# MRP-Transporter in humanen Lungenzellen – Bedeutung für Risiken durch toxische Metalle

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)


vorgelegt der: Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
Institut für Biochemie und Biotechnologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

angefertigt am: Institut für Umwelttoxikologie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von: Marc Felix Johannes Glahn (staatl. gepr. Lebensmittelchemiker)
geboren am: 02.01.1973
in: München



Tag der Verteidigung: 13.04.2010

Gutachter /in:

1.) Frau Prof. Dr. Heidi Foth, MLU

2.) Herr Prof. Dr. Jan G. Hengstler, IfADo, TU Dortmund

3.) Herr Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß, MLU

Halle (Saale), den 10. September 2009

Man kann nur objektiv sein und sich seiner Vernunft bedienen,
wenn man demütig geworden ist und seine Kindheitsträume
von Allwissenheit und Allmacht überwunden hat.

Erich Fromm, 23.03.1900 bis 18.03.1980, Psychoanalytiker und Sozialphilosoph

**Inhaltsverzeichnis:**


| | | |
|---|---|---|
| **1** | **Einleitung** | **1** |
| 1.1 | Zielsetzung | 1 |
| 1.2 | Inhalationstoxikologie | 2 |
| 1.3 | Nicht respiratorische Funktion der Lunge | 5 |
| 1.4 | Die ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamilie | 6 |
| 1.5 | Die MRP-Transporter | 7 |
| 1.6 | Der *Ubiquitously Expressed Mammalian ABC Half-Transporter* (UMAT) | 14 |
| 1.7 | Übersicht der eingesetzten Metalle | 15 |
| 1.8 | Arsen | 15 |
| 1.9 | Blei | 17 |
| 1.10 | Cadmium | 19 |
| 1.11 | Cobalt | 21 |
| 1.12 | Kupfer | 23 |
| 1.13 | Quecksilber | 25 |
| **2** | **Material und Methoden** | **28** |
| 2.1 | Zellkultur | 28 |
| 2.1.1 | Tumorzelllinien | 28 |
| 2.1.2 | Kultivierung der Tumorzelllinien | 28 |
| 2.1.3 | Einfrieren und Auftauen der Tumorzelllinien | 28 |
| 2.1.4 | Patienten | 29 |
| 2.1.5 | Kultivierung normaler humaner Bronchialepithelzellen | 29 |
| 2.1.6 | Passagieren der normalen humanen Bronchialepithelzellen | 30 |
| 2.1.7 | Durchführung der Langzeitexperimente mit normalen humanen Bronchialepithelzellen | 30 |
| 2.1.8 | Vitalitätsbestimmung | 30 |
| 2.2 | *Real-time* Genexpressionsanalysen | 31 |
| 2.2.1 | RNA-Isolation | 31 |
| 2.2.2 | RNA-Quantifizierung mittels UV-Spektrometrie | 31 |
| 2.2.3 | Synthese der cDNA | 32 |
| 2.2.4 | *Real-time* PCR | 32 |
| 2.2.5 | Primer für die *Real-time* PCR | 33 |
| 2.3 | Genexpressionsanalyse mittels Microarray | 34 |
| 2.3.1 | Analyse der Microarrays | 34 |
| 2.3.2 | Analyse der Daten | 35 |
| 2.4 | Fixierung der Zellen | 36 |
| 2.5 | Immunhistochemische Verfahren | 37 |
| 2.6 | Aktivitätsbestimmung der MRP-Transporter | 37 |
| 2.7 | Gentoxizitätsbestimmung im Comet-Assay | 38 |
| 2.7.1 | Durchführung der Einzelzellgelelektrophorese | 38 |
| 2.7.2 | Messung der Proben am Fluoreszenzmikroskop | 39 |
| 2.7.3 | Bestimmung der DNA-Schädigung | 39 |
| 2.7.4 | Reagenzien für den Comet-Assay: | 40 |
| 2.8 | Statistische Analysen | 41 |
| **3** | **Ergebnisse** | **42** |
| 3.1 | Lungenzellkulturen | 42 |
| 3.1.1 | Kultur der humanen Lungentumorzelllinie H322 | 42 |

3.1.2 Primärkulturen von normalen humanen Lungenzellen 42
3.2 Die Wirkung von As(III) auf humane Lungenzellkulturen 49
3.2.1 Wirkung von Arsenit auf H322 Lungentumorzellen 49
3.2.2 Wirkung von Arsenit auf normale humane Bronchialepithelzellen 55
3.3 Die Wirkung von Cu(II) auf humane Lungenzellkulturen 67
3.3.1 Wirkung von Cu(II) auf H322 Lungentumorzellen 67
3.3.2 Die Wirkung von Cu(II) auf normale humane Bronchialepithelzellen 70
3.4 Die Wirkung von Hg(II) auf humane Lungenzellkulturen 76
3.4.1 Wirkung von Hg(II) auf H322 Lungentumorzellen 76
3.4.2 Die Wirkung von Hg(II) auf normale humane Bronchialepithelzellen 79
3.5 Die Wirkung von Cd(II), Co(II) und Pb(II) auf Bronchialepithelzellen 89

**4 Diskussion 96**
4.1 Zellkultur als Modellsystem 96
4.2 Bewertung von Arsenit 99
4.3 Bewertung von Kupfer 109
4.4 Bewertung von Quecksilber 113
4.5 Cd(II), Co(II) und Pb(II) als Faktoren für zellulären Stress 118

**5 Zusammenfassung 122**

**6 Literaturverzeichnis 125**

**7 Anhang 150**

**Abkürzungen:**

| | |
|---|---|
| AECG | Airway Epithelial Cell Growth Medium |
| Anh. | Anhang |
| aqua dest. | destilliertes Wasser |
| AS | Aminosäuren |
| ATF3 | aktivierender Transkriptionsfaktor 3 (eng.: Activating Transcription Factor 3) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BAT | Biologischer Arbeitsstofftoleranzwert |
| BfR | Bundesinstitut für Risikobewertung |
| BLW | Biologischer Leitwert |
| BSO | D,L-Buthionin (S,R)-sulfoximin |
| ca. | circa |
| cAMP | cyclisches Adenosin-3´,5´-monophosphat |
| CCD | Ladungsgekoppeltes Bauteil (Bildsensor der Kamera) (eng.: *Charge-coupled device*) |
| CDF | 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein |
| cGMP | cyclisches 3´,5´-Guanosinmonophosphat |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CHO | *Chinese hamster ovary (cells)*. Fibroblastenzelllinie aus den Ovarien des chinesischen Streifenhamsters *(Cricetulus griseus)*. |
| Cisplatin | cis-Diammindichloroplatin (CAS-Nr. 15663-27-1) |
| $C_t$ | Schwellenwertzyklus (eng.: *Threshold Cycle*) |
| d | Tag |
| $d_{ae}$ | Aerodynamischer Durchmesser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium* |
| dNTP | Desoxynucleotidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EHB | *Eisai hyperbilirubinemic (rats)* Rattenstamm ohne funktionsfähiges MRP2 |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| EKA | Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GESTIS | Gefahrstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung |
| GO | Gene Ontology |
| GSH | Glutathion |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| GY | *Groningen Yellow* (Rattenstamm ohne funktionsfähiges MRP2) |

| | |
|---|---|
| h | Stunde |
| IARC | Internationale Agentur für Krebsforschung (eng. *International Agency for Research on Cancer*) |
| $IC_X$ | Inhibitorische Konzentration X. Konzentration einer Substanz, die die Vitalität einer Zellkultur auf den Wert X verringert. (eng.: *inhibitory concentration*) |
| JECFA | *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* |
| KG | Körpergewicht |
| KEGG | *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* |
| MAK | Maximale Arbeitsplatz-Konzentration |
| MDCK | Zelllinie aus den distalen Tubuli der Hundeniere. (eng.: *Madin-Darby canine kidney*) |
| (m)M | (Milli)molar |
| (m)RNA | (messanger)Ribonukleinsäure |
| MRP | eng.: *Multidrug Resistance-Associated Protein* |
| MT | Metallothionein |
| NHBE | Normales humanes Bronchialepithel (auch: NHBE-Zellen) |
| NMR | Kernspinresonanz (eng.: *Nuclear Magnetic Resonance*) |
| OTM | Schweifmoment (eng.: *Olive Tail Moment*) |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung (eng.: *Phosphat Buffered Saline*) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (eng.: *Polymerase Chain Reaction*) |
| PET | Polyethylenterephthalat |
| PP | Polypropylen |
| PTWI | vorläufig duldbare wöchentliche Aufnahme (eng.: *Provisionally Tolerable Weekly Intake*) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (eng.: *rounds per minute*) |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Reverse Transkriptase Reaktion |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| Std | Standard |
| SULT | Sulfotransferase |
| TCDD | 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-1,4-dioxin |
| TGF-β | transformierender Wachstumsfaktor β (eng.: *Transforming Growth Factor-β*) |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit |
| UDP | Uridin-5´-diphosphat |
| UGT | UDP-Glucuronosyltransferase |
| UMAT | eng.: U*biquitously Expressed Mammalian ABC Half-Transporter* |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| XIAP | (eng.: *X-Linked Inhibitor of Apoptosis*) Anti-apoptotisch wirksames Protein. |

# 1 Einleitung

## 1.1 Zielsetzung

Die Lunge ist täglich einer Vielzahl inhalierter Stoffe ausgesetzt. Zur Bewertung des mit der Inhalation einer Substanz verbundenen Risikos sind unter anderem Kenntnisse über ihre Wirkungsweise auf zellulärer Ebene sowie über ihre Elimination aus der Zelle, welche auch die systemische Verfügbarkeit beeinflusst, nötig. Als Modellsystem zur Untersuchung der Wirkung von Stoffen auf die Lunge werden immer häufiger Lungenzellkulturen eingesetzt. Dabei gibt es zum einen die Möglichkeit des Einsatzes von Tumorzelllinien, deren Vorteile in ihrer leichten Verfügbarkeit und verhältnismäßig einfachen Kulturbedingungen liegen, die sich jedoch aufgrund ihrer Herkunft aus Tumoren in bestimmten Eigenschaften auch deutlich von den Zellen eines gesunden Organs unterscheiden. Zum anderen können Primärkulturen aus gesundem Gewebe zum Einsatz kommen, die, wenngleich aufwändiger zu kultivieren und aufgrund ihrer Gewinnung aus dem Gewebe von Patienten nur in geringerem Umfang verfügbar, der *in-vivo* Situation näher sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem die Expression bestimmter ABC-Transporter, der *Multidrug Resistance-Associated Proteins* (MRP), in Langzeitkulturen von primären normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE-Zellen) untersucht. Diese ist relevant für die Bewertung der Eignung von Langzeitkulturen als Modellsystem zur Simulation der chronischen Exposition gegenüber geringen Mengen einer Substanz, um damit beispielsweise die Expositionssituation des Menschen gegenüber Umweltschadstoffen abzubilden.

