44). In 5 der 6 untersuchten Proben geschah das in den ersten 4 h der Inkubation. Die Kulturen von Patient 74 zeigten eine Reaktion erst nach 12 h bzw. 24 h.

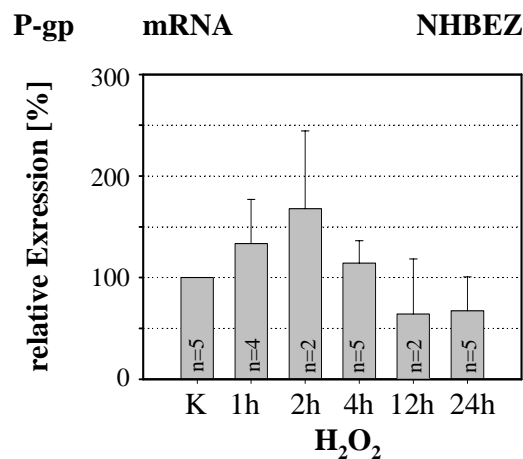


Abb. 44: P-gp mRNA-Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach H_2O_2 -Inkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen (41, 62, 68, 71, 72, 74) mit 100 μM H_2O_2 im Medium. Statistische Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen. (Mittelwerte \pm SEM)

Auch PLZ-Kulturen reagierten mit einem Anstieg der mRNA für das P-gp (Abb. 45). Es konnten nur zwei Patienten miteinander verglichen werden. In Probe L74 stieg der mRNA-Gehalt innerhalb der ersten 4 h Stunden an (> dreifaches der Kontrolle) und fiel dann langsam wieder ab, ohne innerhalb des beobachteten Zeitintervalls wieder den Ausgangsgehalt zu erreichen. Bei Probe L70 wie auch bei L74 wurde der P-gp mRNA-Gehalt 24 h nach H₂O₂-Behandlung verdoppelt.

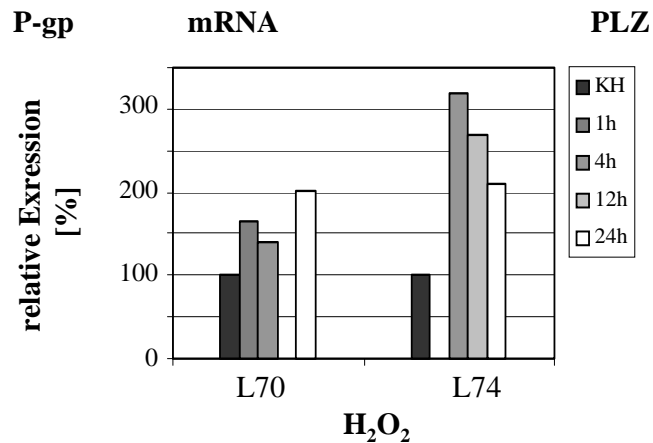


Abb. 45: P-gp mRNA-Expression in humanen PLZ-Kulturen nach H₂O₂-Inkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen mit 100 µM H₂O₂ im Medium. Densitometrische Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen.

4. Diskussion

Die Lunge stellt das primäre Kontaktorgan für alle inhalativ aufgenommenen Xenobiotika dar und wird auf Grund der hohen Durchblutungsrate durch systemisch verfügbare Fremdstoffe belastet (Foth, 1995). Neben der respiratorischen Funktion geraten die metabolischen Potenzen der Lunge zunehmend ins Blickfeld des Interesses. Die biochemischen Faktoren sind durch ein lungenspezifisches Muster von Enzymen des Phase I- und Phase II-Metabolismus sowie durch die Verteilung von Transportproteinen charakterisiert.

Dabei ist zu beachten, dass im Respirationstrakt die Inhalation von vielen Gasen, z.B. NO₂, SO₂, Ozon und Partikeln sowie das systemischen Anfluten von Fremdstoffen in einem engen Zusammenhang mit der Entstehung von ROS und freien Radikalen stehen.

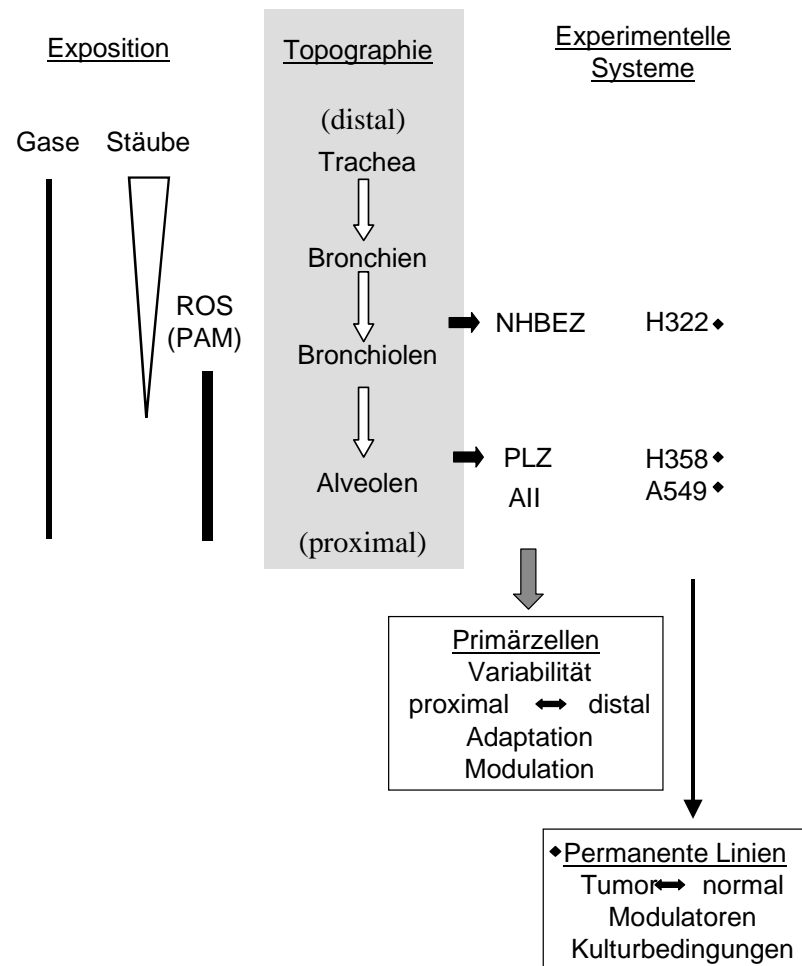


Abbildung 46: Experimentelles Konzept.

Exposition	potenzielle Mediatoren von oxidativem Streß und deren Vermögen in proximale Bereiche vorzudringen
Topographie	Abschnitte der Lunge mit Querverweis auf die ursprüngliche Lokalisation der untersuchten Zellsysteme
Experimentelle Systeme	eingesetzte Zelltypen, deren Beziehungen (topographisch) zueinander und mögliche Regulationsmöglichkeiten

Abbildung 46 illustriert noch einmal die in dieser Arbeit untersuchten Zellsysteme, ihre topographische Verteilung und Expositionsmöglichkeiten.

Die Auslösung von Lungentumoren durch die Aktivierung prokanzerogener Verbindungen zeigt, dass die Lunge auch für die Biotransformation von großer toxikologischer Bedeutung ist. So hat die Lunge im Vergleich zur Leber (unter Berücksichtigung von Organmasse und metabolisch aktiver Zelltypen) sogar einen höheren Substratumsatz (Foth, 1995; Foth et al., 1995; Schrader et al., 1998; Schulze et al., 1998). In Kanzerogenitätsstudien konnte gezeigt werden, dass dabei bestimmte Zellpopulationen des Lungengewebes auf äußere Einflüsse empfindlicher reagieren. Von den mehr als 40 in der Lunge identifizierten Zelltypen konnte nur für wenige die Beteiligung am Stoffwechsel von Fremdstoffen nachgewiesen werden. Dazu zählen AII-Zellen, Clara-Zellen, Zilien-tragende Bronchialepithelzellen und pulmonäre Alveolarmakrophagen (Belinsky et al., 1990; Baron und Voigt, 1990; Belinsky et al., 1991; Belinsky et al., 1992; Synday et al., 1995).

4.1. Radikalische Schädigung durch Paraquat und Wasserstoffperoxid

Die einzelne Zelle vermag bis zu einem gewissen Grad, oxidativen Stress zu tolerieren, Schäden zu reparieren oder sich mit einer Steigerung von Schutzmechanismen (z.B. Expression antioxidativer Enzyme, erhöhte GSH-Spiegel) anzupassen. Die toxischen Wirkungen auf die Zelle können damit reversibel sein. Irreversible Veränderungen führen zum vollständigen Untergang der Zelle, z.B. durch den programmierten Zelltod (Apoptose) oder die sofortige Nekrose. In vielen Zellsystemen ist die Induzierbarkeit des programmierten Zelltodes durch ROS und die Aufhebung bzw. Verlangsamung durch Antioxidanzien nachgewiesen (Buttke und Sandstorm, 1995).

Eine Inkubation mit PQ führte in AII-Kulturen und den Tumorlinien H322 und H358 zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Vitalität (MTT-Assay; Abbildung 12, Kapitel 3.2.). Mit PQ behandelte AII-Primärkulturen reagierten sensitiver als H358 und H322-Zellen. Zwischen den beiden Lungentumorlinien traten nur tendenzielle Unterschiede auf. Dabei waren die AII-Zell-ähnlichen H358 empfindlicher als die Clara-Zell-ähnlichen H322. Die beobachteten Sensitivitätsunterschiede traten tendenziell schon bei niedrigen PQ-Konzentrationen auf, was für ein unterschiedliches Aufnahmevermögen der Zellen spricht. Smith et al. haben 1974 konzentrationsabhängige Unterschiede bei der PQ-Aufnahme durch Lungenzellen beschrieben. Bei niedrigen Konzentrationen waren nur AII-Zellen betroffen, da diese PQ über einen aktiven Mechanismus aufnehmen. Hohe

Konzentrationen schädigten die verschiedenen Zellpopulationen gleichermaßen, da hier die aktiven Transportprozesse gegenüber der passiven Aufnahme durch Diffusion weniger zum Tragen kamen.

Chen et al. (1992) haben belegt, dass die Aufnahme von PQ in AII-Zellen in Kultur zeitlich begrenzt ist und nur eine bestimmte maximale Menge aufgenommen wird, diese liegen weit unter den von *in vivo* gefundenen Werten. Dort wurden in AII-Zellen bis zu 50-fach höhere PQ-Konzentrationen als im Blutstrom gefunden (Witschi et al., 1977). Die Tatsache, dass derselbe Zelltyp *in vivo* solch hohe Paraquatmengen gegen einen Konzentrationsgradienten akkumuliert, *in vitro* dagegen nicht, kann an der fehlenden basal-apikalen Ausrichtung in Kultur liegen. PQ wird *in vivo* über einen aktiven Transportmechanismus (Polyamin-Transporter) aus dem Blut, also über die basale Seite aufgenommen (Ameno et al., 1994; Baldwin et al., 1975; Chen et al., 1992; Hayes und Laws, 1991; Hoet et al., 1994; Smith, 1981 und 1986; Witschi, 1977). Es ist anzunehmen, dass die verantwortlichen Transporter unter den gewählten Kulturbedingungen (keine Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht) nur schwach exprimiert sind, da die apikal-basale Ausrichtung fehlt und es dadurch zu einer veränderten Transporter-Expression gekommen sein kann.

Die Persistenz von PQ im Kulturmedium der Lungentumorlinien konnte über 48 h belegt werden, d.h. über den ganzen Inkubationszeitraum blieb die Konzentration von PQ im Kulturmedium konstant.

Zwischen den mit H_2O_2 behandelten Zellen gab es keine Sensitivitätsunterschiede (MTT-Test). Eine Inkubation mit H_2O_2 führte in allen drei untersuchten Zell-Typen zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der gemessenen Stoffwechselaktivität (Abbildung 12, Kapitel 3.2.). Wasserstoffperoxid wird innerhalb von 30 min aus dem Zellmedium eliminiert, es diffundiert sehr schnell in alle Zellen und wird dort verstoffwechselt (Engstrom et al., 1990; Heberlein et al., 2000; Röhrdanz und Kahl, 1998). Eine direkte radikalische Schädigung kann also im Gegensatz zum PQ nur während dieser relativ kurzen Zeitspanne stattfinden. Die entstehenden Schäden an kultivierten Zellen durch H_2O_2 sind in vielen Studien belegt, z.B. Mitochondrien- und Kern-Genom-Veränderungen (McDonald et al., 1993).

Andererseits kann H_2O_2 durch seine schnelle Verfügbarkeit, einen raschen Abbau und gute Membranpermeabilität ideal als Signalmolekül (second messenger) für verschiedene Stimuli fungieren (Remacle et al., 1995).

Die generierten Radikale (z.B. von Paraquat und H_2O_2) sind sehr kurzlebig und die Schäden werden von den Reparatursystemen der Zelle zum Teil sofort repariert. Eine

Möglichkeit einen Einblick in den Wirkungsmechanismus dieser Radikale zu bekommen, ist die Bestimmung von oxidativen Veränderungen an Molekülen, z.B. DNA-Strangbrüche oder anhand von Folgeprodukten einer radikalischen Schädigung, z. B. nach Lipidperoxidation von Membranbestandteilen. In dieser Arbeit wurde Malondialdehyd (MDA) im Medium der AII-Zellen, H358 sowie H322 nach einer Inkubation mit PQ oder H_2O_2 untersucht. MDA ist ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation und gibt Auskunft darüber, ob die verwendeten Stressoren und/ oder daraus generierte ROS in der Lage sind, Membranbestandteile zu schädigen.

MDA und damit die Lipidperoxidation konnte schon in den unbehandelten Kulturen detektiert werden (Abbildung 13, Kapitel 3.3.). Primäre AII-Zellen zeigten dabei höhere MDA-Spiegel (0,73 pM) im Kulturmedium als die Tumorzelllinien H322 und H358 (0,35 pM; 0,46 pM). Die Tumorzelllinien scheinen demnach besser an den "Stress" der Kultivierung angepasst zu sein als die primären AII-Zellen. Aus den Beobachtungen lässt sich ebenfalls ableiten, dass die Lipidperoxidation einen "normalen" Prozess in lebenden Systemen darstellt und von den Reparatursystemen der Zellen erfasst werden muss.

Im Kulturmedium der AII-Zellen fand nach Inkubation mit PQ und H_2O_2 ein konzentrationsabhängiger Anstieg von MDA statt. Schon bei niedrigen Konzentrationen (50 μ M PQ, 100 μ M H_2O_2 , Vitalität 75% bis 85%) wurde eine signifikante Erhöhung von MDA im Kulturmedium gemessen, während sich in Kulturen der Tumorzelllinien H322 und H358 auf PQ kein, und auf H_2O_2 erst ab 1 mM ein signifikanter Anstieg fand, welcher bei noch höheren Konzentrationen nicht weiter anstieg. Ab dieser Konzentration von 1 mM H_2O_2 waren weniger als 50% der metabolischen Aktivität nachzuweisen.

Die Messungen der MDA-Spiegel in den Tumorzelllinien H322 und H358 erfolgten in AII-Zell-Medium, da eine Messung in DMEM, dem Standardmedium der Tumorzelllinien, mit der zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethode nicht möglich war. Da Tumorzelllinien, nach 24 h Kultur im AII-Medium kultiviert wurden, fast die doppelte metabolische Aktivität (MTT-Test) gegenüber Kontrollzellen in DMEM zeigten (Daten nicht dargestellt), muss offen bleiben, ob das Ausbleiben von MDA typisch für die Tumorzelllinien ist oder im Wesentlichen auf Einflüsse seitens der Komponenten im AII-Medium zurückgeführt werden kann.

Eine Lipidperoxidation an Membranen tritt ein, wenn das reaktive Produkt in der Lage ist, ein Wasserstoffatom von einer Methylengruppe der Membranfettsäuren zu entreißen. Das entstehende Kohlenstoffradikal kann wieder mit Sauerstoff reagieren und andere Peroxyl-Radikale können entstehen. Eine einzige Initiation kann, je nachdem wo das erste

Wasserstoffatom abgespalten wurde, unterschiedliche Mengen an Hydroperoxidmolekülen generieren. Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid sind nicht der Lage diese Kettenreaktion anzustoßen, während die Hydroxylradikale auf Grund ihrer großen Reaktionskraft als die eigentlich auslösende Spezies angesehen werden (Gardner, 1989; Wagner et al., 1994).

MDA ist nur ein Abbauprodukt der Lipidperoxidation. Es existiert entsteht hauptsächlich bei der Peroxidation von Linol- und Arachidonsäure. In Säugerzellen wird es sehr schnell über Malonsäure und Azetaldehyd zu Azetat verstoffwechselt (Esterbauer et al., 1991). MDA selbst besitzt toxische Eigenschaften und kann mit den verschiedensten Zellbestandteilen, sogar mit DNA reagieren (Benamira et al., 1995). Ein Nachweis im Kulturmedium kann nur unverstoffwechseltes und freies, außerhalb der Zellen befindliches MDA erfassen. Es muss entweder aus der intakten Zelle transportiert werden, direkt an der Oberfläche entstehen oder bei ihrer völligen Zerstörung freigesetzt werden. Im genutzten Untersuchungssystem war nur die Summe dieser Vorgänge erfaßbar. Aus diesem Grund spricht das Ausbleiben eines Anstiegs von MDA im Kulturmedium der Tumorzelllinien nicht gegen das Vorliegen eines radikalischen Schädigungsprozesses in den Zelllinien. So fanden Ogata und Manaba 1990, 3 Tage nach PQ-Inkubation ultrastrukturelle Schäden im Alveolarepithel, ein Anstieg von MDA aber erst nach 5 Tagen. Der sprunghafte Anstieg von MDA im Kulturmedium durch H_2O_2 (zwischen 0,5 und 1 mM) in den Tumorzelllinien könnte mit dem Auflösen des Zellverbandes und der resultierenden Freisetzung von MDA erklärt werden.