Die Substrate der MRP-Transporter umfassen ein breites Spektrum von Substanzen. Nachdem bereits für einige Isoformen ein Transport bestimmter Metallkomplexe beschrieben wurde (Leslie et al., 2004; Dijkstra et al., 1996), soll in der vorliegenden Arbeit der Beitrag der Transporter MRP1 bis 5 zur Resistenz von Lungenzellen gegenüber Arsenit, Cu(II) oder Hg(II) und damit verbunden die Bedeutung dieser MRP-Transporter für Risiken durch toxische Metalle untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll auch die Frage nach einer möglichen Beteiligung des *Ubiquitously Expressed Mammalian ABC Half-Transporter* (UMAT) an der Toleranz von Lungenzellen gegenüber den genannten Metallen beantwortet werden. Hierfür werden zwei Modellsysteme verwendet: Zum einen die humane Lungentumorzelllinie H322, zum anderen Primärkulturen von NHBE-Zellen. Insbesondere sollen die Effekte einer Langzeitexposition gegenüber Arsenit, Cu(II) oder Hg(II) auf die Expression der genannten ABC-Transporter in NHBE-Zellen untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden NHBE-Zellen als Modellsystem zur Ermittlung möglicher Effekte von Cd(II), Co(II) und Pb(II) auf die Genexpression der Zellen verwendet. Dabei soll unter Verwendung von Microarrays die Frage beantwortet werden, ob bereits bei einer Behandlung der Zellen mit den genannten Metallen in Konzentrationen der 2003 gültigen Grenzwerte für das Humanbiomonitoring, Änderungen im RNA-Expressionsmuster erkennbar sind und ob sich spezifische Marker-Gene für die Einwirkung der Metalle, sowohl einzeln als auch in Kombination, ermitteln lassen.

## 1.2 Inhalationstoxikologie

Werden Schadstoffe inhaliert, so ist die Lunge meist auch das Zielorgan des toxischen Effekts, wie etwa bei der Entstehung eines toxischen Lungenödems nach Inhalation von Phosgen oder Ozon. Die Lunge kann aber auch Zielorgan von Stoffen werden, die über andere Wege aufgenommen wurden, beispielsweise führt das Herbizid Paraquat 7 bis 14 Tage nach oraler Aufnahme zu einem Lungenödem. Man spricht in beiden Fällen von Lungentoxizität. Über den Respirationstrakt können Substanzen aufgenommen werden, die dann andere Organe schädigen.

Inhalierbare luftgetragene Stoffe können als Gase und Dämpfe oder als Aerosole aufgenommen werden. Letztere stellen eine Suspension von Flüssigkeits-Tröpfchen oder festen Partikeln in Luft dar. Gase sind Substanzen, die bei Raumtemperatur vollständig im gasförmigen Aggregatzustand vorliegen. Wohingegen Dämpfe spezielle Gase darstellen, die sich bei Raumtemperatur mit korrespondierenden anderen Aggregatzuständen im Gleichgewicht befinden. Bei der toxikologischen Beurteilung von Gasen und Dämpfen sind neben der Dosis, die sich aus Konzentration des Stoffes und Dauer der Exposition ermittelt, auch Dampfdruck, Wasserlöslichkeit und Reaktivität entscheidend: Besitzt eine toxische Substanz einen hohen Dampfdruck, so erhöht das ihr Gefährdungspotenzial.

Der Ort der Aufnahme und Wirkung einer Substanz im Respirationstrakt werden vor allem durch ihre Wasserlöslichkeit und ihrer Reaktivität mit biologischen Komponenten bestimmt. Nachdem sich wasserlösliche Gase gut im Mucus lösen werden sie dort verstärkt zurückgehalten. Die im Mucus gelösten Moleküle des Gases können dann in die darunter liegenden Epithelzellen und angrenzende Blutgefäße diffundieren. Über das Blut werden sie anschließend im Organismus verteilt. Schwach wasserlösliche Gase lösen sich nur gering im Mucus und gelangen so in die tieferen Atemwege, wo sie wegen der großen Oberfläche und der kurzen Diffusionsstrecke leichter aufgenommen werden können. Beispielsweise wird Formaldehyd wegen seiner guten Wasserlöslichkeit primär in den oberen Atemwegen resorbiert. Wohingegen Ozon aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit bis in die Alveolen gelangen kann.

Ein reaktives Gas wird schnell mit Bestandteilen von Mucus, Zellen oder Blut reagieren. Daher wird die Konzentration dieser Substanz auf der Strecke zwischen dem Lumen der Atemwege und dem Blut schnell geringer. Die Effekte eines solchen reaktiven Gases werden sich daher vor allem am Ort des Kontakts manifestieren. Eine schwach reaktive oder inerte Substanz kann jedoch bis ins Blut gelangen und anschließend Effekte in anderen Organen haben (Medinsky et al., 2001), wie etwa Vinylchlorid, welches nach chronischer Exposition Hämangiosarkome in der Leber verursachen kann.

Die Beschreibung der Prozesse, die bei der Inhalation von Aerosolen ablaufen, umfasst die Deposition und die Clearance. Mit dem Begriff Deposition wird in der Inhalationstoxikologie die Ablagerung von festen und flüssigen Teilchen aus der Atemluft in den Atemwegen bezeichnet. In welchem Abschnitt des Respirationstrakts Partikel deponiert werden, ist abhängig von aerosolphysikalischen, anatomischen und atemphysiologischen Faktoren. Der aerodynamische Durchmesser ($d_{ae}$) eines Teilchens ist dabei von großer Bedeutung. Der $d_{ae}$ wird als Kenngröße zur allgemeinen Beschreibung des aerodynamischen Verhaltens von Partikeln unterschiedlicher Form und Dichte verwendet. Er wird

für Partikel beliebiger Form und Dichte auf die Sedimentationsgeschwindigkeit einer Kugel mit der Dichte $\rho_0 = 1$ g/cm$^3$ bezogen.

Im Allgemeinen gelangen eingeatmete Partikel umso tiefer in die Atemwege, je kleiner ihr $d_{ae}$ ist. Der „inhalierbare Schwebstaub“ in der Luft umfasst Partikel mit einem $d_{ae} < 10$ µm ($PM_{10}$), der „lungengängige Feinstaub“ umfasst Partikel mit einem $d_{ae} < 2{,}5$ µm ($PM_{2,5}$). Partikel mit einem $d_{ae} <$ 0,1 µm werden als ultrafeine Partikel (UP) bezeichnet, sie können nicht nur tief in die Atemwege eindringen, sondern auch ins Blut übertreten, mit dem sie im Körper verteilt werden (Koller, 2005). Inhalierte Partikel mit einem $d_{ae}$ über 5 µm werden bei nasaler Atmung größtenteils im der Nase abgeschieden. Partikel mit einem $d_{ae}$ zwischen 5 und 0,5 µm werden in den Bronchiolen und Alveolen abgeschieden, wobei die Gesamtdeposition bei Partikeln mit einem $d_{ae}$ zwischen 1 und 0,2 µm ein Minimum durchläuft (Abb. 1, S.3) (Heyder et al., 1986).

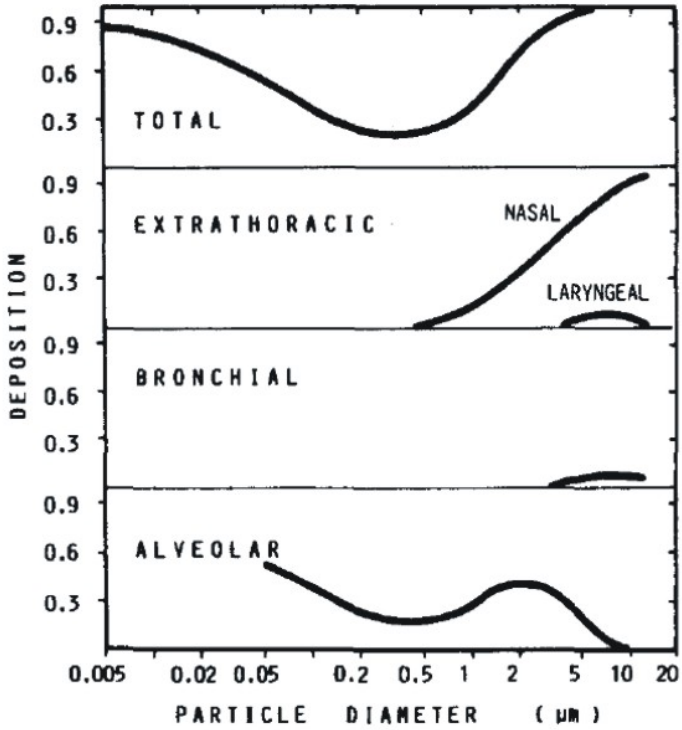



**Abb. 1 Deposition von Partikeln mit dae = 1 µm im Respirationstrakt eines durch die Nase atmenden Mannes. Bei einer Flussrate von 250 cm3/s und einer Atemzugdauer von 8s (Heyder et al., 1986)**

Partikel mit einem $d_{ae}$ unter 0,5 µm werden vornehmlich im alveolären Bereich abgeschieden. Sehr kleine Partikel mit einem $d_{ae}$ unter 0,01 µm werden sehr effektiv in der Nase abgetrennt. Nach Cheng et al. werden Partikel mit einem $d_{ae}$ von 0,01 µm zu 16% und Partikel mit einem $d_{ae}$ von 0,005 µm zu 40% abgetrennt (Abb. 2, S.4) (Cheng et. al, 1988; ICRP, 1994). Die verbleibende Fraktion der Partikel mit einem $d_{ae} < 0{,}01$ µm wird mit fallendem $d_{ae}$ verstärkt in den Bronchien und Bronchiolen deponiert, der in den Alveolen abgelagerte Anteil sinkt dabei mit fallendem $d_{ae}$ (ICRP, 1994).