In einem Mikrosomen-System war die MDA-Bildung proportional abhängig von den Konzentrationen an PQ, Sauerstoff, NADPH, der Inkubationszeit und umgekehrt proportional vom Zusatz an SOD und Vitamin E (Tomita und Okuyama, 1994; Trush et al., 1981). Hoet et al. zeigten 1997 einen drastischen Anstieg der PQ-Toxizität in AII-Zellen der Ratte und des Menschen mit steigendem Sauerstoffpartialdruck. Die toxikologische Wirkung von Paraquat wird demnach von der Enzymausstattung (PQ-reduzierendes kontra antioxidativ schützendes System), dem Sauerstoffpartialdruck und der erreichten PQ-Konzentration im Gewebe bestimmt. Dies ist ein Korrelat der PQ-Lungentoxizität, die typischerweise zu einer Lungenfibrose mehrere Wochen nach Exposition führt.

4.2.Expression von *mdr1b* in AII-Zell-Kulturen der Ratte

Alveolar Typ II-Zellen stellen einen hochdifferenzierten Zelltyp der Säugerlunge dar. Die Primärkultur isolierter AII-Zellen ermöglicht es, diese wichtige Zellpopulation der Lunge zu untersuchen. AII-Zellen sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Morphologie und Funktion der Säugerlunge beteiligt. Nach Verletzungen des Lungenepithels proliferieren sie und differenzieren zu AI-Zellen (Adamson, 1974; Adamson, 1975; Evans, 1975; Mason und Williams, 1977). Durch die Sekretion extrazellulärer Matrix- und Membran-abbauender Enzyme (z. B. Metalloproteinasen; Pardo, 1997) und aufbauender Komponenten (z. B. Fibronectin, Kollagen; Dunsmore und Rannels, 1995; Rannels, 1987; Simon, 1993) sind sie aktiv am Epithelaufbau und dessen Reparatur beteiligt. Sie synthetisieren, speichern und sezernieren Surfactant (Buckingham, 1964; Askin, 1971; King, 1974) und sind am Flüssigkeits- und Elektrolyttransport der Alveolen beteiligt (Mason, 1982 und 1983). Durch ihre exponierte Lage im Körper sind sie einer Vielzahl inhalativ aufgenommener und systemisch verfügbarer Stoffe direkt ausgesetzt, andererseits aber auch am Metabolismus und so einer möglichen Aktivierung beteiligt (Castranova, 1988; Schrader, 2000).

Die Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen (z.B. Surfactant-, Enzym- und Matrix-Komponenten-Produktion oder von Transportfunktionen) sind sehr stark von den Kulturbedingungen abhängig. So kommt es in AII-Zellen während der Kultur zu einer Änderung der Zellform (Abflachung und Ausbreitung), zu einer verminderten Surfactantsynthese und zu veränderter Cytochrom-P450-Expression (Dobbs, 1985 und 1990; Glatt et al., 1988; Simon et al., 1991). Dabei ist unklar, ob die Veränderungen *in vitro* einer Dedifferenzierung der AII-Zellen zuzuordnen sind oder einer Differenzierung zu Alveolar TypI-Zellen entsprechen. Die Ausdifferenzierung zu AI-Zellen besitzt *in vivo* eine große Bedeutung für die Entwicklung und Regeneration des alveolären Epithels, das eine große Rolle im Gasaustausch der Lunge spielt und somit primär respiratorische Funktionen erfüllt (Adamson, 1974; Adamson, 1975; Evans, 1975; Mason und Williams, 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurden Kulturen dieses Zelltyps über einen Zeitraum von 4 Tagen untersucht. Mit Hilfe einer speziellen Färbetechnik (Mason et al., 1985) und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde im untersuchten Zeitintervall der Erhalt eines wichtigen AII-Zell-Markers (Surfactant-Produktion; Abbildung 10, Kapitel 3.1.1.) nachgewiesen. Die kultivierten Zellen waren zu > 90 % AII-Zellen.

P-Glykoproteine zeigen in der Lunge im Vergleich zu anderen Organen (z.B. Leber, Darm, Niere) nur eine geringe Expression (Borst, 1993). Diese Expression ist zwischen den einzelnen Abschnitten der Lunge unterschiedlich verteilt. So ließ sich P-gp im Bronchus (apikale Bereiche) nicht aber in Pneumozyten detektieren (Biedler, 1992; Cordon-Cardo, 1990). Auch Kapillarendothelzellen der Bronchien und der alveolären Bereiche zeigen nur eine schwache oder keine Expression (Cordon-Cardo, 1989 und 1990).

Die *mdr1b* mRNA-Expression frisch isolierter AII-Zellen der Rattenlunge war nur gering ausgeprägt. Es kam jedoch unter den gewählten Kulturbedingungen (Kollagenbeschichtung, Medienzusammensetzung siehe Kapitel 1.2.3.) zu einer zeitabhängigen intrinsischen mRNA-Überexpression (Tag 3, vierfach gegenüber Tag 0; Abbildung 14, Kapitel 3.5.1.). Eine unspezifische RNA-Expression konnte durch Amplifikation von β -Aktin mRNA ausgeschlossen werden. Aus Untersuchungen an Rattenhepatozyten ist eine intrinsische Überexpression ebenfalls bekannt, auch dort kommt es in Abhängigkeit von der Kulturzeit zum Anstieg der *mdr1b*-Expression (Silverman und Schrenk, 1995; Hirsch-Ernst, 1995 und 1998; Fardel et al., 1997; Lee et al., 1995; Ziemann et al., 1999). Hill et al. zeigten 1996, dass zwischen verschiedenen Rattenstämmen (Sprague-Dawley, Fischer, Wistar) diese zeitabhängige *mdr1b* mRNA-Expression in Hepatozyten unterschiedlich stark ausfiel (2-, 3,5- und 4,6-fach). Der von dieser Arbeitsgruppe festgestellte Anstieg der Expression in Hepatozyten von Wistar-Ratten (4,6-fach), konnte in vergleichbarer Höhe (4-fach, Abbildung 14a, 3.5.1.) auch in den untersuchten AII-Zellen des gleichen Stammes gemessen werden. Ziemann et al. (1999) zeigten, dass auch das funktionelle P-gp (Rhodamin 123-Efflux) in Primärkulturen von Rattenhepatozyten verstärkt exprimiert wurde.

Transportstudien konnten an den hier untersuchten AII-Zellkulturen leider nicht vorgenommen werden, da die Anzahl an Versuchstieren und daraus resultierend auch die Anzahl einzusetzender Primärkulturen limitiert war und nicht genügend Ausgangsmaterial für eine zuverlässige Messung bereitgestellt werden konnte.

Die *mdr1b*-Isoform der Rattenleber zeigt auch *in vivo* eine intrinsische, nicht Xenobiotika-vermittelte Überexpression im Rahmen von Cholestase, Leberregeneration und Hepatokarzinogenese (Schrenk et al., 1992; Nakatsukasa et al., 1993; Teeter et al., 1993). Diese ist mit einer Resistenz gegenüber hepatotoxischen Verbindungen assoziiert (Silverman und Schrenk, 1997). Die genauen Regulationsmechanismen bedürfen noch der Aufklärung. In Zellkulturen der Lunge ist ebenfalls noch unklar, welchen Einfluss die Komponenten des Kulturmediums und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

auf die *mdr1b* Expression haben. Es ist z. B. bekannt, dass Insulin (Bestandteil des verwendeten AII-Mediums) die *mdr1b* Expression in Ratten-Hepatomzellen, aber nicht in primär kultivierten Rattenhepatozyten induziert (Zhou und Kuo, 1997). Der Einfluß von Serum als Medienzusatz ist ebenfalls beschrieben. Zellkulturen in serumhaltigen Medien zeigten eine 4 - 6fach verlängerte P-gp-Halbwertszeit als serumfreie Kulturen gleicher Zellen (Muller et al., 1995). Die nicht normierbare Zusammensetzung verschiedener Seren-Chargen (u. a. Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme) schließt aus die Einflüsse im Einzelnen zu steuern. Dies muß beim Vergleich entsprechender Kultursysteme berücksichtigt werden.

Schuetz und Schuetz (1993) konnten für Primärkulturen von Rattenhepatozyten zeigen, daß Laminin und Typ IV Kollagen, wenn sie als extrazelluläre Matrixkomponenten eingesetzt werden, physiologische Modulatoren der basalen und chemotherapeutisch induzierbaren Expression von P-gp darstellen. Die extrazelluläre Matrix beeinflusst die Differenzierung und den Metabolismus vieler Zellen *in vitro* (Kleinmann et al., 1986 und 1987). Dies ist in soweit von Interesse, da die hier untersuchten AII-Zellen *in vivo* aktiv am Aufbau und der Regeneration des Lungengewebes beteiligt sind. Sie synthetisieren Matrix-Bestandteile (Fibronektin, Kollagen Typ IV, Laminin und Proteoglykane) aber auch Matrix-Metallo-Proteinasen wie Kollagenasen und Gelatinasen (Dunsmore und Rannels, 1995; Rannels, 1987; Simon, 1993; Pardo, 1997). Zusätzlich zu den Zell-Matrix-Kontakten sind auch Zell-Zell-Wechselwirkungen an der *mdr1b*-Expressions-Regulation beteiligt. Mit hoher Dichte kultivierte Zellen zeigen gegenüber Kulturen mit „normaler“ Zelldichte eine deutlich erhöhte Halbwertszeit für P-gp (Muller et al., 1995). Die Regulation der *mdr1b*-Expression durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte könnte dabei über Veränderungen des Zytoskeletts (Zellgestalt) erfolgen, da vermittelnde Zelladhäsionsproteine und Integrinrezeptoren mit Aktin-Mikrofilamenten des Zellskeletts in Wechselwirkungen treten (Rouslahti und Öbrink, 1996). AII-Zellen zeigen, so lange sie im Gewebeverband eingebettet sind, eine kuboidale Form. Während des Wachstums auf Kulturoberflächen (z.B. Plastik mit rigider Kollagenbeschichtung) ist eine abgeflachte Form zu erkennen. Gleichzeitig kommt es im Verlauf der Kultur zur Einstellung AII-Zell-spezifischer Funktionen (Surfactantsynthese, Cytochrom-P450-Expression; Dobbs, 1985 und 1990, Glatt et al., 1988; Simon et al., 1991). Demgegenüber stieg die *mdr1b*-Expression in AII-Zellen während der Kultur an. Dabei ist unklar, ob diese *in vitro* Veränderungen einer Dedifferenzierung der AII-Zellen zuzuordnen sind oder einer Differenzierung zu AI-Zellen (wie z. B. bei Regeneration des respiratorischen Epithels nach Schädigung) entsprechen.

Es bleibt demnach noch zu klären, wie die *mdr1b* Expression in AII-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen reguliert wird. Veränderungen der *mdr1b*-Expression im Rahmen von Regenerationsprozessen oder im Verlauf fibrotischer Veränderungen der Lunge könnten weitere Erkenntnisse über die endogene Regulation dieses Proteins hervorbringen.

Primärkulturen von AII-Zellen reagierten sowohl auf den kurzlebigen Stressor H_2O_2 (Nachweisdauer in serumhaltigen Kulturmedien 10 - 30 min; Simon, 1991; Engstrom, 1990) als auch auf PQ mit einem konzentrationsabhängigen Anstieg der *mdr1b* mRNA Expression (Abbildungen 15 und 16, Kapitel 3.5.2.). Dabei waren die Zellen empfindlicher gegenüber Paraquat. Um die gleiche Erhöhung der Expression (50 %) zu erreichen war eine 10fach höhere H_2O_2 Konzentration notwendig (10 μM zu 100 μM). β -Aktin als Marker für den allgemeinen Zellstatus blieb bei niedrigen Konzentrationen (10 μM PQ, 50 μM H_2O_2) stabil. Hohe Konzentrationen (50 μM PQ, 100 μM H_2O_2) führten zu einem Abfall des β -Aktin Signals (Abbildungen 15b und 16b, Kapitel 3.5.2.). Die entsprechenden MTT-Daten zeigten für Paraquat ebenfalls einen deutlichen Einfluß auf den allgemeinen Zellstatus (50 μM , nur noch 70 % Vitalität). Für beide Stressoren wurden für die hohen Konzentrationen (50 μM PQ, 100 μM H_2O_2) erhöhte MDA-Spiegel im Medium (oxidative Schädigung der Zellmembranen) gemessen.

Mediatoren von ROS führen in Rattenhepatozyten zu einer Erhöhung der intrinsischen Expression von *mdr1b* P-gp. Die intrinsische als auch die durch ROS induzierte Expression läßt sich durch die Gabe von Antioxidanzien vermindern (Bae et al., 1997; Hirsch-Ernst et al., 1998; Ziemann et al., 1999). Hirsch-Ernst et al. (2000) konnten in Primärkulturen von Rattenhepatozyten eine 50 %ige Steigerung der *mdr1b* mRNA-Expression durch 50 μM H_2O_2 feststellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die AII-Zellen der Rattenlunge eine ähnliche Größenordnung beobachtet (50 %ige Steigerung der *mdr1b*-Expression durch 100 μM H_2O_2). Die Expressionssteigerung in den Hepatozytenkulturen ist offenbar sensitiv gegenüber Sauerstoff, da diese durch Erhöhung des Sauerstoffanteils in der Brutschrankluft (8 % auf 16 %) noch weiter verstärkt werden konnte. Ziemann et al. (1999) zeigten außerdem eine parallele Erhöhung der *mdr1b*-Expression und der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Aktivität durch 1mM H_2O_2 . Die PARP (ein evolutionär konserviertes Kernprotein) wird ausschließlich durch Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA aktiviert (Bürkle et al., 1993). Wartenberg und Mitarbeiter (2001) zeigten einen konzentrationsabhängigen Einfluß einer H_2O_2 -Inkubation

auf die P-gp-Expression in humanen Karzinom-Zellen. Zelltoxische H_2O_2 -Konzentrationen ($750 \mu\text{M}$) führten zu einer verstärkten Expression von P-gp, subletale Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$ und $200 \mu\text{M}$) führten zu einer verminderten Expression.

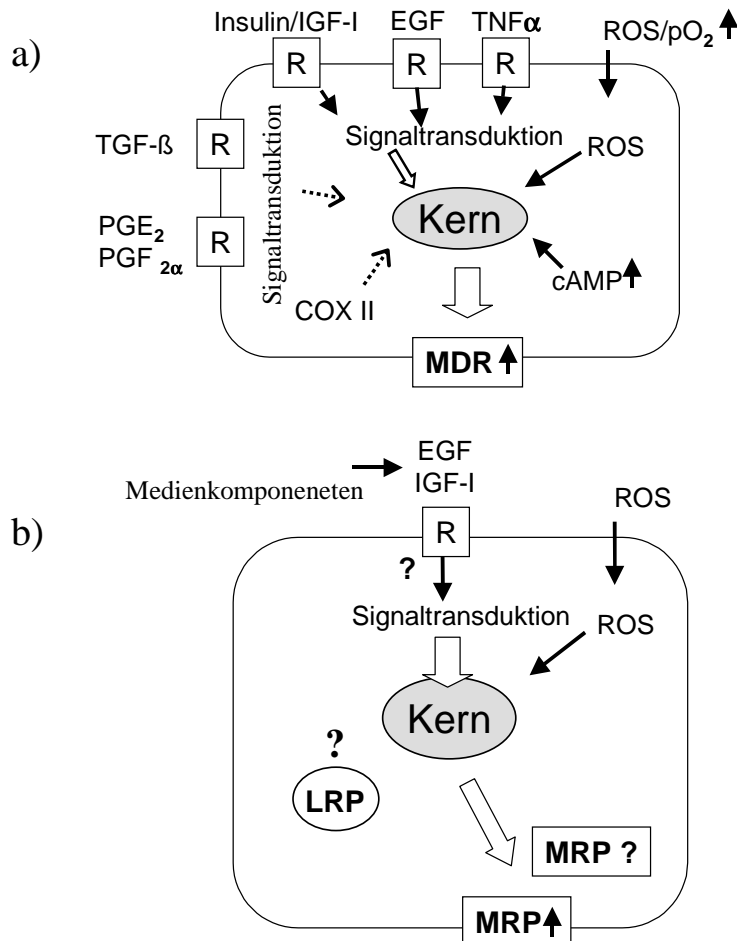


Abbildung 47: (a) Induktion der Expression des MDR1-Gen-Produkts (P-gp) durch exogene Einflüsse (Literaturdaten aus primären Rattenhepatozyten) und (b) Arbeitsmodell der Modulation der ABC-Transporter in den untersuchten Lungenzellen.

Ein Zusammenhang zwischen Generierung intrazellulärer ROS durch EGF und TNF- α und verminderter P-gp-Expression wurde ebenfalls beobachtet (Wartenberg et al., 2001; Stein et al., 1996 und 1996a). Zu berücksichtigen ist aber, daß während Signaltransduktionsvorgängen ROS in bedeutend geringeren Mengen anfallen ($\text{nM} - \mu\text{M}$), als für die Generierung von DNA-Strangbrüche (mM) notwendig ist (Burdon et al., 1996). Die Ursachen der Steigerung der Expression ($50 \mu\text{M}$; Hirsch-Ernst et al., 2000) oder einer verminderten Expression (Wartenberg et al., 2001) des P-Glykoproteins durch vergleichbare Konzentrationen H_2O_2 ($1 \mu\text{M}$ bis $200 \mu\text{M}$), können verschiedene Gründe haben. Die Untersuchungen der zwei Arbeitsgruppen erfolgte zum einen in verschiedenen

Spezies (Ratte vs. Human) zum anderen in unterschiedlichen Kultursystemen (Normalzellen vs. Tumorzellen). Die Promotorregionen des *mdr1b*-Gens (Ratte) und des *MDR1*-Gens (Mensch) sind zum Teil bekannt. Die Vielzahl der möglichen Wechselwirkungen bedürfen aber noch weitergehender Abklärung. So ist z. B. unbekannt, ob speziesspezifische und/oder organspezifische Expressions-Muster vorliegen. Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeitsgruppen von Hill (1996) und Hirsch-Ernst (2001) deuten darauf hin, daß die *mdr1b*-Expression innerhalb der Spezies (Ratte) für H₂O₂ zwischen Leber und Lunge Parallelitäten aufweist.

Die Abbildung 47a faßt noch einmal mögliche Regulationswege die aus Untersuchungen an Hepatozytenkulturen bekannt sind zusammen. Abbildung 47b zeigt mögliche Wechselwirkungen im Lungensystem.

Unbestritten ist, daß exogene radikalische Intermediate als auch endogen gebildete ROS an der Regulation der P-gp-Expression beteiligt sind. Wechselwirkungen mit der Expression Antioxidativer Enzyme (AOE; z. B. Katalase, Superoxid-Dismutasen) sind zu vermuten.

4.3. Einfluß der Kulturbedingungen auf die Expression von LRP, MRP und P-gp in Lungentumorlinien

Biophysikalische Wechselwirkungen wie Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Rekonstruktion, Differenzierung und Pathophysiologie von Geweben (Ruoslathi und Öbrink, 1996). Die Genexpression unterliegt dabei einer differenziellen Regulation durch ein komplexes Netzwerk an Faktoren. Dazu zählen Bestandteile der extrazellulären Matrix, Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Nährstoffe, Sauerstoff aber auch Fremdstoffe.

Um den Einfluss der Zelldichte und somit von Zell-Zell-Interaktionen auf die Expression der Transporter zu untersuchen, wurden die Zelllinien H358 und A549 in unterschiedlicher Dichte kultiviert. Die LRP und Pgp mRNA Expression war in beiden Zelllinien von der Zelldichte unbeeinflusst (Abbildung 17; 3.6.). Für LRP liegen bis dato keine Erkenntnisse über den Einfluss von Zell-Zell-Interaktionen auf die Expression vor. Im Falle des P-gp ist bekannt, dass sowohl mit niedriger als auch mit hoher Zelldichte kultivierte Zellen eine verlängerte Proteinhalbwertszeit und einen erhöhten Gehalt an funktionell aktivem Protein im Vergleich zu mit „normaler“ Dichte kultivierten Zellen aufweisen (Le Bot et al., 1994; Muller et al., 1995). Demgegenüber bleibt der mRNA-Gehalt weitgehend unverändert (Lee et al., 1993; Hill et al., 1996). Was auf eine translationale oder posttranslationale Regulation der von der Zelldichte abhängigen Expression hinweist. Zhang und Ling (2000)

vermuten einen Zusammenhang zwischen erhöhter P-gp-Stabilität und Zellzyklus abhängigen Prozessen in der G1/G0-Phase. Ob diese erhöhte Stabilität durch Inhibierung von normalen Degradationsprozessen, durch einen vermehrten Schutz oder bessere Stabilisierung hervorgerufen wird, ist aber weiterhin nicht klar.

Im Falle der MRP mRNA waren Unterschiede zwischen beiden Zelllinien zu erkennen. So blieb in H358 Zellen die Intensität der Banden unverändert, in den A549-Zellen konnte ein Anstieg des Signals mit zunehmender Dichte der kultivierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 17, 3.6.). Die untersuchten Zelllinien stammen vom selben Zelltyp (AII-Zellen) ab und unterscheiden sich unter anderem durch ihren p53 Status (A549 – Wild-typ, H358 – p53 negativ). Der Einfluss von p53 auf die Expression von MRP ist aber nicht eindeutig geklärt. So fanden Wang und Beck (1998) eine Suppression der MRP1-Promoteraktivität durch Wild-typ p53. Sullivan et al. (2000) bestätigten diese Ergebnisse. Eine p53 Mutation führte in Kolonkarzinomzellen zu einer verstärkten MRP Expression. Demgegenüber konnten Lin-Lee et al. (2001) keine eindeutigen Korrelationen zwischen p53 Mutationen und verstärkter Induktion der MRP-Expression in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien feststellen. Sie vermuten, dass die Art der p53-Mutation oder weitere Faktoren die Beeinflussbarkeit der MRP-Expression bestimmen.

Zell-spezifische Funktionen gehen in Kulturen auf rigiden Oberflächen mit fortlaufender Generationszeit verloren. So dedifferenzieren AII-Zellen in Primärkulturen trotz Kollagenbeschichtung zu AI-Zellen (ähnlich wie bei der Rekonstruktion des Lungenepithels), was mit Veränderungen morphologischer und biochemischer Parameter einhergeht. Sie zeigen z.B. eine für AI-Epithelzellen typische abgeflachte Form und verlieren unter anderem die Fähigkeit Surfactant zu produzieren.

Mit speziellen Techniken lassen sich aber für Lungenepithelzellen *in vivo*-nahe Kulturbedingungen realisieren. So ist es möglich, Zellen auf porösen kollagenbeschichteten Filterinserts zu kultivieren. Die Zellen werden durch das Filtermaterial (basal) hindurch mit Medium versorgt, die Oberseite (apikal) der Kultur wird der Umgebungsluft (Brutschrank) ausgesetzt oder kann gezielt mit Gasen inkubiert werden (siehe Abbildung 8, Kapitel 2.2.8.). Die so erhaltenen Kulturen zeigten Erhalt und sogar Wiedererlangung AII-Zell-typischer Parameter. Es kommt unter diesen Bedingungen zu einer Umkehr der Dedifferenzierungsvorgänge, zur Wiedererlangung der Surfactant-Produktion. Diese Methode bietet auch die Möglichkeit Transportprozesse an einer Luft-Flüssigkeits-Grenze (ähnlich dem alveolären Epithel) zu untersuchen (Mathias et al., 1995;

Kohsa et al., 1996; Dobbs et al., 1997). Der höhere materielle und technische Aufwand sowie die Limitierung der Versuchstierzahl (Zellpräparationen) ließen eine Kultivierung der AII-Zellen unter diesen Bedingungen nicht zu. Auch die humanen Lungenzellen (NHBEZ und PLZ) konnten mit dieser Methode (Kultur auf Filterinserts) nicht kultiviert werden. Untersuchungen zur Modulation der Expression durch die extrazellulären Matrix konnten auch bei den Lungentumorlinien nur stichprobenartig eingesetzt werden.

Die Tumorzellen wurden abweichend von der Standardmethode (Plastikkulturschalen) auf mit Kollagen beschichteten Schalen (Standard für AII-Zell-Kultur) kultiviert (Abbildung 18, 3.6.). Eine solche Beschichtung ist für die Kultivierung vieler Primärzellen essenziell, da diese auf unbeschichteten Oberflächen im Unterschied zu permanenten Zelllinien nicht adhären.

Wie schon beim Einfluß der Zelldichte auf die MRP mRNA-Expression war für die Expression der Plasmamembranproteine zwischen den Zellen des gleichen Ursprung (H358 und A549), ein unterschiedliches Verhalten zu beobachten. H358 Zellen exprimierten unter diesen Bedingungen mehr detektierbares MRP als mit der Standardmethode. In A549 Zellen kam es unter den „günstigeren“ Bedingungen zu einem drastischen Abfall des detektierbaren Signals. Auch H322-Zellen reagierten mit einer verminderten MRP-Expression.

Ob der unterschiedliche p53-Status Einfluss auf die MRP-Expression (in H358 und A549) hat, bleibt weiterhin spekulativ. Als weiterer Unterschied fiel auf, dass in den A549-Zellen eine zweite Bande mit einem geringeren Molekulargewicht zu sehen war, was auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen wie Glykosilierungen oder Phosphatierungen hinweist. In den H322-Zellen war MRP mit einem höheren Molekulargewicht als in den Zellen mit AII-Zell-Ursprung (H358, A549) zu detektieren und daher können zellspezifische Faktoren die MRP-Regulation mitbestimmen.

Veränderte biophysikalischen Eigenschaften der Matrix (Kultur der Zellen auf Kollagengelen; Abbildung 19, 3.6.) erbrachten für MRP in H322 und H358 ähnliche Ergebnisse wie in auf rigidem Kollagen kultivierten Zellen. H322 zeigten eine verminderte, H358 eine verstärkte MRP-Expression (mRNA). Für A549 Zellen war im Gegensatz zum deutlichen Abfall des MRP-Protein-Signals auf rigidem Kollagen, auf die mRNA-Expression der auf Kollagengel kultivierten Zellen keine Veränderung zu verzeichnen. Das läßt vermuten, dass posttranslationale und / oder proteinstabilisierende Prozesse in A549 Zellen die MRP-Expression beeinflussen.

Für die LRP mRNA konnte in allen drei Zelllinien kein Unterschied zwischen Kultur auf Plastik und auf Kollagengelen (Abbildung 19, 3.6.) festgestellt werden.

MDR1 mRNA wurde in H322- und A549-Zellen auf Kollagengelen im Vergleich zur Kultur auf Plastik herunterreguliert. H358 zeigten einen leichten Anstieg der MDR1 mRNA (Abbildung 19, 3.6.). Verschiedene Reaktionen der P-gp-Expression unterschiedlicher Zelltypen auf Matrixbedingungen sind auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden worden. Tatsuta et al. (1994) beobachteten eine verstärkte P-gp mRNA-Expression von Kapillarendothelzellen des Gehirns als Reaktion auf veränderte Kulturmatrices. Demgegenüber zeigten Endothelzellen der Aorta und Karzinomzellen keine Veränderung auf die gleiche Behandlung. Die unterschiedliche Expression wurde von dieser Arbeitsgruppe auf einen Hirn-Matrix-spezifischen Faktor zurückgeführt. Zellspezifische Elemente erklären auch die differenzierenden Reaktionen von H322-Zellen und den zwei AII-Zell-abgeleiteten Linien. Unterschiede zwischen H358- und A549-Zellen können unter anderem in Veränderungen durch die Tumorgenese begründet sein. Beide Zelllinien stammen zwar von AII-Zellen ab, sind aber rein morphologisch schon voneinander zu unterscheiden.

Die aufwendigste aber auch in vivo-nächste Methode (Kultur auf beschichteten Filterinserts mit der Möglichkeit einer apikalen Luftexposition) zeigte in A549-Zellen im Vergleich zur Kultivierung auf Plastikoberflächen die größten Unterschiede. Auffallend ist ein drastisch erhöhtes β -Aktin mRNA-Signal der Insertkultur (Abbildung 20, 3.6.). Demgegenüber zeigten die Transporter mRNA-Daten keine (MRP) oder eine schwächere Reaktion (LRP). Bei Relativierung der LRP und MRP mRNA-Werte zum „housekeeping- β -Aktin“ ist eine deutlich verminderte Expression zu verzeichnen. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Rannels und Rannels (1989) und Cott et al. (1987), die durch Wahl einer geeigneten Kulturmatrix AII-Zell-Kultur-typische Veränderungen abschwächen konnten. Dazu zählen Zellform und Morphologie, sekretorische Aktivitäten, Phospholipidsynthese, typische Genexpressionsmuster und Protein turnover. Auch die Veränderungen der Expression der Transportproteine wurde gefunden. So beobachteten Schuetz und Schuetz (1993) in Rattenhepatozyten eine verminderte intrinsische P-gp mRNA Expression durch Kultivierung mit einer Matrigelmatrix. Lee et al. (1993) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie stellten eine Korrelation der Expression von P-gp und zytoskelettalen mRNA-Spezies (Aktin, Tubulin) fest.

Die *in vitro*-Daten des Einflusses der Zell-Adhäsion und Zellgestalt auf die Regulation von LRP, MRP1 und P-gp in Lungenzellen besitzen sowohl Relevanz für die Entwicklung und Physiologie als auch für die Pathophysiologie dieses Organs. Kommt es im Verlauf der Lungenregeneration zu Veränderungen der extrazellulären Matrix (Dunsmore und Rannels, 1995; Rannels, 1987; Simon, 1993; Pardo, 1997), hat dies höchstwahrscheinlich auch Einfluß auf die Differenzierung und das Expressionsmuster vieler Lungenzellpopulationen (Kleinmann et al., 1986 und 1987). Die extrazelluläre Matrix bildet dabei mit Zelladhäsionsmolekülen, membranständigen Rezeptoren und Komponenten des Zytoskeletts ein komplexes Kommunikationsnetzwerk. Dieses dient der Signaltransduktion zwischen Zellumgebung, Zytoplasma und Kernregion (Kirkeeide et al., 1993; Ruoslathi und Öbrink, 1996).

4.4. NHBEZ und PLZ

Normale humane Bronchialepithelzell-Kulturen (NHBEZ) können aus Biopsiematerial histologisch normaler Gewebe angelegt werden (Franklin et al., 1996). Devereux et al. zeigten 1986, dass Kulturen tumorfreier Resektatproben von Tumorpatienten vergleichbare Enzymaktivitäten (z.B. CYP450-Monooxygenasen) wie Kulturen von Proben aus gesunden Spendern aufwiesen. Die Wahl geeigneter Kulturbedingungen ermöglicht es außerdem, die Initiation von Ziliogenese und Zilienwachstum für bis zu vier Wochen in NHBEZ-Kulturen zu beobachten (de Jong et al., 1994). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten für die verwendeten Kulturen einen differenzierten Phenotyp, der sich durch Mikrovilli, Desmosomen und „tight junctions“ auszeichnete (Runge et al., 2001). Lichtmikroskopische Betrachtungen ließen eine typische epitheliale Pflasterstruktur (Abbildung 11 a, Kapitel 3.1.3.) erkennen. Durch den Nachweis von Markern epithelialer Filamente des Zytoskeletts respiratorischer Zellen (Zytokeratine 7, 8, 18, 19; Moll, 1993) und dem Ausschluss etwaiger „Verunreinigungen“ (Monozyten, Makrophagen, Muskelzellen, Fibroblasten und mesodermale Zellen; Abbildung 11 a, 3.1.3.) konnte ein >95 %iger epithelialer Charakter der erhaltenen Kulturen angenommen werden. Die Zusammensetzung der erhaltenen Kulturen aus den verschiedenen Zellen des Bronchialepithels (histologisch sind 8 zu unterscheiden; George et al., 1993; Plopper, 1993) konnte nicht differenziert werden.

Periphere Lungenzellen (PLZ) waren nur als Mischpopulationen zu kultivieren, bestanden aber hauptsächlich (70 - 80 %) aus Epithelzellen, Kokultivierungen nichtepithelialer Zellen

konnten nicht vermieden werden (Abbildung 11 b, 3.1.3.). Auch hier war es nicht möglich die einzelnen epithelialen Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden.

Für Lungenzell-Primärkulturen liegen nur begrenzt Daten über die Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen und Induktionen vor. Ursachen dafür liegen in der hohen Anzahl der Zellpopulationen (> 40 sind beschrieben) und einer komplexen Gewebsstruktur mit einer starken Kompartimentierung und Polarisierung und daraus resultierenden Schwierigkeiten der Isolierung und Kultur der Zellen.

Mit den Kulturen der normalen humanen Bronchialepithelzellen und peripheren Lungenzellen konnten gute Modelle für respiratorische Epithelien entwickelt und untersucht werden. Beide Kulturmodelle sind als Mischpopulationen (NHBEZ – Epithelzelmischkultur; PLZ - Epithelzell- / Nicht-Epithelzelmischkultur) zu betrachten sind. Das hat den Vorteil, daß Zell-Zell-Interaktionen erhalten geblieben sind. Jedoch konnte eine Feineinteilung der einzelnen Kulturen (z. B. zentraler oder peripherer Bereich des Bronchus oder des Lungenparenchyms) nicht erfolgen.

Der Fokus auf Untersuchungen einzelner Zellpopulationen der Lunge bleibt Bestandteil weiterer Untersuchungen.

4.5. Expression von LRP in humanen Lungenzellen

Transportprozesse bestimmen die Bioverfügbarkeit und Verteilung vieler endogener und exogener Verbindungen und beeinflussen die Abwehrmechanismen von Zellen und Geweben. Über die Struktur, Funktion und pharmakologische Rolle der hier untersuchten Transporter liegen zum Teil umfangreiche Arbeiten vor. Ungeachtet dessen stehen aber nur wenige Daten über die Variabilität der entsprechenden Gene und damit verbundener phenotypischer Konsequenzen zur Verfügung.

LRP (mRNA und Protein) war in den Zellen des Bronchus und der peripheren Lunge mit einer relativ geringen interindividuellen Variabilität zu detektieren. Abschnittsspezifische Unterschiede waren nicht zu verzeichnen (Abbildung 21 b, 3..7.1.). Sowohl NHBEZ- als auch PLZ-Kulturen der einzelnen Patienten differierten maximal um den Faktor 2,5 (Abbildungen 21 und 22, 3.7.1.). Auch Vergleiche zwischen Kulturen höherer Generationen kamen zum gleichen Ergebnis (Abbildung 23 a, 3.7.1.). Untersuchungen der LRP- und LRP mRNA-Expression verschiedener Generationen und Passagen ergaben, daß keine signifikanten Veränderungen innerhalb der ersten Kulturwochen zu verzeichnen waren (Abbildungen 29, 3.8.1. und 29-A, Anhang). Im Verlauf der Kultur kommt es aber allmählich zu einer veränderten Expression. Dabei fällt das Proteinsignal allmählich ab,

demgegenüber die mRNA in hohen Passagen verstärkt zu detektieren ist (Abbildung 23 b, 3.7.1; Abbildung 30, 3.8.1.).

Der relativ geringe Wert der Variabilität der LRP-Expression (im Vergleich zu MRP und P-gp) weist darauf hin, daß dieser Transporter in der Lunge ubiquitär exprimiert wird. Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls klare LRP-Signale in Bronchialepithelzellen detektieren (Scheper et al., 1993; Sugawara et al., 1997; Schroeijers et al., 2001). Aber auch andere Organe weisen hohe LRP-Expressionen auf. Dort haben vor allem Epithelien und Gewebe mit chronischer Exposition mit Xenobiotika oder potenziell toxischen Verbindungen (Darm, Niere) eine hohe Expression (Scheper et al., 1993; Sugawara et al., 1997; Taipalensuu et al., 2001). Die genaue Funktion des LRP an diesen exponierten Bereichen ist aber weiterhin noch nicht hinreichend geklärt.