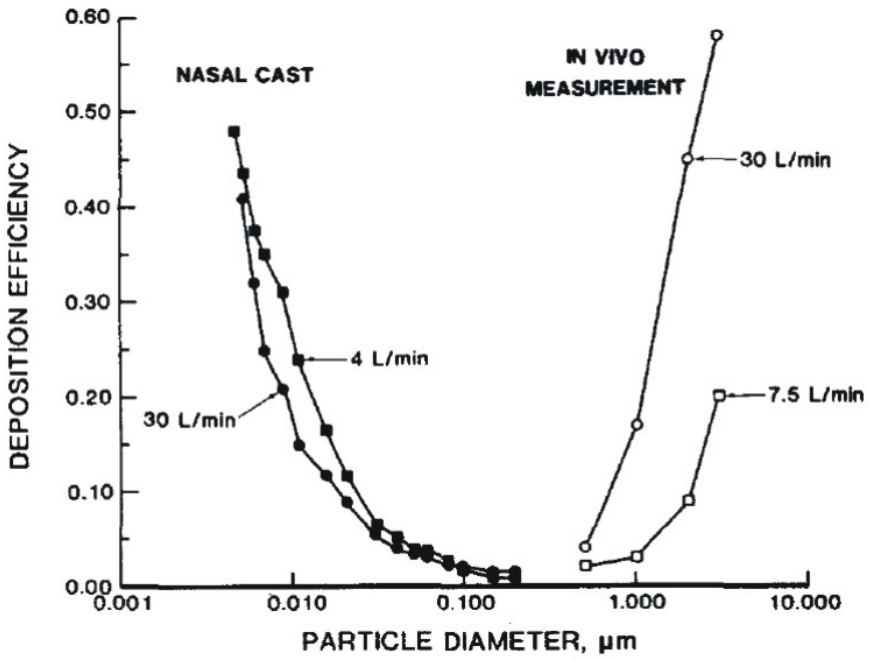



**Abb. 2 Simulierte Deposition von Partikeln im nasalen Bereich eines Menschen. Bei zwei unterschiedlichen Flussraten (Cheng et al., 1988)**

Geogene und marine Aerosolpartikel stellen aus medizinischer Sicht in der Regel kein Risiko dar. Die anthropogenen Partikel sind hingegen seit einigen Jahren Gegenstand ausgiebiger Forschung und gesetzlicher Regulation. Hauptverursacher von Feinstaubemissionen ($PM_{10}$) waren in Deutschland im Jahr 2003 Industrieprozesse (41,5%), Straßenverkehr (27,1%) (davon 22,4% verbrennungsbedingt und 4,7% durch Reifenabrieb), Haushalte und Kleinverbraucher (14,7%), sowie Kraftwerke (8,2%) (Koller, 2005).

Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung besitzen Partikel aus Verbrennungsprozessen besondere toxikologische Relevanz. Aus einer Studie der amerikanischen Umweltbehörde EPA (2004) geht hervor, dass die Exposition gegenüber Feinstaub negative gesundheitliche Auswirkungen auf Menschen mit Atemwegs- und Herz-Kreislauferkrankungen hat (EPA, 2004). Zu den dokumentierten Kurzzeiteffekten gehören erhöhte Mortalitätsraten, vermehrte Krankenhausaufnahmen und Arztbesuche wegen Herz-Kreislauf- und Atemwegserkrankungen, weiterhin Veränderungen von Herzrhythmus, EKG und anderen Funktionsparametern des Herz-Kreislauf-Systems und der Atemwege. Langzeitstudien zeigen einen Anstieg der Sterblichkeit an kardiopulmonalen Ursachen und Lungenkrebs neben einer erhöhten Inzidenz von chronischen Atemwegserkrankungen. Kinder, ältere Erwachsene und Kranke stellen besonders empfindliche Gruppen dar. Epidemiologische Studien zeigten im abgedeckten Konzentrationsbereich keine Hinweise auf eine Schwelle in der Expositions-Wirkungs-Beziehung zwischen Feinstaubexposition und Mortalität. Man geht daher bei der Grenzwertfestlegung von einer linearen Dosis-Wirkungsbeziehung aus. Die vorhandenen Studien zeigen für feine Partikel ($PM_{2,5}$) die deutlichsten Effekte (Koller, 2005). Am 01. Januar 2005 ist die EU-Richtlinie 1999/30/EG zur Begrenzung von Feinstaubemissionen in Kraft getreten. Im

Jahresmittel dürfen seitdem nur noch 40 µg Feinstaub ($PM_{10}$) in einem Kubikmeter Luft enthalten sein. Der Tagesgrenzwert von 50 µg/$m^3$ $PM_{10}$ darf nicht öfter als 35 mal jährlich überschritten werden, was auch vier Jahre nach dem Inkrafttreten dieses Grenzwertes in vielen deutschen Städten nicht eingehalten werden kann.

### 1.3 Nicht respiratorische Funktion der Lunge

Neben der essentiellen Funktion der Aufnahme von Sauerstoff und der Abgabe von Kohlendioxid hat der Respirationstrakt eine Reihe weiterer vitaler Funktionen. Er leistet einen wesentlichen Beitrag zum olfaktorischen System, spielt eine Schlüsselrolle beim Säure-Base-Gleichgewicht des Körpers, fungiert als Blutspeicher und hat immunologisch wichtige Funktionen. Inhalierte Substanzen können jede dieser physiologischen Funktionen beeinflussen.

Substanzen, die beispielsweise auch adsorbiert an Partikel über die Atmluft in den Respirationstrakt gelangen, werden bereits dort von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus umgesetzt. Durch diese Enzyme können inhalierte Substanzen entweder detoxifiziert oder aktiviert werden. Der Respirationstrakt besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen, die unterschiedliche physiologische Aufgaben haben und sich auch hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Enzymen des Fremdstoffmetabolismus unterscheiden. Bereits in der Nasenschleimhaut kommen inhalierte Stoffe mit Enzymen des Phase I-Stoffwechsels wie Cytochrom P-450 Isoenzymen, Flavin-äbhängigen Monooxigenasen sowie Epoxidhydrolasen in Kontakt (Bogdanffy und Keller, 1999; Dahl et al., 1988). Die Lunge weist signifikante Aktivitäten von Cytochrom P-450 Isoenzymen sowie von Flavin-äbhängigen Monooxigenasen und Epoxidhydrolasen auf (Bogdanffy und Keller, 1999; Kikkawa, 1992; Raunio et al., 1998). Zusätzlich zu den Enymen des Phase-I-Stoffwechsels sind im Respirationstrakt auch Enzyme des Phase-II-Stoffwechsels nachweisbar. Zu diesen Enzymen gehören beispielsweise Glutathion-S-Transferasen (GST), UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) und Sulfotransferasen (SULT). In der menschlichen Nasenschleimhaut wurde die Expression von GST und SULT nachgewiesen (Aceto et al., 1989; Beckman et al., 1995). Über die Expression von Phase II-Enzymen in den unteren Atemwegen des Menschen gibt es bis jetzt nur wenige Daten. Die vorhandenen Daten zeigen in der menschlichen Lunge eine geringere Enzymaktivität als in der von Nagern (Bogdanffy und Keller, 1999). In der menschlichen Lunge sind sowohl GST als auch UGT nachweisbar (Conner et al., 1997; Coursin et al., 1996).

Die von den Enzymen des Phase-II-Metabolismus gebildeten Konjugate, etwa mit Glutathion, Glucuronid oder Sulfat, können als Substrate für bestimmte ABC-Transporter fungieren, womit diese zur Elimination dieser Stoffwechselprodukte aus der Lunge beitragen können. Für die vorliegende Arbeit sind besonders durch Glutathion-S-Transferasen gebildete GSH-Komplexe von Metallen relevant, welche Substrate für MRP-Transporter darstellen können.

## 1.4 Die ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamilie

Bei den ATP-Binding Cassette Transportern handelt es sich um integrale Membranproteine, die in allen Reichen des Lebens vorkommen. Alle eukaryotischen ABC-Transporter weisen als gemeinsames Strukturmerkmal die Aufteilung in charakteristische Domänen auf: Zwei zytoplasmatische Nukleotidbindedomänen (NBD), die durch Bindung und Hydrolyse von ATP die für den Transport benötigte Energie bereitstellen, sowie mindestens zwei Transmembrandomänen (TMD) für die Substratbindung, manche ABC-Transporter besitzen drei TMD. Die MSD enthalten zwischen fünf und zehn Transmembranhelices, typischerweise jedoch sechs. Alle ABC-Transporter weisen in ihren NBD drei charakteristische Sequenzmotive auf. Neben den zur Bindung und Hydrolyse von ATP notwendigen charakteristischen Walker A und B Motiven, die alle ATP-bindenden Proteine besitzen verfügen sie noch über ein als „C"-Signatur bezeichnetes Motiv mit der Sequenz „LSGGQ", welches für ABC-Transporter charakteristisch (Higgins et al., 1986) und ebenfalls an der Hydrolyse von ATP beteiligt ist (Haimeur et al., 2004). Man unterscheidet Volltransporter, die beide NBD und beide TMD in einem einzigen Polypeptid enthalten, wie beispielsweise MDR1, und Halbtransporter, deren funktionelle Einheit ein Homo- oder Heterodimer aus zwei Polypeptiden darstellt, bei der jedes Polypeptid jeweils eine NBD und eine TMD beiträgt. Das Breast Cancer Resistance Protein stellt ein Beispiel für einen Halbtransporter dar, dessen funktionelle Form wahrscheinlich ein Homodimer ist (Ozvegy et al., 2001). Die ABC-Transporter können aufgrund von Übereinstimmungen in der Struktur, der Reihenfolge der Domänen und Sequenzhomologien in den NBD und den TMD in Unterfamilien eingeteilt werden. Bei Säugern gibt es sieben Unterfamilien (A-G) (Dean et al., 2001). Die meisten ABC-Proteine transportieren Liganden aktiv unter Hydrolyse von ATP durch Membranen. Sie erfüllen damit für die Physiologie der Zelle sehr wichtige Aufgaben. Physiologische Substrate von ABC-Transportern beim Menschen umfassen unter anderem Lipide, Gallensäuren, Stoffwechselprodukte, Xenobiotika, und deren Konjugate sowie Peptide für die Antigenpräsentation (Borst und Oude Elferink, 2002). In den sekretorischen Epithelien von Säugern dienen ABC-Transporter der Ausscheidung von Metaboliten. In der Leber beispielsweise von Gallensäuren durch den Gallensäuretransporter BSEP (Bile salt export pump, ABCB11), Phosphatidylcholin durch MDR3 (ABCB4), Bilirubinglucuroniden durch MRP2 (ABCC2) und diversen Pharmaka durch das Multidrug Resistance Protein MDR1 (P-Glycoprotein, P-gp, ABCB1) (Borst, Oude Elferink, 2002). Darüber hinaus schützen ABC-Transporter wichtige Kompartimente im Körper wie Gehirn, Cerebrospinalflüssigkeit, Hoden und den Fötus durch Abtransport von Toxinen. Das humane Genom enthält 48 ABC-Transporter und Mutationen in diesen Genen wurden als Ursachen für eine Reihe von genetisch bedingten Erkrankungen beschrieben. Diese umfassen neben einer Blutgerinnungsstörung (Albrecht et al., 2005), und einer Reihe von Augen- und Lebererkrankungen (Jacquemin, 2000; Martinez-Mir et al., 1998) auch die zystische Fibrose (Riordan et al., 1989) und die Pseudoxanthoma elasticum (Bergen et al., 2007). Sowohl bei der Therapie von Tumorerkrankungen, als auch bei der Behandlung von bakteriellen und viralen Infektionen, stellen durch ABC-Transporter verursachte Resistenzen ein erhebliches Hindernis dar (Dawson et al., 2007; Deeley et al., 2006, Löscher, Potschka, 2005). Da sich diese Resistenzen auch gegen Wirkstoffe richten können, mit denen der

Patient bisher nicht in Kontakt kam und die sich in ihrem Wirkmechanismus und ihren Angriffspunkten auf zellulärer Ebene von den Wirkstoffen die zur Bildung der Resistenz geführt haben, drastisch unterscheiden, spricht man von *Multidrug Resistance* (MDR) (Dano, 1972; Deeley et al., 2006).