Paraquat führte in normalen humanen Bronchialepithelzellen zu einer leicht verminderten LRP-Expression (Abbildung 34 a, 3.9.1). Entsprechende mRNA-Daten zeigten keine eindeutige Reaktion der NHBEZ. Ein Teil der Kulturen reagierte mit einer verminderten mRNA-Expression (Abbildung 34 b I), in andere Kulturen kam es zu einem Anstieg des Signals. In den Zellkulturen der Patienten 57 und 62 waren sowohl Protein, als auch mRNA erniedrigt. Bei Patientenprobe 67 war in den behandelten Zellen nach 24 h weniger Protein aber mehr mRNA zu detektieren. Zellen der peripheren Lunge reagierten einheitlich auf eine Paraquatinkubation. Hier konnte nach Behandlung mit PQ ein Anstieg der Proteinexpression aber keine Veränderung des mRNA Gehalts festgestellt werden (Abbildung 35, 3.9.1). LRP scheint demnach in den Zellen der peripheren Lunge nach Paraquatinkubation durch translationale Prozesse oder Veränderungen der Proteinstabilität reguliert zu werden. Die unterschiedliche Reaktion der NHBEZ- und PLZ-Kulturen kann verschiedene Gründe haben. So ist es möglich, daß eine Lungenabschnitts-spezifische Expression von LRP vorliegt. Literaturdaten liegen hierzu nicht vor. Andererseits ist es möglich, daß spezifische Aufnahmesysteme in den peripheren Lungenzellen für eine „bessere“ PQ-Verfügbarkeit verantwortlich sind (siehe 1.7.1.). Ist Paraquat in die Zelle aufgenommen worden, kommt es zu einem zyklischen generieren radikalischer Verbindungen (Mechanismus siehe 1.7.1.), die die LRP-Expression oder die Stabilität des Proteins beeinflussen können.

Nach H₂O₂-Inkubation konnte keine einheitliche Reaktion der Kulturen registriert werden (3.9.2.). So gab es NHBEZ-Kulturen ohne Veränderungen und solche mit einer erhöhten Expression (Protein und mRNA). In PLZ-Kulturen, wurde trotz erhöhter oder

unveränderter mRNA, ein verminderter LRP-Proteingehalt festgestellt (Abbildung 37, 3.9.2), was auf translationale oder Stabilitäts-beeinflussende Prozesse hinweist. Da für H_2O_2 keine spezifischen Aufnahmemechanismen bekannt sind, scheint die unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung der Epithelkulturen für die Diversität der Reaktion verantwortlich zu sein.

Das „lung resistance related protein“ konnte in Primärkulturen der humanen Lunge mit stabiler Expression detektiert werden. LRP reagierte in NHBEZ und PLZ sensibel auf Mediatoren von radikalischen Verbindungen. Die Regulation scheint dabei auf translationaler Ebene oder durch Prozesse, die die Proteinstabilität oder -lebensdauer beeinflussen, bestimmt zu sein. Eine abschnittsspezifische Reaktion nach Inkubation mit Paraquat konnte festgestellt werden.

4.6. Expression von MRP in humanen Lungenzellen

MRP und MRP mRNA konnte in allen untersuchten NHBEZ- und PLZ-Kulturen detektiert werden. Es gab jedoch zwischen Zellkulturen von verschiedenen Patienten Unterschiede bezüglich der Expressionsstärke (Abbildungen 24 und 25, 3.7.2.). NHBEZ- und PLZ-Kulturen der einzelnen Patienten differierten um den Faktor 4, die maximalen Unterschiede betragen Faktor 6. Beim direkten Vergleich von NHBEZ- und PLZ-Kulturen schienen die peripheren Lungenzellen eine höhere MRP-Expression aufzuweisen (Abbildung 24 b, 3.7.2.). Zusammenhänge zwischen mRNA und Proteinexpression die Rückschlüsse auf Regulationsmechanismen zulassen, waren nicht zu finden (Abbildung 25, 3.7.2.). Auch in Kulturen höherer Generationen waren inter-individuelle Unterschiede der Expressionshöhe zu detektieren (Abbildung 26 a, 3.7.2.). Von Vertretern der Cytochrom-P450-Familie und vom P-glykoprotein sind inter-individuelle Expressionsvariationen bekannt, Ursachen dafür sind unter anderem genetische Polymorphismen. Für das hier untersuchte MRP1 liegen dafür keine Publikationen vor. Jedoch haben Struk et al. (2000) Sequenzvariationen des MRP6-Gens mit Pseudoxanthoma elasticum, einer Erkrankung des elastischen Bindegewebes mit kardiovaskulären Auswirkungen, in Zusammenhang gebracht. Mutationen des MRP1-Gen, das im selben Genabschnitt codiert, konnten jedoch als krankheitsursächlich ausgeschlossen werden (Germain et al., 2000). Die Differenzen können aber auch durch eine unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung und damit differierender MRP-Expressionen begründet sein. Die Charakterisierung der Kulturen erfolgte ausschließlich anhand epithelialer Parameter

(3.1.3.), die Beschreibung einzelner Epithelzellpopulationen war nicht Gegenstand der Untersuchungen.

Während der ersten Kulturgenerationen von NHBEZ und PLZ kam es zu einer verstärkten MRP-Expression (Abbildungen 31 a, 3.8.2. und 31-A a, Anhang). Im Gegensatz dazu fiel die mRNA-Expression kontinuierlich ab (Abbildungen 31 b, 3.8.2. und 31-A b, Anhang), was auf Veränderungen der Proteinlebensdauer oder Regulation der Translation hinweist. Trotz umfangreicher Informationen über Struktur und Funktion von MRP, sind Daten über Gewebs- und Zell-spezifische Expressionsmuster nicht verfügbar. Bei Verwendung einer anderen Kulturmethode (Trypsinierung und Passage) konnte im Gegensatz zur Auswachskultur (Generationen) eine stabile Proteinexpression gefunden werden. Im Gegensatz dazu war aber in NHBEZ-Passagen eine verstärkte MRP mRNA-Expression zu verzeichnen (Abbildung 32, 3.8.2.). Die Ursachen dafür bedürfen weiterer Untersuchungen.

Paraquat führte in normalen humanen Bronchialepithelzellkulturen zu einer erhöhten MRP-Expression (Abbildung 38 a, 3.9.3.). Trotz statistischer Absicherung war aber zu beobachten, daß ein Teil der Kulturen ohne Veränderung der Expression blieb. Die entsprechenden Regulation scheint auf transkriptioneller Ebene zu verlaufen, da Protein- und mRNA-Werte miteinander korrelierten (Abbildung 38-A, Anhang), die statistische Auswertung der mRNA-Daten zeigten ebenfalls einen tendenziellen Anstieg (Abbildung 38 b, 3.9.3.).

Nach Inkubation von PLZ-Kulturen mit Paraquat konnten keine statistischen Aussagen über die MRP-Expression getroffen werden. Wie bei den NHBEZ reagierten einige Kulturen mit einer erhöhten Proteinexpression, in anderen blieb diese unverändert (Abbildungen 39 a, 3.9.3. und 39-A a, Anhang). Die mRNA-Werte stiegen in drei von vier untersuchten Kulturen an (Abbildungen 39 b, 3.9.3. und 39-A b, Anhang). Die ursächlichen Regulationsprinzipien sind aber weiterhin vakant, da keine eindeutige Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Expression hergestellt werden konnten.

So ist eine transkriptionelle Kontrolle nicht ausgeschlossen, die tendenziellen Verläufe (Abbildung 39, 3.9.3.) zeigen einen schnellen Anstieg der mRNA, gefolgt vom Anstieg Protein-Werte.

Bei Beurteilung der Paraquat-Daten muß zusätzlich zur direkten MRP-Regulation berücksichtigt werden, daß nicht in allen Zellen die gleichen Paraquatkonzentrationen vorliegen müssen. Aufgrund der gezielten Aufnahme von Paraquat in AI-, AII- und Clara-

Zellen (1.7.1.) können in Kulturen die reich an diesen Zellen waren mehr Radikale generiert worden sein als in Kulturen mit einem geringeren Anteil dieser Zellen.

Nach Inkubation mit H_2O_2 wurde in NHBEZ-Kulturen trotz erhöhter oder unveränderter mRNA-Expression, ein verminderter MRP-Proteingehalt festgestellt (Abbildungen 40, 3.9.4. und 40-A, Anhang), was auf translationale oder Stabilitäts-beeinflussende Prozesse der MRP-Expression hinweist. Im Gegensatz dazu wurde MRP in Zellen der peripheren Lunge nach H_2O_2 -Inkubation verstärkt exprimiert (Abbildung 41 a, 3.9.4.).

Diese Erhöhung kann mit Untersuchungen von Ray et al. (2002) in Einklang gebracht werden. Sie fanden eine schnelle Erhöhung der γ -Glutamylcystein-Synthetase mRNA-Expression, der Enzymaktivität und einen erhöhten GSH-Spiegel in Bronchialepithel-Zelllinien nach Generierung von oxidativem Streß. Andere Untersuchungen belegten eine simultan erhöhte Expression von MRP1 und γ -Glutamylcystein-Synthetase in Tumorzellen (Kuo et al., 1998). Wird GSH nach Generierung radikalischer Verbindungen verbraucht, kann das entstandene GSSG durch einen ATP-abhängigen Transport durch MRP aus der Zelle entfernt werden (Leier et al., 1996). MRP1 kann aber auch unkonjugierte (Co-Transport mit freiem GSH) oder durch radikalische Reaktionen entstandene Verbindungen, die an GSH, Glukuronsäure oder Sulfat konjugiert wurden aus der Zelle transportieren (Jedlitschky et al., 1994; Leier et al., 1994; Muller et al., 1994; Borst et al., 2000). MRP kann somit auf vielfältige Weise an der zellulären Abwehr gegen oxidativen Streß beteiligt sein.

Warum MRP in NHBEZ und PLZ nach H_2O_2 verschieden reguliert wird bedarf weiterer Untersuchungen, die auch auf eventuelle Lungenabschnitts-spezifische Unterschiede anderer antioxidativer Abwehrmechanismen (z. B AOE) gerichtet sein sollten.

4.7. Expression von P-gp in humanen Lungenzellen

Die Expression des P-glykoproteins konnte nur anhand von mRNA-Daten aus NHBEZ-Kulturen untersucht werden. Dabei war festzustellen, daß P-gp die größten interindividuellen Schwankungen der drei untersuchten Transportproteine aufwies. In einigen Proben konnte unter den beschriebenen Bedingungen, kein Signal detektiert werden (Abbildungen 27 und 28, 3.7.3.). Untersuchungen verschiedener Kulturgenerationen zeigten für die zweite NHBEZ-Generation einen Anstieg der P-gp mRNA Expression (Abbildung 33, 3.8.3.), diese fiel aber bei einigen Proben schwächer aus (ID 64, 66, 67; Abbildung 33-A, Anhang). Die nächsten Generationen (3. und 4.) dieser „schwachen Kulturen“ zeigten im Gegensatz zu den Kulturen mit „starker“ Expression (ID 68 und 71)

sogar eine im Vergleich zur ersten Generation niedrigere Expression (Abbildung 33-A, Anhang).

Ähnliche P-gp-Expressionsunterschiede konnten auch in anderen Organen gefunden werden. Schuetz et al. (1995) berichteten über 6fach inter-individuelle Schwankungen des hepatischen P-glykoproteins. Lown et al. (1997) publizierten Daten, die eine 10fache Variation in Darmbiopsien zeigten. Hoffmeyer et al. (2000) konnten eine bis zu 65fache P-gp-Expressions-Variabilität und auch Variationen der Pgp-Funktionalität in Darmgewebeproben finden die sie mit einer SNP-Mutation in Exon 26 des MDR1 Gens korrelierten. Die von Hoffmeyer et al. gefundenen Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen und Expression sowie funktioneller Aktivität des MDR1-Gens wurden danach auch von anderen Arbeitsgruppen publiziert (Schaeffeler et al., 2001; Sakaeda et al., 2001). Ein weiterer Grund für die Variabilität der P-gp-Expression zwischen den Kulturen kann aber auch in der schon erwähnten unterschiedlichen Zelltyp-Zusammensetzung der einzelnen Proben liegen. Es ist bekannt, daß die MDR1-Expression zwischen den einzelnen Abschnitten der Lunge unterschiedlich verteilt ist. So ließ sich P-gp im Bronchus (apikale Bereiche) nicht aber in Pneumozyten detektieren (Biedler, 1992; Cordon-Cardo, 1990). Eine Abschnitts-spezifische Expression konnte auch in anderen Organen gefunden werden. So zeigten Fricker et al. (1996) einen entsprechenden proximal-distalen Anstieg der P-gp-Expression im Gastrointestinaltrakt (Magen < Jejunum < Kolon). In wieweit die Expressionsmuster der einzelnen Lungenzelltypen die Expression des ganzen Organs oder bestimmter funktioneller Bereiche bestimmen ist hingegen nicht bekannt.

Behandlung von NHBEZ-Kulturen mit Paraquat und H₂O₂ zeigte keine statistisch signifikanten Ergebnisse (Abbildungen 42, 3.9.5. und 44, 3.9.6.). Es war aber zu beobachten, daß die P-gp-Expression in den einzelnen Kulturen tendenziell gleichsinnig auf radikalischen Streß reagierte. In den Kulturen 67, 68, 74 stieg die Expression nach Paraquat- und H₂O₂-Inkubation an, in den Kulturen 62 und 71 kam es zu einem Abfall des Signals.

Ein ähnliches Bild ergab sich auch nach Behandlung der peripheren Lungenzellen mit Paraquat und H₂O₂. Die P-gp mRNA-Expression in den Kulturen L67 und L69 sank ab (Abbildung 43, 3.9.5.). Die Kulturen L70 und L74 reagierten auf beide Stressoren mit einem Anstieg der MDR1 mRNA-Expression.

Die hier untersuchten Zellpopulationen, können abhängig von Ursprung innerhalb der Lunge, eine sehr heterogene Zelltyp-Zusammensetzung haben. Es ist demnach möglich,

daß verschiedenen Zellpopulationen in Abhängigkeit ihrer ROS-Sensibilität eine unterschiedliche Reaktion auf Paraquat oder H_2O_2 zeigen.

Wartenberg et al. (2001) zeigten, daß hohe H_2O_2 -Konzentrationen (750 μM) in humanen Karzinom-Zellen zu einer verstärkten Expression von P-gp, subletale Konzentrationen (1 μM und 200 μM) aber zu einer verminderten Expression führten. Hirsch-Ernst et al. (2000) stellten in Primärkulturen von Rattenhepatozyten eine Steigerung der *mdr1b* mRNA-Expression durch 50 μM H_2O_2 fest, also einer Konzentration die in Karzinomzellen die P-gp-Expression herunterregulierte.

Die ROS-abhängige Regulation von Genen kann je nach Konzentration und antioxidativer Kapazität der Zellen direkt über die Modulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren und / oder regulatorer Enzyme (Phosphotyrosinphosphatasen oder Proteinkinasen) oder aber indirekt über eine Schädigung der DNA erfolgen (Remacle et al., 1995). Da die Freisetzung von ROS durch extrazelluläre Stimuli mit einer Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren wie dem Aktivator-Proteinkomplex 1 (AP-1) (Remacle et al., 1995; Pinkus et al., 1996) oder dem Kernfaktor- κB (NF- κB) (Baeuerle, 1992) in Verbindung gebracht wird, könnten diese Faktoren an einer Regulation der MDR-Expression beteiligt sein. Die Promotorregion des *mdr1b*-Gens (Silvermann und Hill, 1995) weist neben AP-1 und NF- κB -responsiblen Elementen, ein potentielles „antioxidant responsive element“ (ARE) sowie eine Bindungsregion für das CCAAT / Enhancer-bindnde Protein β (C/EBP- β) auf. C/EBP- β ist in seiner Aktivität durch H_2O_2 modulierbar (Yan et al., 1995). Eine erhöhte AP-1-Aktivität in humanen Tumorzelllinien wurde von Daschner et al. (1999) als Modulator einer erhöhten MDR1-Expression identifizierten

Die Vielzahl der möglichen Wechselwirkungen bedürfen aber noch weitergehender Untersuchungen. So ist noch Klärungsbedarf, in welchem Umfang speziesspezifische und / oder organspezifische Expressions-Muster vorliegen.

Zusammenfassung

Die serumfreie Kultur von primären humanen Lungezellen aus Resektionsmaterial von Lob- oder Pneumektomien ist möglich. Die Explantkulturen konnten im Einzelfall über eine relativ lange Zeit von 6 (bis 8) Generationen sowie 10 Passagen geführt werden. Die Morphologie der Monolayer aus Bronchialepithel zeigte reine Epithelzellkulturen durch Nachweis von Zytokeratinen und Reinheitsprüfung mittels Marker für Lymphozyten, glatte Muskelzellen und Bindegewebszellen. Aus peripherem Lungengewebe werden Mischzellkulturen erzeugt, die aufgrund ihrer Morphologie Epithelzellen, Endothelzellen und Bindegewebszellen darstellen.

Bislang sind die MDR1-, MRP1- und LRP-Regulierung in Lungenzellen sowie die mögliche Modulation durch chronische inhalative Schadstoffexposition unbekannt. Die Expression der ABC-Transporter MDR1, MRP1 und LRP war in primären Lungenzellen hinsichtlich des Expressionsmusters unterschiedlich zu permanenten Lungentumorlinien. LRP konnte nahezu regelhaft in allen Primärzellkulturen gefunden werden. MDR1 und MRP1 zeigten in der Basisexpression eine deutliche inter-individuelle Varianz und Veränderungen der Expression während verschiedener Stadien der Explantkultur.

Die LRP- und MRP-Expression in primären Lungenzellen zeigte eine gute Stabilität, so dass es möglich sein sollte, dieses System zur Untersuchung von Regulierungsfaktoren zu untersuchen. Nach Ablauf von 4-6 Generationen entsprechend etwa 8-10 Wochen Gesamtkulturdauer war eine drastische Hochregulierung des MRP mRNA-Signals zu beobachten. Eine Regulierung der MRP mRNA-Expression über Suppressionsfaktoren ist denkbar.

Im Vergleich zu den Erfahrungen aus der Primärzellkultur an Rattenhepatozyten ist die Sensitivität gegenüber zytotoxischen Effekten nach Wasserstoffperoxid und /oder Paraquat als Modell-Stressoren gesteigert. Die mRNA- und Proteinexpression aller drei Transporter wird durch externe Promotoren reaktiver Sauerstoffspezies reguliert. Dabei zeigten die ABC-Transporter zum Teil Reaktionen die auf Abschnitts- und Gewebe-spezifische Regulationsmechanismen hinweisen.

Die Tabelle 5 faßt noch einmal die mit humanen Lungenzellen erhaltenen Daten zusammen.

	MDR		MRP		LRP	
	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein
NHBEZ						
• Variabilität	- bis ++	n.u.	6fach	6fach	2fach	2fach
Stabilität						
• Generationen	↑	n.u.	↓	↑	∅	∅
• Passagen	n. u.	n.u.	↑	∅	∅	∅↑
• H2O2	↑	n.u.	∅↑	↓	∅↑	∅↑
• PQ	↓↑	n.u.	↓∅↑	∅↑	↓↑	↓
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
PLZ						
• Variabilität	n. u.	n.u.	n. u.	6fach	2fach	2fach
Stabilität						
• Generationen	n. u.	n.u.	n. u.	↑	n. u.	∅
• Passagen	n. u.	n.u.	n. u.	∅	n. u.	∅
• H2O2	↑	n.u.	∅	↑	↑	↓
• PQ	↓↑	n.u.	∅↑	∅↑	∅	↑
<hr/>						
Tumorzellen						
• A549	++	+	++	+++	+++	+++
• H358	++	+	++	+++	+++	+++
• H322	++	+	++	+++	+++	+++

Stabilität

Die drei Transportproteine waren unter allen Kulturbedingungen zu detektieren. aber je “*in-vivo-näher*” die Kulturbedingungen (Kollagengel, apikale Luftexposition), umso schwächer war das Signal.

Tabelle: Zusammenfassung der MDR1-, MRP1- und LRP-Expressionsdaten von humanen Zellkulturen

- ↑ erhöhte der Expression
- ↓ verminderte Expression
- ↓↑ differentes Verhalten verschiedener Kulturen auf gleiche Behandlung
- ∅ keine Veränderung
- n.u. nicht untersucht

An permanenten Lungenzelllinien (A549, H358 und H322) wurde die Basisexpression von MDR1, MRP1 und LRP im Vergleich mit primären Lungenzellen ermittelt. Lungentumorlinien reagierten in ihren Expressionsmustern der ABC Transporter auf veränderte Kulturbedingungen wie Matrixkomponenten und Kultur auf Filterinserts. Dieser Befund unterstreicht, dass die Transporterexpression auch in permanenten Linien auf externe Faktoren reagieren, und es daher anzunehmen ist, dass die funktionelle Aktivität im Normalgewebe in vivo auf verschiedene externe Stimuli mittelfristig moduliert wird (Hoch- und Herunter-Regulierung) und eine Adaptation auf inhalative Schadstoffe stattfindet. Es ist denkbar, dass durch chronische Einwirkung komplexer Schadstoffmischung, wie z.B. durch Tabakrauch, in Verbindung mit Mediatoren entzündlicher Reaktionen unerwartete funktionelle Interaktionen zwischen verschiedenen toxischen Mechanismen begründet werden, die in einer veränderten Transporteraktivität und / oder intrazelluläre Kompartimentierung toxischer Fremdstoffe begründet werden.

Die Abbildungen des Anhangs zeigen Einzelwertbetrachtungen von ausgewerteten Daten des Ergebnisteils bei denen keine statistisch eindeutigen Aussagen getroffen werden konnten. Die Anhangsabbildungen haben die selbe Nomenklatur wie die Abbildungen des Ergebnisteils. Zur Unterscheidung wurde hinter die Abbildungsnummer ein „A“ gesetzt.

zu **3.8. Expression von LRP, MRP und P-gp in Auswachskulturen verschiedener Generationen und Passagen von NHBEZ und PLZ**

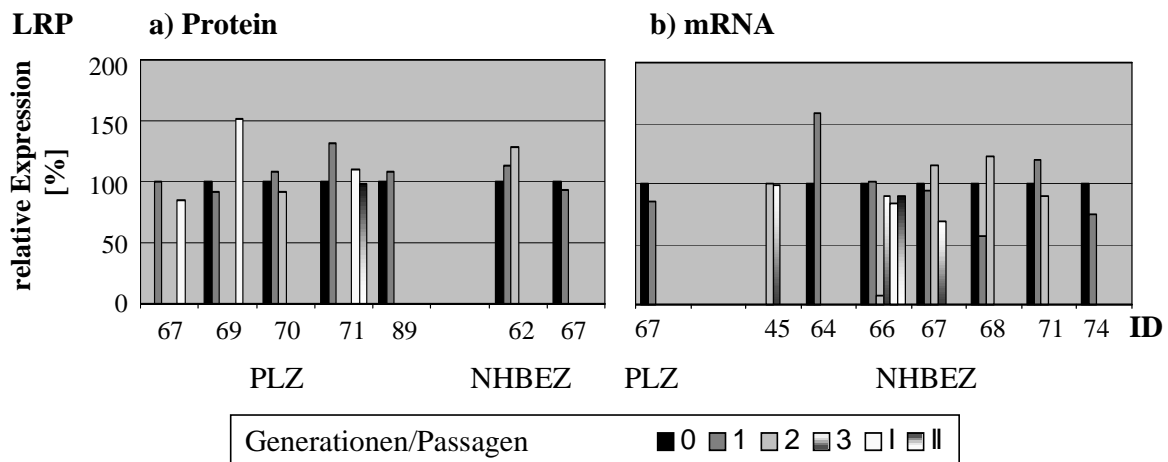


Abb. 29-A: LRP-Expression in PLZ und NHBEZ-Kulturen. Densitometrische Auswertung von Western-Blot (a) und RT-PCR Analysen (b). Die jeweils 0. Generationen wurden als Bezug genommen (100 %) und die Werte der entsprechenden Kulturen mit ihnen verglichen.

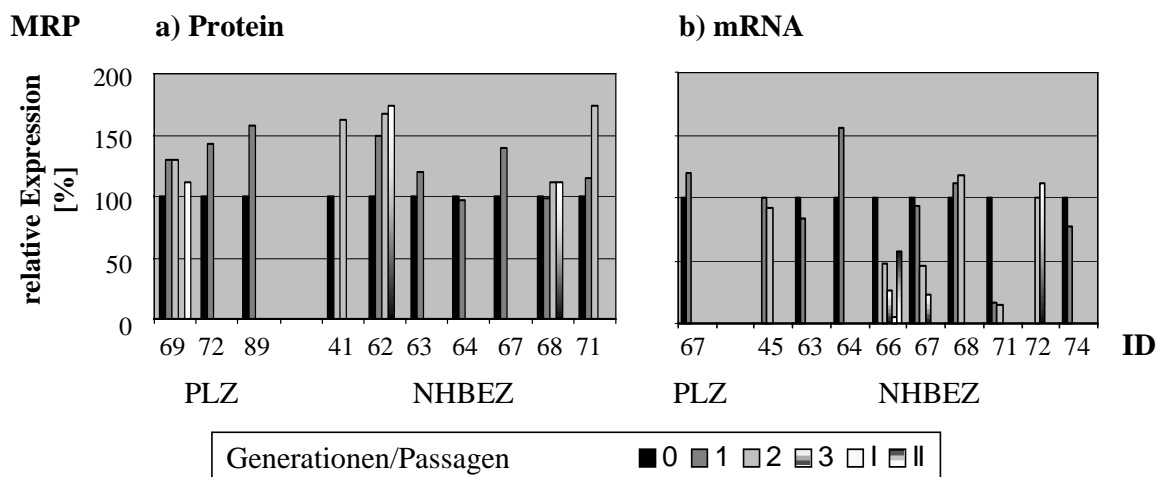


Abb. 31-A: MRP-Expression in PLZ und NHBEZ-Kulturen. Densitometrische Auswertung von Western-Blot (a) und RT-PCR Analysen (b). Die jeweils 0. Generationen wurden als Bezug genommen (100 %) und die Werte der entsprechenden Kulturen mit ihnen verglichen.

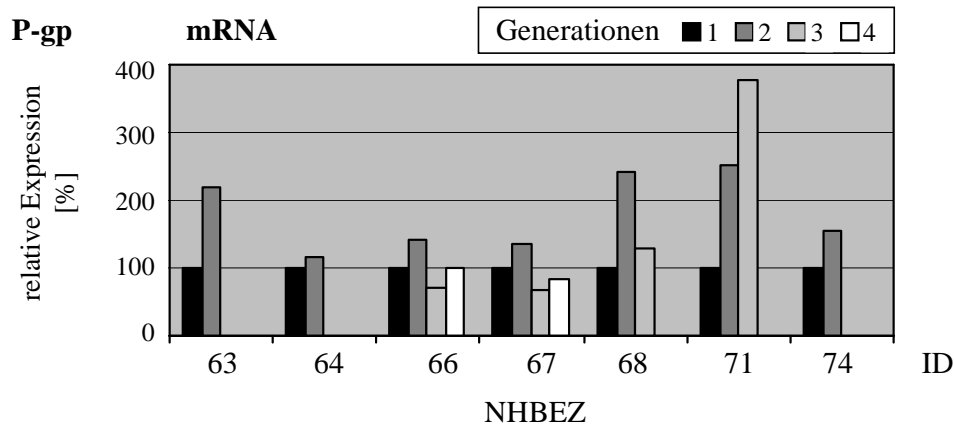


Abb. 33: P-gp mRNA-Expression in humanen NHBEZ-Kulturen. Densitometrische Auswertung von RT-PCR Analysen. Die jeweils 0. Generationen wurden als Bezug (100 %) genommen und die Werte der entsprechenden Kulturen mit ihnen verglichen.

zu 3.9.1. Einfluß von Paraquat auf die Expression von LRP in NHBEZ und PLZ

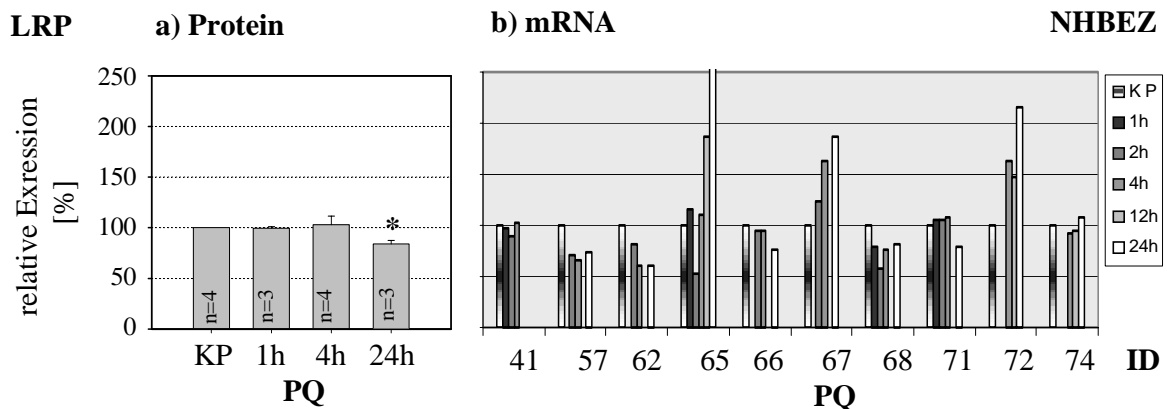


Abb. 34-A: LRP Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach Paraquatinkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit 10 μ M Paraquat im Medium. Statistische Auswertung von (a) Western-Blot Analysen (57, 62, 67, 75) und densitometrische Auswertung (b) von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen (Mittelwerte \pm SEM). Signifikanzniveau: *, $p < 0,05$

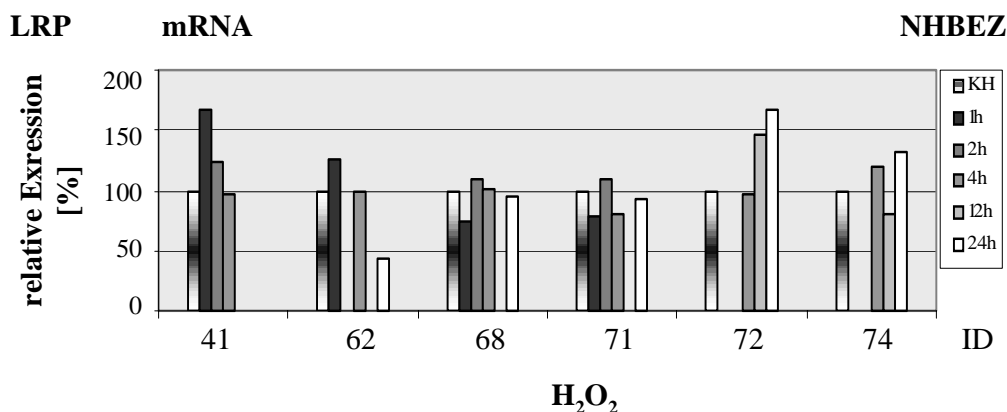
zu 3.9.2. Einfluß von H_2O_2 auf die Expression von LRP in NHBEZ und PLZ

Abb. 36-A: LRP Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach H_2O_2 -Inkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit $100 \mu M H_2O_2$ im Medium. Statistische Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen (Mittelwerte \pm SEM).

zu 3.9.3. Einfluß von Paraquat auf die Expression von MRP in NHBEZ und PLZ

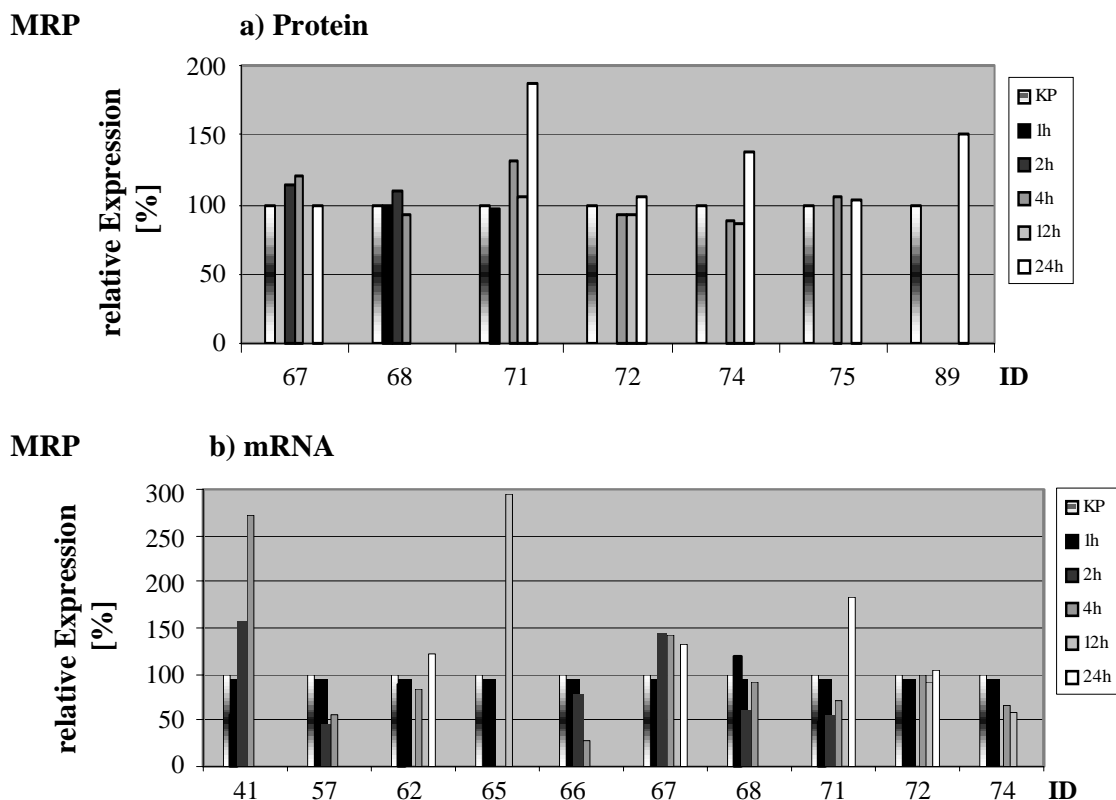


Abb. 38-A: MRP Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach Paraquatinkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit $10 \mu M$ Paraquat im Medium. Denitometrische Auswertung von (a) Western-Blot und (b) von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen

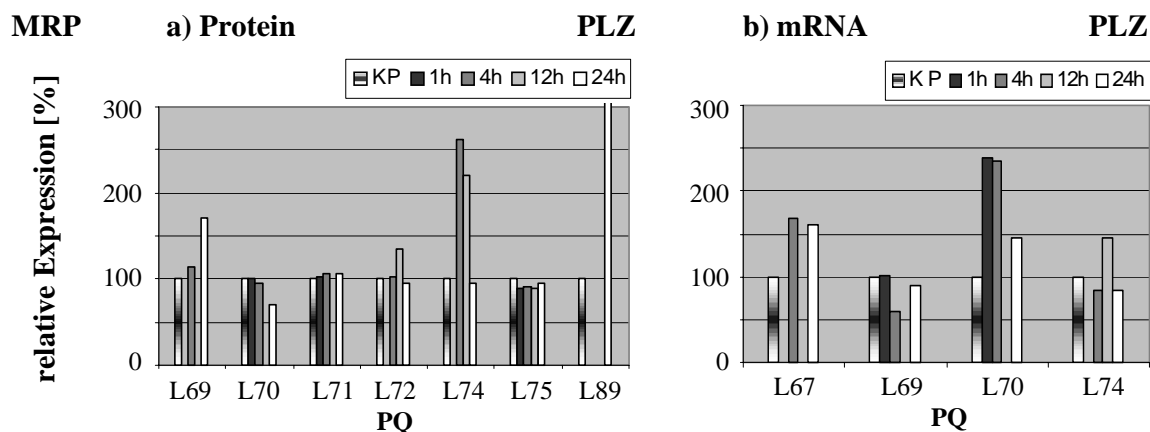


Abb. 39-A: MRP Expression in humanen PLZ-Kulturen nach Paraquatinkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen mit 10 μM Paraquat im Medium. Auswertung von (a) Western-Blot und (b) RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen.