### 1.5 Die MRP-Transporter

Im Lauf der letzten 20 Jahre zeigte sich, dass MDR1 bei weitem nicht der einzige menschliche ABC-Transporter ist, der zumindest in-vitro Resistenz gegen klinisch relevante Chemotherapeutika bewirken kann (Deeley et al., 2006; Hopper-Borge et al., 2004; Guo et al., 2003; Belinski et al., 2002; Chen et al., 2001; Cole et al., 1992). Bis heute sind zehn derartige Transporter bekannt und abgesehen von BCRP (ABCG2) gehören sie alle zu den Multidrug Resistance Associated Proteinen (MRP/ABCC) (Dean et al., 2001; Deeley et al., 2006). Beim Menschen sind bis jetzt zehn MRP-Transporter beschrieben (vgl. Tab. 1, S.7).

**Tab. 1 Humane MRP-Transporter**

| Name | Symbol | Chromosomale Lokalisation * | Länge (AS) * |
|---|---|---|---|
| MRP1 (MRP) | ABCC1 | 16p13.11 | 1531 |
| MRP2 (cMOAT) | ABCC2 | 10q23 | 1541 |
| MRP3 (cMOAT-2) | ABCC3 | 17q21.3 | 1527 |
| MRP4 | ABCC4 | 13q32.1 | 1325 |
| MRP5 | ABCC5 | 3q27 | 1437 |
| MRP6 | ABCC6 | 16p13.1 | 1503 |
| MRP7 | ABCC10 | 6p12 | 1492 |
| MRP8 | ABCC11 | 16q12.1 | 1382 |
| MRP9 | ABCC12 | 16q12.1 | 1359 |
| MRP10 | ABCC13 | 21q11.2 | 325 |

* Nach Haimeur et al., 2004 und Yabuuchi et al., 2002.

Für die Isoformen MRP1 bis 8 konnte gezeigt werden, dass sie funktionierende ATP-abhängige Transporter darstellen, deren Substratspektren eine große Zahl von Endo- und Xenobiotika sowie deren Konjugate mit Glutathion, Glucuronid, Sulfat und Glutamat umfassen (Abb. 2, S.8). Die durch zumindest einige dieser Transporter verursachten Resistenzprofile umfassen neben Wirkstoffen natürlichen Ursprungs Nukleotid-Analoga, Folsäure-Antagonisten, Alkylierungsmittel sowie Platinverbindungen, Arsen- und Antimonsalze. Ob MRP9 für einen funktionsfähigen Transporter kodiert, konnte bisher noch nicht gezeigt werden (Ono et al., 2007). Die zuletzt entdeckte Isoform MRP10 (ABCC13) (Yabuuchi et al., 2002) scheint im Lauf der Evolution der Säugetiere zu einem Pseudogen geworden zu sein. Als einzige Spezies mit einem funktionsfähigen durch das ABCC13 Gen kodierten Transporter wurde bisher *Macaca mulatta* beschrieben (Annilo und Dean, 2004).

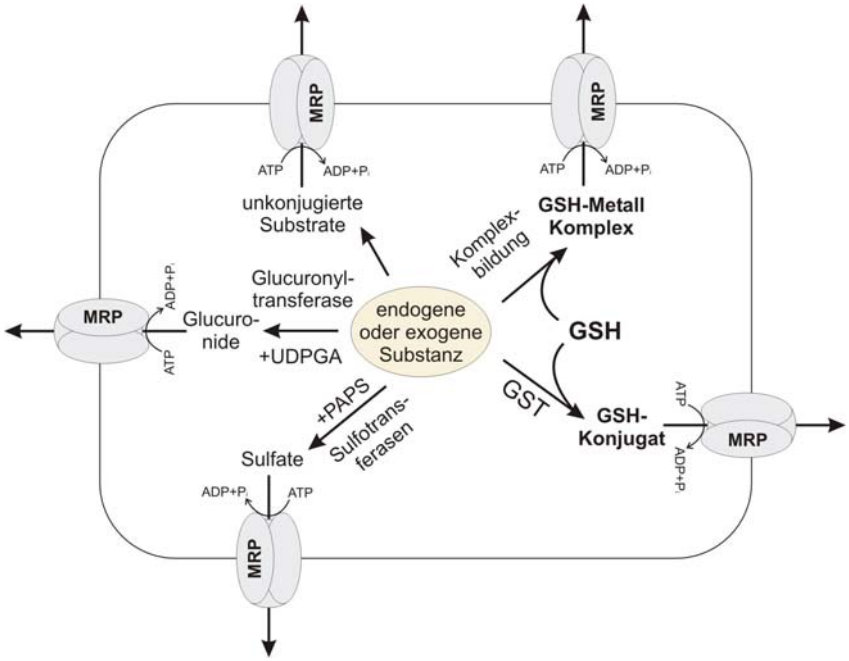



**Abb. 2 Der Transport unterschiedlicher Substrate durch MRP-Proteine**

Die MRP-Transporter sind Volltransporter, sie werden nach dem Vorhandensein einer zusätzlichen, dritten N-terminalen Transmembrandomäne (TMD0) in „kurze“ und „lange“ MRP eingeteilt. Zu den „langen“ MRP gehören: MRP1, 2, 3, 6 und 7, die „kurzen“ MRP umfassen die Isoformen MRP4, 5, 8, 9 und 10 (Abb. 3, S.8) (Deeley et al., 2006).

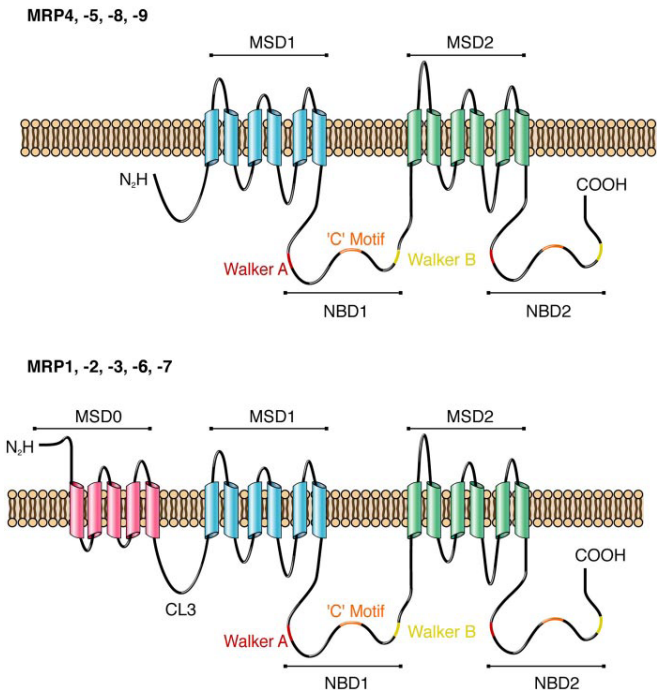



**Abb. 3 Mögliche Topologie der MRP-Transporter. Die Abbildung basiert auf den Simulationen durch verschiedene computergestützte Modelle (Deeley et al., 2006)**

Die Funktionen der Transmembrandomäne TMD0 sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei MRP1 konnte gezeigt werden, dass sie für die Lokalisation des Transporters in der Plasmamembran notwendig ist, nicht jedoch für die Transportaktivität (Bakos et al., 1998; Kruh et al., 2007; Westlake et al., 2005). Die MRP-Transporter werden aber anhand dieses Strukturmerkmals aufgeteilt. Nur die kurzen MRP, mit Ausnahme von MRP9 und 10, transportieren Nukleotid-Analoga und zyklische Nukleotide (Kruh et al., 2007).

MRP 1

MRP1 wurde als erstes Mitglied der Familie der humanen MRP-Transporter in der multiresistenten Tumorzelllinie H69AR beschrieben (Cole et al., 1992). Die Hauptsubstrate von MRP1 sind organische Anionen (z.B. Konjugate von Endo- und Xenobiotika mit Glutathion, Glucuronid und Sulfat) (Jedlitschky et al., 1996). Im Unterschied zu MDR1 benötigt MRP1 zum Transport sowohl einiger unkonjugierter als auch konjugierter Substanzen Glutathion (GSH). Die Beteiligung von GSH am MRP1-katalysierten Transport ist sehr komplex und noch nicht abschließend erforscht. Beispielsweise wird der Transport einiger hydrophober Substanzen wie Vincristin durch GSH stimuliert, andererseits steigert Vincristin den Efflux von GSH aus der Zelle (Loe et al., 1998). Dieser Effekt wurde ursprünglich durch einen Co-Transport der beiden Substanzen erklärt (Deeley und Cole, 2003), aktuelle Modelle gehen von einer großen Bindedomäne aus, die mehr als einen Liganden binden kann, was sowohl kooperative als auch kompetitive Wechselwirkungen zwischen den Liganden ermöglicht (Borst et al., 2006). Weiterhin transportiert MRP1 oxidiertes Glutathion (GSSG) sogar noch effektiver als GSH. Man vermutet daher, dass es an der zellulären GSH-Homöostase beteiligt ist und durch Export von GSSG bei oxidativem Stress das Gleichgewicht zwischen oxidiertem und reduziertem Glutathion aufrecht erhält (Krause et al., 2007; Leier et al., 1996).

Zellen, die MRP1 überexprimieren, zeigen in-vitro eine gesteigerte Resistenz gegenüber einigen Metallen. Man nimmt an, dass dies auf den Transport von GSH-Metall Komplexen durch MRP1 zurückzuführen ist (Borst et al., 2000). Nachdem Cole und Mitarbeiter zeigten, dass mit MRP1 transfizierte humane Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen) eine erhöhte Toleranz gegenüber As(III) und As(V), sowie gegen Sb(III) und Sb(V) haben, nicht jedoch gegen Cd(II) und Cisplatin (Cole et al., 1994), wurde in anderen Zellkulturmodellen ebenfalls ein Beitrag von MRP1 zur Resistenz gegenüber anorganischen Verbindungen von Arsen und Antimon, sowie Hg(II) und auch Cisplatin beschrieben (Ishikawa et al., 1996; Vernhet et al., 1999; 2000). Für Arsenit und Cisplatin konnte gezeigt werden, dass sie nur in Form ihrer Komplexe mit Glutathion transportiert werden (Ishikawa et al., 1996; Leslie et al, 2004). Für die Bildung des $As(GS)_3$-Komplexes ist die Glutathion-S-Transferase P1-1 notwendig (Leslie et al., 2004). Das erste durch *in-vitro* Experimente identifizierte Substrat von MRP1 war das pro-inflammatorische Zytokin Leukotrien C4 ($LTC_4$), welches zugleich auch das am besten erforschte physiologische Substrat dieses Transporters darstellt (Leier et al., 1994). Weitere physiologische Substrate sind das Östradiol-17-β-D-glucuronid ($E_2$17βG), Östron-3-sulfat sowie Sulfatkonjugate von Gallensäuren (Jedlitschky et al., 1996; Quian et al., 2001).

Die physiologischen Funktionen von MRP1 konnten trotz der Verfügbarkeit von Mrp1 (-/-) Mäusen noch nicht abschließend aufgeklärt werden. Die Tiere sind in geschützter Umgebung auch ohne ihren Haupt-$LTC_4$-Transporter gesund (Lorico et al., 1997; Wijnholds et al., 1997). Im Unterschied zu MRP2 und MRP3, deren Verbreitung im Körper begrenzt ist, wird MRP1 ubiquitär exprimiert, besonders stark in Lunge, Testis, Nieren, Placenta, Skelett- und Herzmuskel (Cole et al., 1992, Flens et al., 1996, St. Pierre et al., 2000). Trotz seiner Expression in vielen unterschiedlichen Geweben wird MRP1 jeweils in spezifischen Zelltypen exprimiert. Beispielsweise zeigen Zellen, die eine Barrierefunktion haben, eine höhere Expression von MRP1, als die Zellen in ihrer Umgebung. Kapillarendothelzellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, Coroidzellen in der Blut-Liquor-Schranke, Synzythiotrophoblasten der Plazenta und Bronchialepithelzellen sind Beispiele hierfür (Scheffer et al., 2002a; Löscher und Potschka, 2005; St. Pierre et al., 2004). Bemerkenswerterweise ist MRP1 in der Leber von Erwachsenen kaum nachweisbar, während einer Regeneration nach Gewebeschädigung ist die Expression jedoch erhöht (Ros et al., 2003). Gewebe, wie Testis, Nieren und die Mucosa des Oropharynx, die normalerweise eine hohe MRP1-Expression haben, sind bei Mrp1 (-/-) Mäusen besonders empfindlich gegenüber dem Zytostatikum Etoposid (Wijnholds et al., 1997, Wijnholds et al., 1998). Gegenüber As(III) zeigen diese Tiere keine erhöhte Empfindlichkeit, was möglicherweise auf die Ausscheidung von Komplexen von As(III) und Methylarsenit mit GSH über die Galle zurückzuführen ist, woran möglicherweise andere MRP-Isoformen beteiligt sind (Kala et al., 2000; Lorico et al, 1997; Paulusma et al., 1999; Vernhet et al., 2001). Weiterhin lassen sich bei Mrp1 (-/-) Mäusen in Geweben, in denen MRP1 normalerweise stark exprimiert ist, erhöhte GSH-Konzentrationen nachweisen, was für eine Beteiligung von MRP1 an der Regelung des Redoxstatus der Zelle spricht (Lorico et al., 1997).

MRP 2

Das Substratspektrum von MRP1 weist große Übereinstimmungen auf mit dem eines bereits vor der Entdeckung von MRP1 beschriebenen Transporters für organische Anionen aus der kanalikulären Membran von Hepatozyten, der als cMOAT (*canalicular multispecific organic anion transporter*) bezeichnet wurde (König et al., 1999; Oude Elferink et al., 1995). Die Substrate von cMOAT wurden mit Hilfe der Rattenstämme $TR^-$ und GY untersucht, die keinen funktionsfähigen cMOAT besitzen und daher eine gestörte Elimination von Bilirubin-Glucuroniden über die Galle aufweisen. Diese Exkretionsstörung tritt auch autosomal-rezessiv vererbt beim Menschen auf und wird als Dubin-Johnson-Syndrom bezeichnet (Kartenbeck et al., 1996; Paulusma und Oude Elferink, 1997). Schließlich konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei cMOAT nicht um MRP1 handelt, sondern um ein homologes Protein mit einer zu 49% übereinstimmenden Sequenz, den Transporter MRP2. 1996 wurde MRP2 erstmals aus der Rattenleber kloniert (Büchler et al., 1996; Paulusma et al., 1996). MRP2 wird im Säugerorganismus nur in wenigen Organen exprimiert. Die höchste Expression ist in der Leber nachweisbar, da MRP2 hier eine physiologische Funktion als Haupttransporter für Bilirubin-Glucuronide hat (Kartenbeck et al., 1996). Daneben wird MRP2 in den proximalen Tubuli der Niere, dem Darmepithel, den Synzytiotrophoblastzellen der Plazenta und der Blut-Hirn-Schranke

exprimiert (Evers et al., 1998; Fromm et al., 2000; Kawabe et al., 1999; Löscher und Potschka, 2005; Paulusma et al., 1999;). Im Unterschied zu MRP1 und den meisten anderen MRP-Isoformen, ist MRP2 in den Zellen ausschließlich in der apikalen Membran vorhanden (Borst et al., 2002; Haimeur et al., 2004). Sowohl die Organverteilung als auch die subzelluläre Lokalisation vom MRP2, deuten auf eine Beteiligung dieses Transporters an der Elimination von körpereigenen und -fremden Substanzen sowie am Schutz sensibler Bereiche des Organismus vor solchen Verbindungen hin. In diesem Zusammenhang steht auch die Fähigkeit sowohl von MRP2, als auch von MRP1, Produkte des Phase II-Metabolismus wie Konjugate von Endo- und Xenobiotica mit Glutathion aber auch mit Sulfat und Glucuronid zu transportieren (Deeley et al., 2006; Haimeur et al., 2004). Hierzu gehört beispielsweise das GSH-Konjugat des Mykotoxins Aflatoxin $B_1$ (Loe et al., 1997), oder das Glucuronid-Konjugat NNAL-O-Gluc des tabakrauchspezifischen Nitrosamins 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). Interessanterweise benötigt MRP1 jedoch GSH zum Transport von NNAL-O-Gluc, während MRP2 die Verbindung ohne GSH transportieren kann (Leslie et al., 2001). Zu den physiologischen Substraten von MRP2 gehören konjugierte Leukotriene wie $LTC_4$, (Loe et al., 1996), sowie Steroid- und Gallensäurekonjugate (Deeley et al., 2006). Auch MRP2 transportiert GSH und GSSG, daher vermutet man, dass es, wie MRP1, an der Glutathionhomöostase der Zellen und dadurch auch an ihrem Schutz vor oxidativem Stress beteiligt ist (Paulusma et al., 1999). In transfizierten Zellen bewirkte Überexpression von MRP2 gesteigerte Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika wie Vinca-Alkaloide, Anthracykline, Camptothecinderivate, Mitoxantron, Methotrexat und Cisplatin (Borst et al., 2002; Taniguchi et al., 1996). Neben Cisplatin wird auch der Transport der GSH-Komplexe einiger anderer Metalle durch MRP2 beschrieben, dazu gehören: As(III), Cd(II), Cu(II), Hg(II), Zn(II) (Aleo et al., 2005; Dijkstra et al., 1996; Leslie et al., 2004; Sugawara et al., 1998). Die Expression von MRP2 wurde auch bei Patienten mit Kolonkarzinom mit einer Resistenz gegen Cisplatin in Verbindung gebracht (Hinoshita et al., 2000). Daneben wurde MRP2 in Tumoren aus Niere, Gastrointestinaltrakt, Brust, Lunge und Ovarien nachgewiesen (Sandusky et al., 2002). Über die klinische Relevanz von MRP2 für ein Versagen der Chemotherapie gibt es jedoch widersprüchliche Befunde. Während die Expression von MRP2 zusammen mit anderen Indikatoren beim Ovarienkarzinom als geeignet zur Vorhersage des Erfolgs einer Chemotherapie bewertet wurde (Materna et al., 2004) erfüllte der Nachweis von MRP2 in einer Studie an Lungenkrebspatienten diese Funktion nicht (Filipits et al., 2007). Wenngleich die Autoren in der letztgenannten Studie zeigen konnten, dass ein Nachweis von MRP2 einen unabhängigen Marker für eine schlechte Prognose beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom darstellt.

MRP 3

Teile der Sequenz von MRP3 wurden erstmals 1997 zusammen MRP4 und 5 publiziert (Kool et al., 1997). Die Sequenz des MRP3-Gens besitzt 58% Übereinstimmung mit der von MRP1 und 48% mit der von MRP2 (Haimeur et al., 2004). Beim Menschen wird MRP3 in Magen, Leber, Nebenniere, Duodenum und Kolon am höchsten exprimiert. Geringere Mengen sind in Pankreas und Dünndarm nachweisbar, sowie in Trachea, Lunge, Plazenta und Prostata (Kool et al., 1997; Leitner et al., 2007).

In polarisierten Zellen wird MRP3 nur auf der basolateralen Seite exprimiert (Deeley et al., 2006; Haimeur et al., 2004). Ein deutlicher Unterschied des Substratspektrums von MRP3 zu dem von MRP1 und 2 besteht darin, dass MRP3 Glutathion nicht und Glutathionkonjugate nur mit geringerer Affinität transportiert (Akita et al., 2002; Kool et al., 1999b). Dafür weist MRP3 beim Transport von Glucuroniden eine deutlich höhere Aktivität als MRP1 und 2 auf (Zelcer et al., 2001). Nachdem MRP3 neben glucuronidierten Gallensäuren auch Cholate, Taurocholate und Glycocholate transportiert, wurde postuliert, dass MRP3 in der Leber am enterohepatischen Kreislauf von Gallensäuren beteiligt ist (Hirohashi et al., 1998). MRP3(-/-)-Mäuse zeigen jedoch keine Symptome einer Störung des Gallensäurestoffwechsels (Zelcer et al., 2005). An diesen Tieren konnte jedoch demonstriert werden, dass MRP3 einen entscheidenden Beitrag zur Elimination der Glucuronide von Paracetamol und Morphin aus der Leber leistet (Manautou et al., 2005; Zelcer et al., 2005). Die physiologische Funktion von MRP3 könnte demnach in der Elimination der Glucuronide endo- und exogener Substanzen bestehen. Überexpression von MRP3 in Zellkulturen führt zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Epipodophyllotoxinen und Cisplatin nicht jedoch gegenüber Anthracyclinen oder Vinca-Alkaloiden (Kawai et al., 2002; Kool et al., 1999b; Zelcer et al., 2001). In einer Reihe von Tumoren aus unterschiedlichen Organen wurde eine Überexpression von MRP3 nachgewiesen, dazu gehören Tumore der Leber, Ovarien, Blase, Bauchspeicheldrüse und des ZNS (Deeley et al., 2006). Bei Ovarientumoren wurde eine gesteigerte Expression von MRP3 mit einer ungünstigen Prognose assoziiert, bei Leukämieformen des Kindesalters zusätzlich noch mit mangelndem Ansprechen auf eine Chemotherapie (Ohishi et al., 2002; Steinbach et al., 2003).