zu 3.9.4. Einfluß von H_2O_2 auf die Expression von MRP in NHBEZ und PLZ

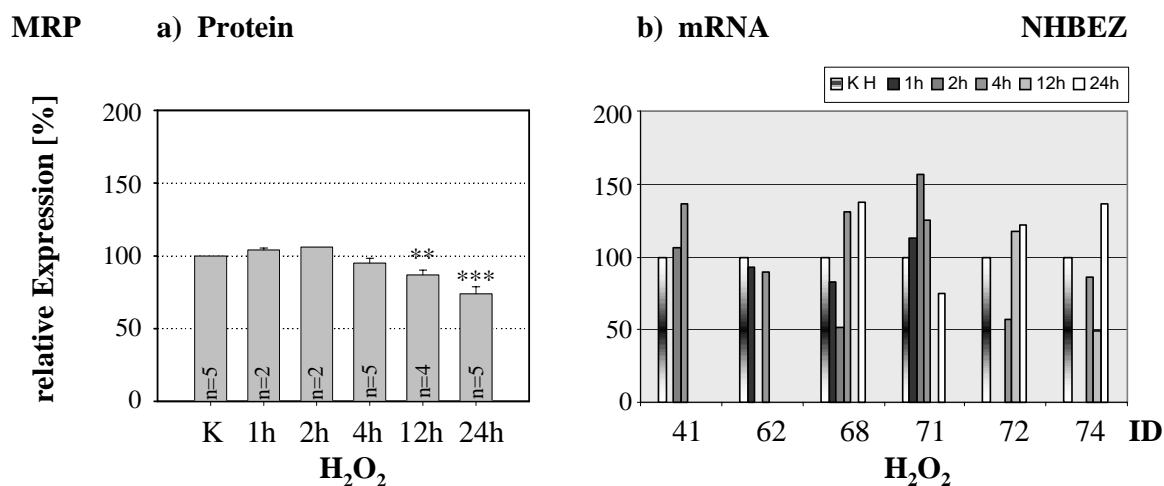


Abb. 40-A: MRP Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach H_2O_2 -Inkubation. Behandlung der NHBEZ-Kulturen mit 100 μM H_2O_2 im Medium. Statistische Auswertung (a) von Western-Blot (68, 71, 72, 74, 75) und (b) densitometrische Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen (a) Mittelwerte \pm SEM). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

zu 3.9.5. Einfluss von Paraquat auf die P-gp mRNA-Expression in NHBEZ und PLZ

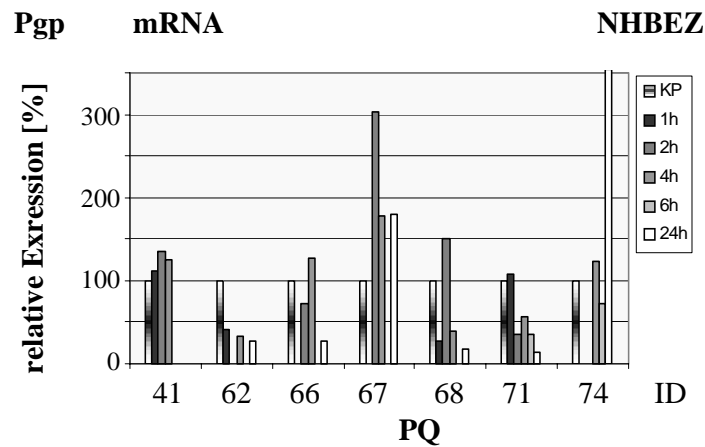


Abb. 42-A: Pgp-mRNA Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach Paraquatinkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen mit 10 μM Paraquat im Medium. Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen.

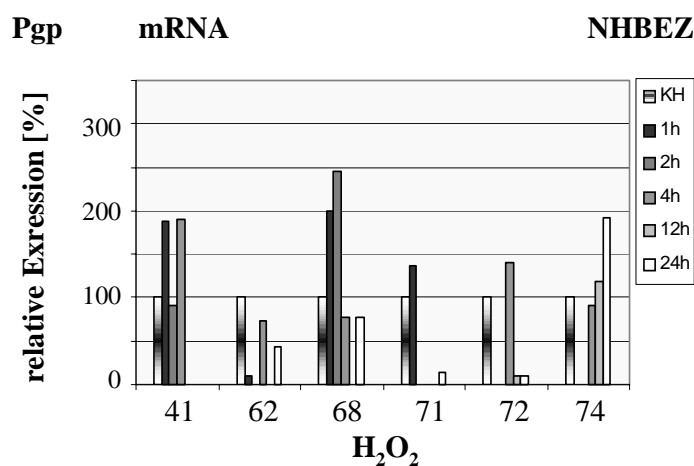
zu 3.9.6. Einfluss von H_2O_2 auf die Expression von P-gp mRNA in NHBEZ und PLZ

Abb. 44-A: Pgp-mRNA Expression in humanen NHBEZ-Kulturen nach H_2O_2 -Inkubation. Behandlung der PLZ-Kulturen mit 100 μM H_2O_2 im Medium. Auswertung von RT-PCR Analysen. Die zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen (100 %) verglichen.

- Abbondanza C**, Rossi V, Roscigno A, Gallo L, Belsito A, Piluso G, Medici N, Nigro V, Molinari AM, Monchamont B, Puca GA. Interaction of vault particles with estrogen receptor in the MCF-7 breast cancer cell. *J Cell Biol.* 1998 Jun 15;141(6):1301-10
- Adamson IY**, Bowden DH. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest.* 1974 Jan;30(1):35-42.
- Adamson IY**, Bowden DH. Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. *Lab Invest.* 1975 Jun;32(6):736-45.
- Akhlaq MS**, Schuchmann HP, von Sonntag C. The reverse of the 'repair' reaction of thiols: H abstraction at carbon by thiyl radicals. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1987 Jan;51(1):91-102
- Almquist KC**, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG. Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. *Cancer Res.* 1995 Jan 1;55(1):102-10
- Ambudkar SV**, Lelong IH, Zhang J, Cardarelli CO, Gottesman MM, Pastan I. Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15;89(18):8472-6
- Ameno K**, Fuke C, Shirakawa Y, Ogura S, Ameno S, Kiriu T, Kinoshita H, Ijiri I. Different distribution of paraquat and diquat in human poisoning cases after ingestion of a combined herbicide. *Arch Toxicol.* 1994;68(2):134-7
- Askin FB**, Kuhn C. The cellular origin of pulmonary surfactant. *Lab Invest.* 1971 Sep;25(3):260-8.
- Aubrecht J**, Hirsch-Ernst KI, Becker-Rabbenstein V, Kahl GF, Taniguchi H, Hohne MW. Induction of cytochrome P-450B1-related mouse cytochrome P-450 and regulation of its expression by epidermal growth factor/transforming growth factor alpha in primary hepatocyte culture. *Biochem Pharmacol.* 1995 Sep 7;50(6):781-5
- Azzaria M**, Schurr E, Gros P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol.* 1989 Dec;9(12):5289-97
- Baas F**, Jongsma AP, Broxterman HJ, Arceci RJ, Housman D, Scheffer GL, Riethorst A, van Groenigen M, Nieuwint AW, Joenje H. Non-P-glycoprotein mediated mechanism for multidrug resistance precedes P-glycoprotein expression during in vitro selection for doxorubicin resistance in a human lung cancer cell line. *Cancer Res.* 1990 Sep 1;50(17):5392-8
- Babior BM**. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Feb;30(2):141-55
- Bae YS**, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997 Jan 3;272(1):217-21
- Bakos E**, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Varadi A, Sarkadi B. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem.* 1998 Nov 27;273(48):32167-75
- Baron J**, Voigt JM. Localization, distribution, and induction of xenobiotic-metabolizing enzymes and aryl hydrocarbon hydroxylase activity within lung. *Pharmacol Ther.* 1990;47(3):419-45. Review.
- Baldwin RC**, Pasi A, MacGregor JT, Hine CH. The rates of radical formation from dipyridylum herbicides paraquat, diquat, and morfamquat in homogenates of rat lung, kidney, and liver: an inhibitory effect of carbon monoxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975 May;32(2):298-304
- Barrand MA**, Heppell-Parton AC, Wright KA, Rabbitts PH, Twentymen PR. A 190-kilodalton protein overexpressed in non-P-glycoprotein-containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Jan 19;86(2):110-7
- Belinsky SA**, Foley JF, White CM, Anderson MW, Maronpot RR. Dose-response relationship between O6-methylguanine formation in Clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* 1990 Jun 15;50(12):3772-80.
- Belinsky SA**, Devereux TR, White CM, Foley JF, Maronpot RR, Anderson MW. Role of Clara cells and type II cells in the development of pulmonary tumors in rats and mice following exposure to a tobacco-specific nitrosamine. *Exp Lung Res.* 1991 Mar-Apr;17(2):263-78.
- Belinsky SA**, Devereux TR, Foley JF, Maronpot RR, Anderson MW. Role of the alveolar type II cell in the development and progression of pulmonary tumors induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the A/J mouse. *Cancer Res.* 1992 Jun 1;52(11):3164-73.

- Belinsky SA, Stefanski SA, Anderson MW.** The A/J mouse lung as a model for developing new chemoprevention strategies. *Cancer Res.* 1993 Jan 15;53(2):410-6.
- Bellamy WT.** P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:161-83
- Benamira M, Johnson K, Chaudhary A, Bruner K, Tibbetts C, Marnett LJ.** Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis.* 1995 Jan;16(1):93-9.
- Biedler JL.** Genetic aspects of multidrug resistance. *Cancer.* 1992 Sep 15;70(6 Suppl):1799-809. Review.
- Bordow SB, Haber M, Madafiglio J, Cheung B, Marshall GM, Norris MD.** Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer Res.* 1994 Oct 1;54(19):5036-40.
- Borst P, Schinkel AH, Smit JJ, Wagenaar E, Van Deemter L, Smith AJ, Eijdemans EW, Baas F, Zaman GJ.** Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals. *Pharmacol Ther.* 1993 Nov;60(2):289-99. Review.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J.** The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1461(2):347-57.
- Borst P, Zelcer N, van Helvoort A.** ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jun 26;1486(1):128-44
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J.** A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 16;92(16):1295-302
- Bradley G, Georges E, Ling V.** Sex-dependent and independent expression of the P-glycoprotein isoforms in Chinese hamster. *J Cell Physiol.* 1990 Dec;145(3):398-408
- Breen AP, Murphy JA.** Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995 Jun;18(6):1033-77
- Bromme HJ, Holtz J.** Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem.* 1996 Oct-Nov;163-164:261-75
- Broxterman HJ, Kuiper CM, Schuurhuis GJ, Tsuruo T, Pinedo HM, Lankelma J.** Increase of daunorubicin and vincristine accumulation in multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by a monoclonal antibody reacting with P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 1988 Jun 15;37(12):2389-93
- Bruggemann EP, Currier SJ, Gottesman MM, Pastan I.** Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein. *J Biol Chem.* 1992 Oct 15;267(29):21020-6
- Buttke TM, Sandstrom PA.** Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. *Free Radic Res.* 1995 May;22(5):389-97. Review.
- Campbell AK.** Living light: biochemistry, applications. *Essays Biochem.* 1989;24:41-81
- Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR.** The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988 May;93(3):472-83. Review.
- Chance B, Sies H, Boveris A.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul;59(3):527-605
- Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB.** Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem.* 1990 Jan 5;265(1):506-14
- Chen N, Bowles MR, Pond SM.** Competition between paraquat and putrescine for uptake by suspensions of rat alveolar type II cells. *Biochem Pharmacol.* 1992 Sep 25;44(6):1029-36
- Chen N, Bowles MR, Pond SM.
- Childs S, Ling V.** The MDR superfamily of genes and its biological implications. *Important Adv Oncol.* 1994;:21-36
- Clark JM.** Pulmonary limits of oxygen tolerance in man. *Exp Lung Res.* 1988;14 Suppl:897-910.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG.** Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992 Dec 4;258(5088):1650-4
- Cole SP, Deeley RG.** Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays.* 1998 Nov;20(11):931-40

- Cole SP**, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* 1994 Nov 15;54(22):5902-10.
- Collins T**, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 1995 Jul;9(10):899-909
- Cordon-Cardo C**, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jan;86(2):695-8.
- Cordon-Cardo C**, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem.* 1990 Sep;38(9):1277-87.
- Crapo JD**, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis.* 1982 Aug;126(2):332-7.
- Currier SJ**, Kane SE, Willingham MC, Cardarelli CO, Pastan I, Gottesman MM. Identification of residues in the first cytoplasmic loop of P-glycoprotein involved in the function of chimeric human MDR1-MDR2 transporters. *J Biol Chem.* 1992 Dec 15;267(35):25153-9
- Dahl AR**, Bond JA, Petridou-Fischer J, Sabourin PJ, Whaley SJ. Effects of the respiratory tract on inhaled materials. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988 May; 93(3):484-92.
- Dahl AR**, Lewis JL. Respiratory tract uptake of inhalants and metabolism of xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1993; 33:383-407
- Dano K**. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Oct 25;323(3):466-83
- Daschner PJ**, Ciolino HP, Plouzek CA, Yeh GC. Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Feb;53(3):229-40
- Dean M**, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001 Jul;11(7):1156-66
- Dean M**, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 2001 Jul;42(7):1007-17
- Dean M**, Allikmets R. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Dec;5(6):779-85.
- Deneke SM**, Fanburg BL. Normobaric oxygen toxicity of the lung. *N Engl J Med.* 1980 Jul 10;303(2):76-86.
- Denning GM**, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature.* 1992 Aug 27;358(6389):761-4
- Devine SE**, Ling V, Melera PW. Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of P-glycoprotein alter multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15;89(10):4564-8
- Dobbs LG**, Williams MC, Brandt AE. Changes in biochemical characteristics and pattern of lectin binding of alveolar type II cells with time in culture. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Jul 30;846(1):155-66
- Dobbs et al.** 1986
- Dobbs LG**. Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am J Physiol.* 1990 Apr;258(4 Pt 1):L134-47. Review.
- Dobbs LG**, Pian MS, Maglio M, Dumars S, Allen L. Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *Am J Physiol.* 1997 Aug;273(2 Pt 1):L347-54.
- Domin BA**, Devereux TR, Philpot RM. The cytochrome P-450 monooxygenase system of rabbit lung enzyme components, activities, and induction in the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell, alveolar type II cell, and alveolar macrophage. *Mol Pharmacol.* 1986 Sep;30(3):296-303
- Donaldson K**, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, MacNee W. Free Radical Activity of PM10: Iron-mediated Generation of Hydroxyl Radicals. *Environ Health Perspect.* 1997 Sep;105S(Suppl 5):1285-9
- Dunsmore SE**, Rannels DE. Turnover of extracellular matrix by type II pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol.* 1995 Feb;268(2 Pt 1):L336-46.
- Ehrmann M**, Ehrle R, Hofmann E, Boos W, Schlosser A. The ABC maltose transporter. *Mol Microbiol.* 1998 Aug;29(3):685-94

- Eijdens** EW, De Haas M, Coco-Martin JM, Ottenheim CP, Zaman GJ, Dauwerse HG, Breuning MH, Twentyman PR, Borst P, Baas F. Mechanisms of MRP over-expression in four human lung-cancer cell lines and analysis of the MRP amplicon. *Int J Cancer*. 1995 Mar 3;60(5):676-84.
- Engstrom** PC, Easterling L, Baker RR, Matalon S. Mechanisms of extracellular hydrogen peroxide clearance by alveolar type II pneumocytes. *J Appl Physiol*. 1990 Dec;69(6):2078-84.
- Engstrom** PC, Easterling L, Baker RR, Matalon S. Mechanisms of extracellular hydrogen peroxide clearance by alveolar type II pneumocytes. *J Appl Physiol*. 1990 Dec;69(6):2078-84.
- Fardel et al., 1993,
- Esterbauer** H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81-128. Review.
- Evans** MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G. Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol*. 1975 Feb;22(1):142-50.
- Fardel** O, Loyer P, Morel F, Ratanasavanh D, Guillouzo A. Modulation of multidrug resistance gene expression in rat hepatocytes maintained under various culture conditions. *Biochem Pharmacol*. 1992 Dec 1;44(11):2259-62
- Fardel** O, Lecureur V, Guillouzo A. Regulation by dexamethasone of P-glycoprotein expression in cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett*. 1993 Jul 26;327(2):189-93
- Fardel** O, Lecureur V, Daval S, Corlu A, Guillouzo A. Up-regulation of P-glycoprotein expression in rat liver cells by acute doxorubicin treatment. *Eur J Biochem*. 1997 May 15;246(1):186-92.
- Fath** MJ, Kolter R. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev*. 1993 Dec;57(4):995-1017
- Foth** H. Role of the lung in accumulation and metabolism of xenobiotic compounds --implications for chemically induced toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 1995;25(2):165-205. Review.
- Foth** H, Geng WP, Krug N, Vetterlein F. Pulmonary uptake of bupivacaine in isolated perfused rat lung. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995 Jan;351(1):99-106.
- Fridovich** I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:97-112
- Fricke** G, Drewe J, Huwyler J, Gutmann H, Beglinger C. Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Br J Pharmacol*. 1996 Aug; 118(7):1841-7.
- Fubini** B, Mollo L. Role of iron in the reactivity of mineral fibers. *Toxicol Lett*. 1995 Dec;82-83:951-60
- Fubini** B, Mollo L, Giamello E. Free radical generation at the solid/liquid interface in iron containing minerals. *Free Radic Res*. 1995 Dec;23(6):593-614
- Galimberti** S, Marchetti A, Buttitta F, Carnicelli V, Pellegrini S, Bevilacqua G, Petrini M. Multidrug resistance related genes and p53 expression in human non small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 1998 Jul-Aug;18(4C):2973-6
- Gant** TW, Silverman JA, Thorgeirsson SS. Regulation of P-glycoprotein gene expression in hepatocyte cultures and liver cell lines by a trans-acting transcriptional repressor. *Nucleic Acids Res*. 1992 Jun 11;20(11):2841-6
- Gardner** HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med*. 1989;7(1):65-86. Review.
- Gartner** J, Moser H, Valle D. Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nat Genet*. 1992 Apr;1(1):16-23
- Gekeler** V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J. The leukotriene LTD₄ receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Mar 8;208(1):345-52
- Gerlach** JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*. 1986 Dec 4-10;324(6096):485-9
- Germain** DP, Perdu J, Remones V, Jeunemaitre X. Homozygosity for the R1268Q mutation in MRP6, the pseudoxanthoma elasticum gene, is not disease-causing. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Aug 2;274(2):297-301
- Goeptar** AR, Scheerens H, Vermeulen NP. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol*. 1995;25(1):25-65

- Goldstein** LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Jan 18;81(2):116-24
- Gottesman** MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385-427
- Gram** TE. Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *Pharmacol Rev.* 1997 Dec;49(4):297-341
- Greenberger** LM, Lisanti CJ, Silva JT, Horwitz SB. Domain mapping of the photoaffinity drug-binding sites in P-glycoprotein encoded by mouse *mdr1b*. *J Biol Chem.* 1991 Nov 5;266(31):20744-51
- Greenberger** LM. Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12. *J Biol Chem.* 1993 May 25;268(15):11417-25
- Gros** P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature.* 1986 Oct 23-29;323(6090):728-31
- Gutteridge** JM, Nagy I, Maitt L, Floyd RA. ADP-iron as a Fenton reactant: radical reactions detected by spin trapping, hydrogen abstraction, and aromatic hydroxylation. *Arch Biochem Biophys.* 1990 Mar;277(2):422-8
- Hait** WN, Aftab DT. Rational design and pre-clinical pharmacology of drugs for reversing multidrug resistance. *Biochem Pharmacol.* 1992 Jan 9;43(1):103-7
- Halliwell** B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 1992 Jul 27;307(1):108-12
- Halliwell** B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. Third edition Oxford University Press (2000)
- Hamill** DR, Suprenant KA. Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Dev Biol.* 1997 Oct 1;190(1):117-28
- Hassan** HM, Fridovich I. Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1978 Nov 25;253(22):8143-8
- Hayes** WJ, Laws ER. Handbook of pesticide toxicology. Academic press Inc. San Diego, New York, Boston. 1991
- Heberlein** W, Wodopia R, Bartsch P, Mairbaurl H. Possible role of ROS as mediators of hypoxia-induced ion transport inhibition of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Apr;278(4):L640-8.
- Heppleston** AG. Minerals, fibrosis, and the lung. *Environ Health Perspect.* 1991 Aug;94:149-68.
- Herrmann** C, Golkaramnay E, Inman E, Rome L, Volkmandt W. Recombinant major vault protein is targeted to neuritic tips of PC12 cells. *J Cell Biol.* 1999 Mar 22;144(6):1163-72
- Higgins** CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:67-113.
- Hill** BA, Brown PC, Preisegger KH, Silverman JA. Regulation of *mdr1b* gene expression in Fischer, Wistar and Sprague-Dawley rats in vivo and in vitro. *Carcinogenesis.* 1996 Mar;17(3):451-7
- Hipfner** DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1461(2):359-76.
- Hirose** M, Kuroda Y. p53 may mediate the *mdr-1* expression via the WT1 gene in human vincristine-resistant leukemia/lymphoma cell lines. *Cancer Lett.* 1998 Jul 17;129(2):165-71
- Hirsch-Ernst** KI, Ziemann C, Schmitz-Salue C, Foth H, Kahl GF. Modulation of P-glycoprotein and *mdr1b* mRNA expression by growth factors in primary rat hepatocyte culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Oct 4;215(1):179-85
- Hirsch-Ernst** KI, Ziemann C, Foth H, Koziar D, Schmitz-Salue C, Kahl GF. Induction of *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol.* 1998 Sep;176(3):506-15
- Hirsch-Ernst** KI, Kietzmann T, Ziemann C, Jungermann K, Kahl GF. Physiological oxygen tensions modulate expression of the *mdr1b* multidrug-resistance gene in primary rat hepatocyte cultures. *Biochem J.* 2000 Sep 1;350 Pt 2:443-51
- Hoet** PH, Dinsdale D, Lewis CP, Verbeken EK, Lauweryns JM, Nemery B. Kinetics and cellular localisation of putrescine uptake in human lung tissue. *Thorax.* 1993 Dec;48(12):1235-41

- Hoet PH**, Lewis CP, Demedts M, Nemery B. Putrescine and paraquat uptake in human lung slices and isolated type II pneumocytes. *Biochem Pharmacol.* 1994 Aug 3;48(3):517-24
- Hoffmeyer S**, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3473-8.
- Hopper E**, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD. Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.* 2001 Jan 26;162(2):181-91
- Horio M**, Gottesman MM, Pastan I. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 May;85(10):3580-4
- Hsu SI**, Lothstein L, Horwitz SB. Differential overexpression of three mdr gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique mdr genes. *J Biol Chem.* 1989 Jul 15;264(20):12053-62
- Huang CC**, Wu MC, Xu GW, Li DZ, Cheng H, Tu ZX, Jiang HQ, Gu JR. Overexpression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992 Feb 19;84(4):262-4
- Hung LW**, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature.* 1998 Dec 17;396(6712):703-7.
- Hyde SC**, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature.* 1990 Jul 26;346(6282):362-5.
- Izquierdo MA**, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P, Scheper RJ. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* 1996 Mar;148(3):877-87
- Izquierdo MA**, Scheffer GL, Flens MJ, Shoemaker RH, Rome LH, Scheper RJ. Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. *Cytotechnology* 1996;19(3):191-7
- Jantsch, B.**, 1998, Aufbau einer gekoppelten reverse transkription/polymerase Kettenreaktion für den Nachweis der Boten-Ribonukleinsäure des „Multidrug-Resistance-Gens“ mdr1. Dissertation Universität Leipzig, p. 81
- Jedlitschky G**, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 1996 Mar 1;56(5):988-94
- Juliano RL**, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976 Nov 11;455(1):152-62
- Kamijo K**, Taketani S, Yokota S, Osumi T, Hashimoto T. The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J Biol Chem.* 1990 Mar 15;265(8):4534-40
- Kedersha NL**, Miquel MC, Bittner D, Rome LH. Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J Cell Biol.* 1990 Apr;110(4):895-901.
- Kedersha NL**, Heuser JE, Chugani DC, Rome LH. Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol.* 1991 Jan;112(2):225-35. FJ. Glutathione: in defence of the lung. *Food Chem Toxicol.* 1999 Sep-Oct;37(9-10):963-6.
- Keppler D**, König J. Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J.* 1997 Jun;11(7):509-16.
- Keppler D**, König J. Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. *Semin Liver Dis.* 2000;20(3):265-72
- Kessel D**, Hall TC, Roberts D. Modes of uptake of methotrexate by normal and leukemic human leukocytes in vitro and their relation to drug response. *Cancer Res.* 1968 Mar;28(3):564-70
- Kickhoefer VA**, Searles RP, Kedersha NL, Garber ME, Johnson DL, Rome LH. Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNA that is transcribed by RNA polymerase III. *J Biol Chem.* 1993 Apr 15;268(11):7868-73
- Kickhoefer VA**, Rajavel KS, Scheffer GL, Dalton WS, Scheper RJ, Rome LH. Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J Biol Chem.* 1998 Apr 10;273(15):8971-4

- Kickhoefer VA**, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M, Rome LH. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol.* 1999 Sep 6;146(5):917-28
- Kickhoefer VA**, Stephen AG, Harrington L, Robinson MO, Rome LH. Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem.* 1999 Nov 12;274(46):32712-7
- Kickhoefer VA**, Liu Y, Kong LB, Snow BE, Stewart PL, Harrington L, Rome LH. The Telomerase/vault-associated protein TEP1 is required for vault RNA stability and its association with the vault particle. *J Cell Biol.* 2001 Jan 8;152(1):157-64
- King RJ**. The surfactant system of the lung. *Fed Proc.* 1974 Nov;33(11):2238-47. Review.
- Kirkeide EK**, Pryme IF, Vedeler A. Microfilaments and protein synthesis; effects of insulin. *Int J Biochem.* 1993 Jun;25(6):853-64. Review.
- Kitazono M**, Sumizawa T, Takebayashi Y, Chen ZS, Furukawa T, Nagayama S, Tani A, Takao S, Aikou T, Akiyama S. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Oct 6;91(19):1647-53
- Klein I**, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1461(2):237-62
- Kleinman HK**, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 1986 Jan 28;25(2):312-8.
- Kleinman HK**, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, Sephel GC. Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal Biochem.* 1987 Oct;166(1):1-13
- Kneipil J**, A short, simple method for the determination of paraquat in plasma, *Clin Chim Acta*, 1977, 79, 387-390
- Kohsa K**, Yamada H, Sugihara H. Influence of air exposure treatment on alveolar type II epithelial cells cultured on extracellular matrix. *Cell Struct Funct.* 1996 Feb;21(1):81-9.
- Kong et al., 1999
- Kong LB**, Siva AC, Rome LH, Stewart PL. Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. *Structure Fold Des.* 1999 Apr 15;7(4):371-9
- Kong LB**, Siva AC, Kickhoefer VA, Rome LH, Stewart PL. RNA location and modeling of a WD40 repeat domain within the vault. *RNA.* 2000 Jun;6(6):890-900
- Kool M**, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1997 Aug 15;57(16):3537-47
- Kool M**, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* 1999 Jan 1;59(1):175-82
- Krishnamachary N**, Center MS. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res.* 1993 Aug 15;53(16):3658-61
- Kuo MT**, Bao J, Furuichi M, Yamane Y, Gomi A, Savaraj N, Masuzawa T, Ishikawa T. Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. *Biochem Pharmacol.* 1998 Mar 1;55(5):605-15
- Laemmli UK**, Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, 227, 680-685
- Lautier D**, Canitrot Y, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol.* 1996 Oct 11;52(7):967-77
- Lee CH**, Bradley G, Ling V. Overexpression of the class II P-glycoprotein gene in primary rat hepatocyte culture: evidence for increased mRNA stability. *Cell Growth Differ.* 1995 Mar;6(3):347-54.
- Leier I**, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem.* 1994 Nov 11;269(45):27807-10

- Lelong** IH, Guzikowski AP, Haugland RP, Pastan I, Gottesman MM, Willingham MC. Fluorescent verapamil derivative for monitoring activity of the multidrug transporter. *Mol Pharmacol.* 1991 Oct;40(4):490-4
- Leslie** EM, Deeley RG, Cole SP. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology.* 2001 Oct 5;167(1):3-23
- Lin-Lee** YC, Tatebe S, Savaraj N, Ishikawa T, Tien Kuo M. Differential sensitivities of the MRP gene family and gamma- glutamylcysteine synthetase to prooxidants in human colorectal carcinoma cell lines with different p53 status. *Biochem Pharmacol* 2001 Mar 1;61(5):555-63
- Ling** V, Thompson LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol.* 1974 Feb;83(1):103-16
- Loe** DW, Deeley RG, Cole SP. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5130-6
- Loo** TW, Clarke DM. Functional consequences of phenylalanine mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem.* 1993 Sep 25;268(27):19965-72
- Loo** TW, Clarke DM. Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J Biol Chem.* 1994 Mar 11;269(10):7750-5
- Lorico** A, Rappa G, Flavell RA, Sartorelli AC. Double knockout of the MRP gene leads to increased drug sensitivity in vitro. *Cancer Res.* 1996 Dec 1;56(23):5351-5
- Lowry** OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem,* 1951, 193, 265-275
- Lown** KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, Brown MB, Guo W, Rossi SJ, Benet LZ, Watkins PB. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* 1997 Sep;62(3):248-60.
- Ma** D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1995 Apr;16(1):45-55
- Mahmutoglu** I, Scheulen ME, Kappus H. Oxygen radical formation and DNA damage due to enzymatic reduction of bleomycin-Fe(III). *Arch Toxicol.* 1987;60(1-3):150-3
- Martin** WJ. Mechanisms of drug-induced lung disease. *J Lab Clin Med.* 1993 Feb;121(2):195-6
- Martin** LD, Rochelle LG, Fischer BM, Krunkosky TM, Adler KB. Airway epithelium as an effector of inflammation: molecular regulation of secondary mediators. *Eur Respir J.* 1997 Sep;10(9):2139-46
- Mason** RJ, Williams MC. Type II alveolar cell. Defender of the alveolus. *Am Rev Respir Dis.* 1977 Jun;115(6 Pt 2):81-91.
- Mason** RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt DS, Berry LC Jr. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Oct;79(19):6033-7.
- Mason** RJ, Williams MC, Widdicombe JH. Fluid and electrolyte transport across monolayers of alveolar type II cells in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 1983 May;127(5 Pt 2):S24-8.
- Mason** RJ, Walker SR, Shields BA, Henson JE, Williams MC. Identification of rat alveolar type II epithelial cells with a tannic acid and polychrome stain. *Am Rev Respir Dis.* 1985 May;131(5):786-8.
- Mason RJ.** Identification of rat alveolar type-II epithelial cell with a tannic -acid and polychrome stain. *Am Rev. Respir. Diss.,* 1985, 786-788
- Mathias** NR, Kim KJ, Robison TW, Lee VH. Development and characterization of rabbit tracheal epithelial cell monolayer models for drug transport studies. *Pharm Res.* 1995 Oct;12(10):1499-505.
- Mauderly** JL. Respiratory function responses of animals and man to oxidant gases and to pulmonary emphysema. *J Toxicol Environ Health.* 1984;13(2-3):345-61
- Mayer** R, Kartenbeck J, Buchler M, Jedlitschky G, Leier I, Keppler D. Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol.* 1995 Oct;131(1):137-50
- McDonald** RJ, Pan LC, St George JA, Hyde DM, Ducore JM. Hydrogen peroxide induces DNA single strand breaks in respiratory epithelial cells. *Inflammation.* 1993 Dec;17(6):715-22

- McGrath T**, Center MS. Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: evidence that a surface membrane protein distinct from P-glycoprotein contributes to reduced cellular accumulation of drug. *Cancer Res.* 1988 Jul 15;48(14):3959-63.
- Minakata K**, Suzuki O, Asano M. Rapid quantitative analysis of paraquat by electron spin resonance spectroscopy. *Forensic Sci Int.* 1988 May;37(3):215-22
- Mirski SE**, Gerlach JH, Cole SP. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res.* 1987 May 15;47(10):2594-8
- Moll R**. Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors *Veröff Pathol.* 1993;142:1-197.
- Mossman BT**. In vitro approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ Health Perspect.* 1983 Nov;53:155-61. Review.
- Morrow PE**, Toxicological data on Nox: An overview. *J. Toxicol Environm. Health*, 1984, 13, 205-227
- MullerC**, Laurent G, Ling V. P-glycoprotein stability is affected by serum deprivation and high cell density in multidrug-resistant cells. *J Cell Physiol.* 1995 Jun;163(3):538-44
- Muller M**, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 20;91(26):13033-7
- Nakatsukasa H**, Silverman JA, Gant TW, Evarts RP, Thorgeirsson SS. Expression of multidrug resistance genes in rat liver during regeneration and after carbon tetrachloride intoxication. *Hepatology.* 1993 Nov;18(5):1202-7.
- Noonan KE**, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willmann CL, Griffith B, von Hoff DD, et al., Quantative analysis of mdr1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 160-164.
- Nooter K**, Bosman FT, Burger H, van Wingerden KE, Flens MJ, Scheper RJ, Oostrum RG, Boersma AW, van der Gaast A, Stoter G. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 1996 Jan;7(1):75-81.
- O'Kelly I**, Lewis A, Peers C, Kemp PJ. O(2) sensing by airway chemoreceptor-derived cells. Protein kinase c activation reveals functional evidence for involvement of NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;275(11):7684-92
- Orr GA**, Han EK, Browne PC, Nieves E, O'Connor BM, Yang CP, Horwitz SB. Identification of the major phosphorylation domain of murine mdr1b P-glycoprotein. Analysis of the protein kinase A and protein kinase C phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 1993 Nov 25;268(33):25054-62
- Oude Elferink RP**, Groen AK. The role of mdr2 P-glycoprotein in biliary lipid secretion. Cross-talk between cancer research and biliary physiology. *J Hepatol.* 1995 Nov;23(5):617-25
- Pardo A**, Ridge K, Uhal B, Sznajder JI, Selman M. Lung alveolar epithelial cells synthesize interstitial collagenase and gelatinases A and B in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jun;29(6):901-10.
- Pastan I**, Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med.* 1987 May 28;316(22):1388-93
- Paulusma CC**, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 1997 Jun;25(6):1539-42
- Phalen RF**, Yeh HC, Prasad SB: Morphology of the respiratory tract. In: *Inhalation toxicology.* 1989:129-49
- Pietarinen-Runtti P**, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 Aug;19(2):286-92
- Poli G**, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22(1-2):287-305.
- Poole K**, Krebs K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol.* 1993 Nov;175(22):7363-72
- Quinlan TR**, Marsh JP, Janssen YM, Borm PA, Mossman BT. Oxygen radicals and asbestos-mediated disease. *Environ Health Perspect.* 1994 Dec;102 Suppl 10:107-10

- Raff T., Van der Giet M, Endemann D., Wiederholt T., Paul M., Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudo-genes, *Biotechniques* 23, -456-460
- Rannels SR**, Yarnell JA, Fisher CS, Fabisiak JP, Rannels DE. Role of laminin in maintenance of type II pneumocyte morphology and function. *Am J Physiol.* 1987 Dec;253(6 Pt 1):C835-45.
- Rappa G**, Lorico A, Flavell RA, Sartorelli AC. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res.* 1997 Dec 1;57(23):5232-7
- Ray S**, Watkins DN, Misso NL, Thompson PJ. Oxidant stress induces gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in human bronchial epithelial NCI-H292 cells. *Clin Exp Allergy.* 2002 Apr;32(4):571-7
- Remacle J**, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G. Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res.* 1995 Feb;316(3):103-22
- Rhoads CP**. Classics in oncology. The sword and the ploughshare; Cornelius P. Rhoads. Excerpted from the Journal of the Mount Sinai Hospital, Volume XIII, Number 6, 1946. *CA Cancer J Clin.* 1978 Sep-Oct;28(5):306-12
- Richards RJ**, Davies N, Atkins J, Oreffo VI, Isolation, biochemical characterization, and culture of lung type-II cells of the rat., *Lung* 165, 143-158
- Richter C**. Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration. *Biosci Rep.* 1997 Feb;17(1):53-66
- Riordan JR**, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1066-73
- Röhrdanz E**, Kahl R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 1998 Jan 1;24(1):27-38.
- Rothenberg ML**, Mickley LA, Cole DE, Balis FM, Tsuruo T, Poplack DG, Fojo AT. Expression of the mdr-1/P-170 gene in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1989 Sep;74(4):1388-95
- Ruoslahti E**, Obrink B. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res.* 1996 Aug 25;227(1): 1-11
- Runge DM**, Stock TW, Lehmann T, Taeye C, Bernauer U, Stolz DB, Hofmann S, Foth H. Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. *Arch Toxicol.* 2001 Aug;75(6):335-45.
- Sachs**, Lothar (1984); *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*; 6. Auflage; Springer Verlag Berlin
- Sancar A**. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:43-81
- Sanchez L**, Leranoz S, Puig M, Loren JG, Nikaido H, Vinas M. Molecular basis of antimicrobial resistance in non-typable *Haemophilus influenzae*. *Microbiologia.* 1997 Sep;13(3):309-14
- Sanders SA**, Eisenthal R, Harrison R. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase-generation of superoxide anion. *Eur J Biochem.* 1997 May 1;245(3):541-8
- Sakaeda T**, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Hirai M, Kasuga M, Okumura K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res.* 2001 Oct;18(10):1400-4.
- Schaeffeler E**, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet.* 2001 Aug 4;358(9279):383-4.
- Scheffer GL**, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1995 Jun;1(6):578-82
- Scheper RJ**, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, van Kalken CK, Slovak ML, de Vries EG, van der Valk P, et al. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 1993 Apr 1;53(7):1475-9
- Schrader E**, Hirsch-Ernst KI, Richter E, Foth H. Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1998 Mar;357(3):336-43.