MRP 4

Die höchste Expression von MRP4 findet man beim Menschen in Lunge, Nieren und Prostata. Trachea, Schilddrüse, Hoden, Skelettmuskulatur und Knochenmark weisen geringere Mengen auf (Leitner et al., 2007). MRP4 wird in einigen Zellen wie den proximalen Tubuluszellen der Niere und den mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns apical exprimiert, wohingegen es im Drüsenepithel der Prostata und im Plexus choroideus auf der basalen Seite vorliegt (Deeley et al., 2006; Kruh et al., 2007). Wie MRP1, 2 und 3 transportieren auch MRP4, 5 und 8 als Vertreter der „kurzen“ MRPs organische Anionen. Im Unterschied zu den „langen“ MRPs gehören jedoch auch zyklische Nukleotide, sowie antiviral und zytostatisch wirksame Nukleotid- und Nukleosidanaloga zu ihren Substraten (Haimeur et al., 2004). Sowohl für MRP4 als für MRP5 konnte in transfizierten Zellkulturen gezeigt werden, dass sie GSH transportieren (Ballatori et al., 2005; Lai und Tan, 2002; Wijnholds et al., 2000b). In einigen Substraten unterscheidet sich MRP4 auch von MRP5; es transportiert Gallensäuren, Steroidkonjugate, Salze der Harnsäure und Prostaglandine (van Aubel et al., 2005; Chen et al., 2001; Reid et al., 2003; Rius et al, 2003). Trotz der Fähigkeit von MRP4, die Resistenz von Zellkulturen gegenüber bestimmten Chemotherapeutika und Virostatika zu erhöhen, ist die klinische Relevanz dieses Transporters noch nicht geklärt (Gradhand und Kim, 2008). Bei Patienten mit Neuroblastom wurde die Expression von MRP4 mit einer negativen Prognose in Verbindung gebracht (Norris et al., 2005).

MRP 5

MRP5 ist im Körper ubiquitär nachweisbar, am höchsten exprimiert ist es in Skelett- und Herzmuskulatur, Herz, sowie in Teilen des Gehirns (Kool et al., 1997; Leitner et al., 2007). In den mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns liegt MRP5 in der apicalen Membran, in allen anderen polarisierten Zellen wird es in der basolateralen Membran nachgewiesen (Löscher und Potschka, 2005; Wijnholds et al., 2000b). Im Unterschied zu MRP1 bis 4, die den Folsäureantagonisten Methotrexat transportieren, hat MRP5 nur eine geringe Affinität zu dieser Substanz, höher ist sie jedoch für das Glucuronid von Methotrexat, welches kein Substrat für MRP1 bis 4 darstellt. Kürzlich wurde eine physiologische Funktion von MRP5 beschrieben: Es transportiert Hyaluronan, ein hochmolekulares Polysaccharid des Bindegewebes, vom Ort seiner Synthese, der Innenseite der Plasmamembran von Fibroblasten, in die extrazelluläre Matrix (Schulz et al., 2007). Über den Einfluss einer Überexpression von MRP5 in Zellkulturen auf deren Resistenz gegenüber den oben aufgeführten Zytostatika gibt es widersprüchliche Befunde (McAleer et al., 1999; Pratt et al., 2005; Wijnolds et al., 2000). Man geht bislang nicht davon aus, dass MRP5 für die Resistenz von Tumoren klinisch relevant ist (Borst et al., 2007). Bei Patienten mit medikamentenresistenter Epilepsie wurde jedoch eine, im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv, signifikant erhöhte Expression von MRP5 in der Blut-Hirnschranke gefunden (Dombrowski et al., 2001).

MRP 6

Die Aufklärung der Gewebeverteilung von MRP6 wurde vor allem auch im Rahmen der Erforschung der genetischen Ursache für die autosomal rezessiv vererbte degenerative Bindegewebserkrankung Pseudoxanthoma elasticum (PXE) vorangetrieben. Mutationen, die zum Verlust der Aktivität von MRP6 führen, werden heute als alleiniger Auslöser der PXE angesehen (Bergen et al., 2000). Bei dieser Erkrankung werden die elastischen Gewebe in Haut und Arterien, sowie die Retina, durch Auftreten mineralisierter, hypoelastischer Fasern geschädigt. Leber und Nieren weisen die höchste Expression von MRP6 auf, daneben sind geringe Mengen von MRP6 in vielen Geweben nachweisbar, auch in Lunge, Kolon, Haut, Retina und im Endothel der Arterien (Kool et al., 1999b). Ob die Erkrankung letztlich auf die mangelnde Elimination eines bisher unbekannten Metaboliten über Leber und Nieren, oder direkte Effekte in den betroffenen Geweben zurückzuführen ist, oder beides, ist noch Gegenstand der Forschung (Bergen et al., 2007). Bisher konnte ein Transport des zyklischen Peptids BQ-123, sowie verschiedener Glutathionkonjugate, jedoch nicht von Glucuroniden, gezeigt werden. Darüber hinaus führt Überexpression von MRP6 zu einer leicht erhöhten Resistenz von Zellkulturen gegenüber verschiedenen Epipodophyllotoxinen und Anthracyclinen (Belinsky et al., 2002). Überexpression von MRP6 in Tumoren tritt nicht häufig auf (Scheffer et a., 2002b).

MRP 7

MRP7-mRNA ist mittels PCR in allen Geweben nachweisbar, das Protein wird jedoch nur in geringer Menge exprimiert (Dean et al., 2001; Hopper et al., 2001; Kruh et al., 2007). Über mögliche physiologische Funktionen von MRP7 ist bisher nichts bekannt. MRP7 transportiert 17β-Estradiol-

17β-D-glucuronid und $LTC_4$, einige andere bekannte Substrate für MRP-Transporter, wie Methotrexat, Folsäure, cAMP oder cGMP jedoch nicht (Kruh et al., 2007). Überexpression von MRP7 in Zellkulturen steigert deren Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, wie Taxanen und Vinca-Alkaloinden (Chen et al., 2003; Hopper-Borge et al., 2004).

MRP 8

MRP8 (ABCC11) wird in vielen Geweben exprimiert, besonders hoch in Leber, Gehirn und Plazenta, gefolgt von Brust und Testes (Bera et al., 2001; Tammur et al., 2001; Yabuuchi et al., 2001). MRP8 hat ein breites Substratspektrum; es transportiert zyklische Nukleotide, Nukleosidanaloga, Folsäure, Methotrexat, sowie Produkte des Phase II-Metabolismus, etwa $LTC_4$, 17β-Estradiol-17β-D-glucuronid und Östron-3-sulfat (Chen et al., 2005; Kruh et al., 2007). Gesteigerte Expression von MRP8 und 9 wurde in Mammakarzinomen nachgewiesen (Bera et al., 2001; Bera et al., 2002).
MRP9 mRNA wurde es bisher in Gehirn, Brust, Ovarien, Hoden und Prostata nachgewiesen (Bera et al., 2002; Tammur et al., 2001; Yabuuchi et al., 2001). Bislang konnten keine Substrate für MRP9 beschrieben werden (Ono et al., 2007).

### 1.6 Der *Ubiquitously Expressed Mammalian ABC Half-Transporter* (UMAT)

Im Unterschied zu den oben beschriebenen MRP-Transportern stellt UMAT einen Halbtransporter dar, er wird auch als ABCB6, oder MTABC3 bezeichnet. Das Gen für UMAT liegt auf Chromosom 2q36, es kodiert für ein Protein mit der Länge von 836 Aminosäuren (Allikmets et al., 1996; Hirsch-Ernst et al., 1998; Mitsuhashi et al., 2000). In der Zelle ist UMAT in Lysosomen oder späten Endosomen lokalisiert (Jalil et al., 2008). Die Bezeichnung des Transporters ist auf sein Vorhandensein in allen untersuchten Geweben der Ratte zurückzuführen, wobei die Hoden eine besonders hohe Expression aufweisen (Hirsch-Ernst et al., 1998). Die ubiquitäre Expression von UMAT konnte auch an humanen Proben bestätigt werden (Mitsuhashi et al., 2000). In Camptothecin-resistenten A549 Zellen konnte eine Induktion von UMAT nachgewiesen werden (Yasui et al., 2004), ebenso während der durch Phenobarbital promovierten Hepatokarzinogenese bei der Ratte (Shibutani et al., 2002). Krishnamurthy und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ABCB6 die Aufnahme von Porphyrinen wie Häm, Protoporpyrin IX und Coproporphyrin III in die Mitochondrien vermittelt (Krishnamurthy et al., 2006). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung des Transporters an der Metall-Homöostase der Zellen postuliert, da seine Sequenz einen hohen Grad an Homologie zu der des *Fisson yeast heavy metal tolerance protein* (hmt1) aufweist, einem Transporter, der zur Schwermetallresistenz von *Schizosaccharomyces pombe* beiträgt (Ortiz et al., 1992). Diese Hypothese wird auch durch den Befund unterstützt, dass die Cu(II)-Toleranz einer humanen Kolonkarzinomzelllinie, die UMAT nicht exprimiert, durch Transformation mit dem rABCB6 der Ratte signifikant gesteigert wird (Jalil et al., 2008).

## 1.7 Übersicht der eingesetzten Metalle

**Tab. 2 Physikalisch-chemische Eigenschaften und Einstufungen der eingesetzten Metalle:**

| Element: | Atom-masse: | Dichte [g/cm$^3$]: | Oxidations-stufen: | Einstufung IARC: | Einstufung MAK: |
|---|---|---|---|---|---|
| As | 74,92 | 5,73 (metallisch)<br>1,97 (nicht metallisch)<br>4,7 - 5,1 (glasartig) | +5, +3, 0, -3 | 1 | 1 |
| Cd | 112,41 | 8,65 | +2, 0 | 1 | 1 |
| Co | 58,93 | 8,9 | -3, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5 | 2B | 2 |
| Cu | 63,55 | 8,94 | +3, +2, +1, 0 | - | - |
| Hg | 200,59 | 13,55 | +2, +1, 0 | 2B | 3B |
| Pb | 207,2 | 11,34 | +4, +2, 0 | Ø (Metall)<br>2A (Verb.) | 2 (Metall)<br>2 (Verb.) |

Ø : Keine Einstufung; - : keine Hinweise auf Kanzerogenität oder Mutagenität; Verb. : Verbindungen.

## 1.8 Arsen

Das Element Arsen gehört zu den Halbmetallen. Es kommt in verschiedenen allotropen Modifikationen vor. Die stabile Form ist das metallische Arsen, welches auch als graues Arsen bezeichnet wird, daneben existieren das nichtmetallische gelbe Arsen und das amorphe, glasartige schwarze Arsen. Neben der industriellen Anwendung als Legierungsbestandteil und bei der Glasherstellung, wird Arsen auch in Form der Zink-, Chrom- und Kupferarsenate als Holzschutzmittel eingesetzt (WHO, 2001). Darüber hinaus kommt es als Dotierungsmittel bei der Herstellung von Halbleitern zum Einsatz. Verbrennung von arsenbelasteter Kohle sowie Abbau und Verhüttung arsenhaltiger Erze führen zum Eintrag von Arsen in die Atmosphäre und damit zur inhalativen Belastung des Menschen (Mead, 2005).

Arsen ist auch im Zigarettenrauch enthalten (Rustemeier et al., 2002). In Argentinien, Bangladesh, China, Mexico, Vietnam, Kambodscha, Indien, Thailand, Nepal, Ghana und in einigen Staaten der USA ist das Trinkwasser geogen mit Arsen belastet. Man findet in diesen Regionen Arsengehalte zwischen 10 µg/l und mehr als 1 mg/l (IARC, 2004a; Mead, 2005). Nach den Richtlinien für Trinkwasserqualität der WHO soll Trinkwasser keine Arsengehalte über 10 µg/l aufweisen (WHO, 2001). Andere Lebensmittel sind im Allgemeinen eher gering mit Arsen belastet (<0,1 mg/kg), eine Ausnahme stellen hier maritime Lebensmittel dar: Meerestiere und Algen wandeln anorganische Arsenverbindungen in organische um und akkumulieren diese. In Meerestieren findet man Arsenobetain und Arsenocholin, in Algen Arsenzucker, letztere in Gehalten bis zu 117 mg/kg (LGL, 2006). Diese organischen Arsenverbindungen werden jedoch als toxikologisch wenig bedenklich angesehen, da sie im menschlichen Organismus kaum resorbiert und unverändert wieder

ausgeschieden werden. Wohingegen methylierte Arsenverbindungen eine hohe Bioverfügbarkeit besitzen. Auch gut wasserlösliche anorganische As(III)- oder As(V)-Verbindungen werden im Magen-Darm-Trakt schnell und in großem Umfang (55% - 95%) resorbiert (Schäfer et al., 2004b). Dies kann bei Aufnahme hoher Dosen zu Vergiftungen mit schockartigem Verlauf und Tod durch Kreislaufkollaps innerhalb weniger Stunden führen. Aufgrund der guten Korrelation zwischen der Arsenkonzentration in der Luft und im Urin von exponierten Arbeitern geht man auch bei inhalativer Exposition gegenüber anorganischen Arsenverbindungen von einer hohen Resorptionsrate aus (Pinto et al., 1976). Hinzu kommt, dass größere Partikel im oberen Atemtrakt deponiert werden und über mukoziliäre Reinigungsmechanismen in den Verdauungstrakt gelangen.

Anorganische Arsenverbindungen werden beim Menschen nach der Aufnahme sehr schnell im ganzen Körper verteilt, wobei sie sich zunächst in Leber, Nieren, Milz und Lunge anreichern. In der Folge findet eine Umverteilung und Speicherung in Haut, Haaren, Nägeln, Nebenhoden, Schilddrüse, Linsenkörper und im Skelett statt. Wobei Arsen an die Thiolgruppen des Keratins bindet. In Experimenten an Mrp2-defizienten Ratten konnte gezeigt werden, dass die Elimination von Arsenit über die Galle unter Beteiligung dieses Transporters statt findet (Dietrich et al., 2001). Darüber hinaus war im Tierversuch erkennbar, dass Arsenit einem enterohepatischen Kreislauf unterliegt, was auch für den Menschen postuliert wird. Im Organismus des Menschen werden anorganische Arsenverbindungen durch Reduktion und oxidative Methylierungen teilweise zu drei- und fünfwertigen Mono- und Dimethylarsenverbindungen umgesetzt. Hierbei fungieren S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor und Glutathion als Cofaktor. Da einige der am Metabolismus beteiligten Enzyme genetische Polymorphismen aufweisen, variiert das Muster der methylierten Arsenmetaboliten im Urin stark (Aposhian und Aposhian, 2006). Anorganische Arsenverbindungen, Monomethylarsonsäure oder Dimethylarsonsäure werden größtenteils über den Urin ausgeschieden (Buchet et al., 1981; Pomroy et al., 1980).

Nach Aufnahme anorganischer Arsenverbindungen stellt As(III) die toxische Wirkform dar. Aus Beobachtungen an exponierten Arbeitern an metallurgischen Arbeitsplätzen weiß man, dass nach akuter Exposition gegenüber $As_2O_3$ in Stäuben Reizungen an Augen, Haut, Nasenschleimhäuten und Kehlkopf auftreten, teilweise waren auch Bronchien und Ohrkanal betroffen. In schweren Fällen kommt es zu Lungenödemen. Bei Vergiftungen nach oraler Aufnahme von anorganischen Arsenverbindungen unterscheidet man zwei Verläufe, die dosisabhängig auftreten: Das paralytische Syndrom, welches nach Ingestion sehr hoher Dosen (> 2 mg/kg KG) auftritt ist durch akute Störungen des Herz-Kreislaufsystems und des ZNS gekennzeichnet, die durch Kreislaufkollaps, Schock und Atemlähmung nach wenigen Stunden zum Tod führen können. Das gastrointestinale Syndrom nach Aufnahme geringerer Dosen wird durch Lähmung der Kapillargefäße im Gastrointestinaltrakt verursacht, Symptome sind Erbrechen, Durchfall und Magen-Darm-Krämpfe. Darüber hinaus kommt es zum Blutdruckabfall, Herzrhythmusstörungen, Muskelkrämpfen sowie zu Funktionsstörungen der Nieren, weiterer Organe und Kollaps (GESTIS, 2004; Kosnett, 2006a).

Chronische Inhalation anorganischer Arsenverbindungen führt zu Bindehautentzündungen, Entzündungen der oberen Atemwege mit Nasenseptumperforationen, Schnupfen, Rachenkatarrh,

Kehlkopfentzündungen und Tracheobronchitis. Daneben treten Hautveränderungen wie Hyperkeratosen und Melanosen („Arsenmelanose“) auf. In Fällen chronischer Vergiftungen durch mit anorganischen Arsenverbindungen kontaminierte Lebensmittel, wie Trinkwasser, Milchpulver oder Sojasoße, traten ebenfalls die arsentypischen Hautveränderungen auf, daneben kommt es zu peripheren Gefäßerkrankungen, teilweise Gewebsnekrosen an den Extremitäten, Atherosklerose, Bluthochdruck, Anämie, Nieren- und Leberschäden, darüber hinaus gibt es deutliche Hinweise auf eine erhöhte Inzidenz von Diabetes, chronischen Lungenerkrankungen und Polyneuropathien (GESTIS, 2004; Lantz und Hays, 2006; Mead, 2005;).

Arsen und anorganische Arsenverbindungen wurden von der MAK-Kommission als krebserzeugend (Kategorie 1) und keimzellmutagen (Kategorie 3A) eingestuft (DFG, 2007). Auch die IARC hat diese Substanzen als kanzerogen eingestuft (Gruppe 1) (IARC, 2004a). Epidemiologische Studien belegen die Entstehung von Tumoren in Blase, Lunge, Niere und Haut, über Tumoren in Leber und Prostata gibt es widersprüchliche Befunde (IARC, 2004a). Die MAK-Kommission hat vor, das kanzerogene Potenzial organischer Arsenverbindungen zu überprüfen (DFG, 2007). Die duldbare tägliche Aufnahmemenge für anorganische Arsenverbindungen liegt bei 2 µg/kg KG (WHO, 1983).

Die kanzerogene Wirkung von Arsenverbindungen beruht nicht auf direkter Gentoxizität. Vielmehr wirken sie als Promotoren, indem sie oxidativen Stress verursachen, die Reparatur von DNA-Schäden behindern und das Methylierungsmuster der DNA verändern (Schwerdtle et al., 2003; Lantz und Hays, 2006; Schoen et al., 2004).

### 1.9 Blei

Das Metall Blei tritt in seinen Verbindungen in den Oxidationsstufen +2 und +4 auf. Organische Bleiverbindungen leiten sich meist vom Pb(IV) ab. Blei wird heute hauptsächlich noch zur Herstellung von Akkumulatoren und Batterien verwendet, darüber hinaus in der chemischen Industrie, vor allem zur Herstellung von Farbpigmenten (z.B. Bleiweiß, Mennige). Weiterhin werden Lager, Kabelummantelungen, Strahlenschutzplatten sowie Behälter und Rohre für aggressive Flüssigkeiten aus Blei gefertigt. Obwohl Blei auch durch Vulkane, Waldbrände und radioaktiven Zerfall von Radon freigesetzt wird, ist der Hauptanteil des Bleis in der Luft auf anthropogene Freisetzung etwa durch die Gewinnung, Aufbereitung und Verarbeitung von Blei, sowie die Verbrennung von kommunalen und Klinikabfällen zurückzuführen.

Annähernd der gesamte Anteil des Bleis in der Luft ist an Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser unter 1 µm gebunden und damit alveolargängig (IARC, 2006b). In Erfurt wurde im Zeitraum zwischen September 1997 und Dezember 1998 in der Luft eine durchschnittliche Bleikonzentration von 16,8 ng/m$^3$ gemessen (Cyrys et al., 2003). In der Nähe von Bleihütten können Konzentrationen über 120 µg/m$^3$ auftreten (IARC, 2006b). Hengstler et al. fanden in einer Studie in Hessen an Arbeitsplätzen in Galvanisierbetrieben und beim Recycling von Elektrogeräten Bleigehalte in der Luft bis 125 µg/m$^3$ (Hengstler et al., 2003a).