- Schrader E**, Hirsch-Ernst KI, Scholz E, Kahl GF, Foth H. Metabolism of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in primary cultures of rat alveolar type II cells. *Drug Metab Dispos.* 2000 Feb;28(2):180-5.
- Schraufstatter IU**, Hyslop PA, Hinshaw DB, Spragg RG, Sklar LA, Cochrane CG. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jul;83(13):4908-12
- Schrenk D**, Gant TW, Preisegger KH, Silverman JA, Marino PA, Thorgeirsson SS. Induction of multidrug resistance gene expression during cholestasis in rats and nonhuman primates. *Hepatology.* 1993 May;17(5):854-60
- Schrenk D**, Karger A, Lipp HP, Bock KW. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and ethinylestradiol as co-mitogens in cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis.* 1992 Mar;13(3):453-6
- Schulze J**, Schrader E, Foth H, Kahl GF. Effect of nicotine or cotinine on metabolism of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1998 Mar;357(3):344-350
- Schuetz JD**, Schuetz EG. Extracellular matrix regulation of multidrug resistance in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Cell Growth Differ.* 1993 Jan;4(1):31-40.
- Schuurhuis GJ**, Broxterman HJ, de Lange JH, Pinedo HM, van Heijningen TH, Kuiper CM, Scheffer GL, Scheper RJ, van Kalken CK, Baak JP, et al. Early multidrug resistance, defined by changes in intracellular doxorubicin distribution, independent of P-glycoprotein. *Br J Cancer.* 1991 Nov;64(5):857-61
- Sharom FJ**, Liu R, Romsicki Y, Lu P. Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1461(2):327-45
- Silverman JA**, Schrenk D. Hepatic canalicular membrane 4: expression of the multidrug resistance genes in the liver. *FASEB J.* 1997 Apr;11(5):308-13
- Silverman JA**, Thorgeirsson SS. Regulation and function of the multidrug resistance genes in liver. *Prog Liver Dis.* 1995;13:101-23
- Simon RH**, Edwards JA, Reza MM, Kunkel RG. Injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells by H₂O₂: dependence on phenotype and catalase. *Am J Physiol.* 1991 Apr;260(4 Pt 1):L318-25.
- Simon RH**, Scott MJ, Reza MM, Killen PD. Type IV collagen production by rat pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993 Jun;8(6):640-6.
- Sion A**, Samuni A, Chevion M. Mechanistic aspects of paraquat toxicity in E. coli. A spin trapping study. *Biochem Pharmacol.* 1989 Nov 15;38(22):3903-7
- Slovak ML**, Ho JP, Bhardwaj G, Kurz EU, Deeley RG, Cole SP. Localization of a novel multidrug resistance-associated gene in the HT1080/DR4 and H69AR human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1993 Jul 15;53(14):3221-5.
- Smith LL**. The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:681-92
- von Sonntag C**. New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radic Res Commun.* 1987;2(4-6):217-24
- Spencer JP**, Jenner A, Chimel K, Aruoma OI, Cross CE, Wu R, Halliwell B. DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *FEBS Lett.* 1995 Nov 20;375(3):179-82
- Stein U**, Walther W, Shoemaker RH. Modulation of mdr1 expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance. *Br J Cancer.* 1996 Nov;74(9):1384-91.
- Stein U**, Walther W, Shoemaker RH. Reversal of multidrug resistance by transduction of cytokine genes into human colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Oct 2;88(19):1383-92.
- Streb P**, Shang W, Feierabend J, Bligny R. Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. *Planta* 207. 1998: 313-324
- Struk B**, Cai L, Zach S, Ji W, Chung J, Lumsden A, Stumm M, Huber M, Schaen L, Kim CA, Goldsmith LA, Viljoen D, Figuera LE, Fuchs W, Munier F, Ramesar R, Hohl D, Richards R, Neldner KH, Lindpaintner K. Mutations of the gene encoding the transmembrane transporter protein ABC-C6 cause pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med.* 2000;78(5):282-6.

- Sullivan** GF, Yang JM, Vassil A, Yang J, Bash-Babula J, Hait WN. Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells. *J Clin Invest.* 2000 May;105(9):1261-7
- Sumizawa** T, Chuman Y, Sakamoto H, Iemura K, Almquist KC, Deeley RG, Cole SP, Akiyama S. Non-P-glycoprotein-mediated multidrug-resistant human KB cells selected in medium containing adriamycin, cepharanthine, and mezerein. *Somat Cell Mol Genet.* 1994 Sep;20(5):423-35
- Teeter** LD, Becker FF, Chisari FV, Li DJ, Kuo MT. Overexpression of the multidrug resistance gene *mdr3* in spontaneous and chemically induced mouse hepatocellular carcinomas. *Mol Cell Biol.* 1990 Nov;10(11):5728-35
- Thevenod** F, Friedmann JM, Katsen AD, Hauser IA. Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2000 Jan 21;275(3):1887-96.
- Tomita** M, Okuyama T. Effect of paraquat on the malondialdehyde level in rat liver microsomes (in vitro). *Arch Toxicol.* 1994;68(3):187-92.
- Trush** MA, Mimnaugh EG, Ginsburg E, Gram TE. In vitro stimulation by paraquat of reactive oxygen-mediated lipid peroxidation in rat lung microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1981 Sep 15;60(2):279-86
- Trush** MA, Kensler TW. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1991;10(3-4):201-9
- Ueda** K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V, Riordan JR. The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Dec 30;141(3):956-62
- van der Blik** AM, Baas F, Van der Velde-Koerts T, Biedler JL, Meyers MB, Ozols RF, Hamilton TC, Joenje H, Borst P. Genes amplified and overexpressed in human multidrug-resistant cell lines. *Cancer Res.* 1988 Nov 1;48(21):5927-32
- van der Blik** AM, Borst P. Multidrug resistance. *Adv Cancer Res.* 1989;52:165-203
- Versantvoort** CH, Rhodes T, Twentyman PR. Acceleration of MRP-associated efflux of rhodamine 123 by genistein and related compounds. *Br J Cancer.* 1996 Dec;74(12):1949-54
- Walker**, J.E., M.J. Saraste, M.J. Runswick, and N.J. Gay. 1982. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 1:945-951
- Wang** Q, Beck WT. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res.* 1998 Dec 15;58(24):5762-9
- Wartenberg** M, Fischer K, Hescheler J, Sauer H. Redox regulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer.* 2000 Jan 15;85(2):267-74.
- Wartenberg** M, Ling FC, Schallenberg M, Baumer AT, Petrat K, Hescheler J, Sauer H. Down-regulation of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2001 May 18;276(20):17420-8.
- Witschi** H, Cote MG. Biochemical pathology of lung damage produced by chemicals. *Fed Proc.* 1976 Jan;35(1):89-94.
- Witschi** H, Kacew S, Hirai KI, Cote MG. In vivo oxidation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate by paraquat and diquat in rat lung. *Chem Biol Interact.* 1977 Nov;19(2):143-60.
- Yamada** H, Kurose-Hamada S, Fukuda Y, Mitsuyama J, Takahata M, Minami S, Watanabe Y, Narita H. Quinolone susceptibility of norA-disrupted *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Oct;41(10):2308-9
- Zaman** GJ, Versantvoort CH, Smit JJ, Eijdemans EW, de Haas M, Smith AJ, Broxterman HJ, Mulder NH, de Vries EG, Baas F, et al. Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 1993 Apr 15;53(8):1747-50
- Zaman** GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Scheper RJ, Baas F, Broxterman HJ, et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;91(19):8822-6

- Zaman** GJ, Lankelma J, van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, Oude Elferink RP, Baas F, Borst P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 15;92(17):7690-4
- Zhang** F, Riley J, Gant TW. Use of internally controlled reverse transcriptase polymerase chain reaction for absolute quantitation of individual multidrug resistant gene transcripts in tissue samples. *Electrophoresis*, 1996, 17, 255-260.
- Zhou** G, Kuo MT. NF-kappaB-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells. *J Biol Chem*. 1997 Jun 13;272(24):15174-83
- Zhu** Q, Center MS. Cloning and sequence analysis of the promoter region of the MRP gene of HL60 cells isolated for resistance to adriamycin. *Cancer Res*. 1994 Aug 15;54(16):4488-92.
- Ziemann** C, Burkle A, Kahl GF, Hirsch-Ernst KI. Reactive oxygen species participate in mdr1b mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis*. 1999 Mar;20(3):407-14

ID	Geschlecht	Alter	Diagnose
15	m	56	Plattenepithelkarzinom
16	m	70	Bronchialkarzinom
17	m	61	Bronchialkarzinom
18	m	77	Plattenepithelkarzinom
20	m	64	nichtkleinzelliges Karzinom
30	m	72	nichtkleinzelliges Karzinom
41	m	49	Adenom
43	m	67	zentrales Bronchialkarzinom rechts
45	m	69	Bronchialkarzinom
46	m	66	Bronchialkarzinom
47	m	75	Bronchialkarzinom
55	m	63	Bronchialkarzinom
56	m	71	Bronchialkarzinom Mischtyp
57	m	70	Plattenepithelkarzinom
58	w	63	Bronchialkarzinom linker Oberlappen
61	w	73	Bronchialkarzinom links
62	m	70	Bronchialkarzinom rechter Oberlappen
63	m	64	Bronchialkarzinom
64	m	64	Bronchialkarzinom
65	m	60	Bronchialkarzinom linker Unterlappen
66	m	65	Bronchialkarzinom linker Oberlappen
67	w	69	peripheres Bronchialkarzinom rechts
68	m	75	Bronchialkarzinom
69	w	40	kleinzelliges Bronchialkarzinom
70	m	61	Plattenepithelkarzinom rechter Oberlappen
71	m	59	Bronchialkarzinom
72	m	70	Bronchialkarzinom
73	m	48	Bronchialkarzinom rechts (rezidiv)
74	w	46	Karzinom, rechter Unterlappen
75	m	66	Bronchialkarzinom
76	m	71	Adenokarzinom linker Oberlappen
77	m	54	Adenokarzinom rechter Unterlappen, mucinös
78	m	66	Plattenepithelkarzinom rechter Oberlappen
79	m	59	Bronchialkarzinom linker Unterlappen
80	m	63	Tumor rechter Oberlappen, Bronchialkarzinom
81	m	60	nichtkleinzelliges Adenokarzinom rechter Oberlappen
82	m	71	Bronchialkarzinom rechter Unterlappen
83	m	65	Plattenepithelkarzinom
84	m	56	nichtkleinzelliges Karzinom squam.diff.
85	m	65	Bronchialkarzinom rechter Unterlappen
87	m	80	Plattenepithelkarzinom linker Oberlappen
89	w	60	Übertherapie???

Folgende Arbeiten wurden unter folgenden Titeln publiziert:

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Runge D., Köhler C., Kostrubsky V.E., Jäger D., Lehmann T., Runge D.M., May U., Stolz D.B., Strom S.C., Fleig W.E., Michalopoulos G.K. (2000) Induction of Cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, Multidrug Resistance (MDR-1) and Multidrug Resistance Associated Protein (MRP-1) by Prototypical Inducers in Human Hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 273 (1), 333-341

Runge D.M., Stock T.W., Lehmann T., Taege C., Bernauer U., Stolz D.B., Hofmann S., Foth H. (2001) Activation of Cytochrome P450 2E1 by ethanol in normal human bronchial epithelial cells. **Archives of Toxicology** 75, 335-345

Lehmann T., Köhler K., Weidauer E., Taege C., Foth H. (2001) Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. **Toxicology** 167(1):59-72.

Kongressbeiträge / Poster

Lehmann T., Weidauer E., Röhrdanz E., Tran Thi Q.H., Kahl R., Foth H. (2000) Influence of paraquat and hydrogen peroxide to antioxidant enzymes (Cat, MnSOD) and mdr1b in rat alveolar type II pneumocytes. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 361 (Suppl) R142

Köhler C., Weidauer E., Runge D.M., Lehmann T., Röhrdanz E., Tran Thi Q.H., Kahl R., Foth H. (2000) Oxidative stress alters expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein, but not antioxidant enzymes in lung tumor cell lines. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 361 (Suppl.) R163

Runge D., Runge D.M., Köhler C., Lehmann T., Jäger D., May U., Foth H., Dorko K., Strom S.C., Michalopoulos G.K., Fleig W.E. (2000) Expression of membrane transporter and cytochrome P450 proteins in serum-free long-term human hepatocyte cultures. **The FASEB Journal** 14 (4), 138.19

Lehmann T., Köhler C., Runge D.M., Foth H. (2000) Expression of multidrug resistance proteins and CYP2E1 in serum-free cultured human bronchial epithelial cells. **Toxicology Letters** 116 (Suppl.1), 47

Köhler C., Lehmann T., Kostrubsky V.E., Stolz D.B., Strom S.C., Michalopoulos G.K., Runge D.M., Runge D. (2000) Different induction pattern of cytochrome P450 and multidrug resistance proteins in serum-free human hepatocyte cultures. **Toxicology Letters** 116 (Suppl.1), 104

Lehmann T., Köhler C., Weidauer E., Foth H. (2001) Expression of multidrug-resistance (MRP) associated protein in normal human lung. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 363 (Suppl.) R161

- Rennicke A., Lehmann T., Müller S.P., Foth H. (2001) Transporters in hepatocytes and lung cells treated with ubiquinone (CoQ10) nanodispersion and hydrogen peroxide. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 363 (Suppl.) R161
- Lehmann T., Köhler C., Stehfest E., Stock T., Foth H. (2001) Expression of MRP1 in human lung cells and effect of promoters of oxygen radicals. **Toxicology Letters** 123 (Suppl.1), 130
- Stock T.W., Müller P., Lehmann T., Hofmann S.H., Foth H., Silber R.E. (2001) Activity, morphology and utility of primary normal human bronchial epithelial cells cultured from resection material. 30th Annual Meeting of the German Society of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2001. Leipzig;
<http://www.thieme.de/thoracic/abstracts2001/daten/fp12.html>
- Lehmann T., Stehfest E., Taege C., Hammer A., Hofmann S., Foth H. (2002) Variation der individuellen Expression von MRP und LRP in Primärkulturen humaner Lungenzellen. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 365 (Suppl.) R150
- Stehfest E., Lehmann T., Köhler C., Foth H. (2002) MRP-Expression und ihre Wechselwirkungen mit Glutathion in humanen Lungenzellen.
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 365 (Suppl.) R150

Lebenslauf

Name : Thomas Lehmann

Geburtstag : 22.12.1969

Geburtsort : Halle / Saale

Familienstand: ledig

Kinder: Robert Maximilian Loth, geb. 02.06.1995

Nationalität : deutsch

Eltern : Norbert Lehmann, geb. am 08.03.1936
Ingenieur für Lebensmitteltechnik, jetzt Rentner

Hannelore Lehmann, geb. Gawronski, geb. am 01.01.1940
Pharmazieingenieur, jetzt Rentnerin

Schulbildung :

09/1976-08/1986 Polytechnische Oberschule „ Diesterweg “ Halle
09/1985-08/1987 Erweiterte Oberschule „ Adolf Reichwein “ Halle

Wehrpflicht :

11/1988-01/1990 Grundwehrdienst

Berufsausbildung :

09/1990-10/1995 Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

01/1995-10/1995 Diplom, Institut für Klinische Chemie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/1996-09/1997 Kurs „Ökologiemanagement“, IHK Halle-Dessau

03/1998-04/2002 Doktorand am Institut für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg, Mitglied im Graduiertenkolleg
“Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch
relevante Wirkstoffe“

04/2002 - University of Pittsburgh, Department of Pathology

Erklärung über Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe.

Halle/Saale, den 15.4. 2002

Thomas Lehmann

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Daten die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen wurden, sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Halle/Saale, den 15.4. 2002

Thomas Lehmann