Nach Inhalation von Aerosolen anorganischer Bleiverbindungen oder von Bleistaub, lagern sich 30 bis 50% der Partikel mit einem Durchmesser unter 1 µm in den Alveolen ab und werden von dort schnell und annähernd quantitativ resorbiert und nicht akkumuliert (GESTIS, 1999; IARC, 2006b). Nach oraler Aufnahme werden Blei und seine anorganischen Verbindungen hauptsächlich im Duodenum resorbiert. Die Hauptexpositionsquelle für die nicht beruflich exponierte Allgemeinbevölkerung stellen Lebensmittel dar. Beispielsweise Fische und Meeresfrüchte, sowie Gemüse mit großer Blattoberfläche. Durch die WHO wurde für Blei eine vorläufig duldbare wöchentliche Aufnahme (PTWI) von 25 µg/kg KG festgelegt (FAO/WHO, 1993). Rauchen führt ebenfalls zu einer Mehrbelastung mit Blei (IARC, 2004b; 2006b).

Im Blut ist Blei zu über 95% an die Erythrozyten gebunden und wird so im Körper verteilt, wobei es auch die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta überwindet. Es wird zunächst in den Weichgeweben, vor allem in Leber und Nieren, angereichert, wo es eine Halbwertszeit von ca. 20 Tagen besitzt. Anschließend wird es teilweise ausgeschieden oder als schwerlösliches Bleiphosphat im Skelett eingelagert, wo es eine Halbwertszeit von 10-20 Jahren hat. Resorbiertes Blei wird zu 75 bis 80% mit dem Urin eliminiert, 12 bis 17% werden über Galle und Darmwand mit den Faeces und weniger als 8% über Schweiß, Haare und Nägel ausgeschieden (GESTIS, 1999).

Chronische oder sub-chronische Bleivergiftungen schädigen vor allem das blutbildende System, das periphere und zentrale Nervensystem, den Gastrointestinaltrakt und die Nieren. Eine Schädigung des blutbildenden Systems manifestiert sich in Anämien oder basophil getüpfelten Erythroblasten (GESTIS, 1999; Kosnett, 2006b). Aufgrund der Hemmung des an der Hämoglobinsynthese beteiligten Enzyms δ-Aminolaevulinsäure-Dehydratase (ALAD) durch Blei wird weniger Häm gebildet, dadurch kommt es zu einer Aktivierung der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase (ALAS) was zu erhöhten Konzentrationen an δ-Aminolaevulinsäure in Blut und Urin führt und daher als Indikator für eine Bleiexposition, zumindest bei beruflich exponierten Personen, verwendet werden kann. Zur Beurteilung der Exposition von Kindern ist dieser Parameter jedoch nicht empfindlich genug (IARC, 2006b). Eine epidemiologische Studie an hoch exponierten Arbeitern zeigte eine signifikant erhöhte Inzidenz von Nierentumoren. Eine andere Studie beschrieb eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen dem Bleigehalt im Blut und dem Risiko ein Gliom zu entwickeln. Insgesamt umfassten diese Studien aber nur eine geringe Anzahl von tumorbedingten Todesfällen, was ihre Aussagekraft schmälert (IARC, 2006b). Die IARC stuft anorganische Bleiverbindungen als wahrscheinlich krebserzeugend beim Menschen (Gruppe 2A) und organische Bleiverbindungen als nicht klassifizierbar ein (IARC, 2006b). Die MAK-Kommission bewertet anorganische Bleiverbindungen außer Bleiarsenat und Bleichromat als krebserzeugend für den Menschen (Kategorie 2) und keimzellmutagen (Kategorie 3A) (DFG, 2007).

Der Mechanismus der Kanzerogenität anorganischer Bleiverbindungen ist noch nicht aufgeklärt, man geht aber davon aus, dass sie indirekt wirken - etwa durch Induktion von oxidativem Stress und Hemmung der DNA-Reparatur. Außerdem liegen die Radien von Pb(II)-Ionen mit 1,19 Å und 1,29 Å in hexagonal oder octagonal koordinierter Form ausreichend nah am Radius des Ca(II)-Ions und können daher calciumabhängige physiologische Prozesse stören (Beyersmann und Hartwig, 2008).

Lösliche anorganische Bleiverbindungen wirken in Säugerzellkulturen gentoxisch; sie führten unter anderem zu Strangbrüchen in der DNA und induzierten die Bildung von Mikrokernen. Auch in Tierexperimenten wurden gentoxische Effekte von anorganischen Bleiverbindungen nachgewiesen. Hier wurde ebenfalls das Auftreten von DNA-Strangbrüchen und Mikrokernen, sowie von Chromosomenaberrationen und Aneuploidien beschrieben (IARC, 2006b). Diese gentoxischen Effekte könnten auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen sein, die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten *in-vivo* durch Blei wird als Argument für diese Hypothese angeführt. Grund für die Entstehung von ROS durch Blei könnten gesteigerte Mengen von δ-Aminolaevulinsäure in den Zellen, oder die Verminderung des Gehalts an zellulären Antioxidantien wie Glutathion aufgrund der großen Affinität des Bleis zu SH-Gruppen sein. Daneben wird die Bildung von ROS durch einen der Fenton-Reaktion ähnlichen Mechanismus diskutiert (IARC, 2006b). Als weitere Komponente der kanzerogenen Wirkung von Blei wird die Hemmung wichtiger DNA-Reparaturmechanismen, nämlich der basenersetzenden- und der nukleotidersetzenden Reparatur, angesehen. Diese Befunde werden durch Experimente gestützt, in denen anorganische Pb-Verbindungen die Mutagenität von UVC-Strahlung und N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin verstärkten (IARC, 2006b). Ein weiterer für die Kanzerogenität des Bleis relevanter Effekt scheint die Deregulation des Zellwachstums zu sein. Bereits in geringen Konzentrationen führen anorganische Bleiverbindungen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und damit zu einer erhöhten Proliferation der Zellen (IARC, 2006b).

### 1.10 Cadmium

Industriell wird Cadmium heute vor allem noch in Ni/Cd-Akkumulatoren genutzt, darüber hinaus findet es Verwendung in Legierungen und als Korrosionsschutz für Metalle, sowie bei der Herstellung von Polymerisationskatalysatoren, photovoltaischen Elementen, Radar- und Röntgenschirmen. Früher wurden cadmiumhaltige Pigmente in Druck- und Lederfarben, Lacken, Kunststoffen und Gummi eingesetzt, in der EU ist die Verwendung dieser Pigmente jedoch seit Mitte 1991 mit wenigen Ausnahmen verboten (Hartwig, 2005a). In Städten wurden Cadmiumgehalte in der Luft von 1-3 ng/m$^3$ gemessen, in stark industrialisierten Gebieten 10-60 ng/m$^3$ (WHO, 2004). Man schätzt, dass diese Hintergrundbelastung bei nicht beruflich exponierten Nichtrauchern zu einer inhalativen Aufnahme von maximal 0,8 µg pro Tag führt (JECFA, 1989), was deutlich geringer ist als die mit der Nahrung aufgenommene Menge von 24 bis 36 µg pro Tag (JECFA, 2003b).

Deposition von Cadmium aus der Luft sowie Anwendung von mit Cd kontaminierten Düngemitteln, führen zu einer Belastung von Böden und pflanzlichen Lebensmitteln sowie von Tieren, die auf diesen Flächen weiden. Rauchen (20 Zigaretten pro Tag) verdoppelt die aufgenommene Menge an Cadmium und stellt damit eine weitere Hauptexpositionsquelle dar (BfR, 2006). Beschäftigte in der Gewinnung und Raffination von Cadmium, der Herstellung von Ni/Cd-Akkumulatoren, Cd-Legierungen oder Pigmenten auf Cadmiumbasis, können noch deutlich höheren Konzentrationen ausgesetzt sein, hier wurden Cadmium-Gehalte in der Luft über 1 mg/m$^3$ gemessen (IARC, 1993a).

Die inhalative Bioverfügbarkeit liegt bei Aerosolen von cadmiumhaltigen Partikeln zwischen 30 und 60% (Hartwig, 2005a). Nach oraler Aufnahme hingegen werden, abhängig von der Wasserlöslichkeit der Verbindung, im Normalfall nur 3-7% des Cadmiums resorbiert, bei Eisenmangel jedoch kann die Cadmiumresorption auf 15-20% ansteigen (WHO, 2004). Der genaue Mechanismus der gastrointestinalen Resorption des Cd ist noch nicht aufgeklärt, eine Beteiligung zweier beim Säuger für die Eisenaufnahme verantwortlicher Transporter, dem *Divalent Metal Transporter* DMT1 und dem *Metal Transporter Protein* MTP1, wird postuliert. Vierwöchige Eisenmangelernährung führte bei Mäusen zu einer signifikanten Induktion von DMT1 und MTP1, vor allem im Duodenum. Nach einer einmaligen Gabe von $^{109}$Cd nach dieser Zeit wiesen die eisendefizienten Tiere eine 2,8-fach höhere Gesamtkörperlast an Cadmium auf (Kim et al., 2007). DMT1 und MTP1 werden auch in der Lunge exprimiert.

Im Blut wird Cadmium vor allem an Albumin und $\alpha_2$-Makroglobuline gebunden und gelangt so in die Leber, wo es an Metallothionein (MT) bindet und dessen Synthese induziert. Dieser Cadmium-Metallothionein-Komplex wird wieder ins Blut abgegeben, in den Nieren glomerulär in den Primärharn filtriert, jedoch in den proximalen Tubuluszellen rückresorbiert. In den proximalen Tubuli wird Cd(II) durch Abbau des Cd-MT-Komplexes freigesetzt. Die Cd(II)-Ionen induzieren die Neubildung von MT in den Tubuli, so dass Cd auch in der Niere an MT gebunden vorliegt und hier akkumuliert. Freie Cd(II)-Ionen, die nach Erschöpfung der MT-Synthesekapazität auftreten, werden für die bei Cadmiumvergiftungen auftretenden Nierenschäden verantwortlich gemacht. 50% der Gesamtkörperlast an Cd sind in den Nieren und 15% in der Leber gespeichert (Hartwig, 2005a). Resorbiertes Cd wird ausschließlich über den Urin eliminiert, jedoch täglich nur etwa 0,007% der Körperlast. Dies führt zu einer Eliminationshalbwertzeit des Cadmiums aus dem Gewebe von 10 bis 35 Jahren (WHO, 2004).

Akute inhalative Exposition gegenüber hohen Cd-Konzentrationen führt zu Husten, Kopfschmerzen und Fieber, in schweren Fällen kann es auch zu Lungenödemen oder Pneumonien kommen (Israel, 2006; Kelleher et al., 2000). Nach oraler Aufnahme dominieren Schock oder akutes Nierenversagen (Israel, 2006). Symptome chronischer Inhalation von Cd sind Verlust des Riechsinns, chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen, Nierenschäden sowie im fortgeschrittenen Stadium Knochenmarkschädigungen (Hartwig, 2005a; IARC, 1993b). Bei chronischen Intoxikationen mit Cadmium ist die Niere das empfindlichste Organ, tubuläre Schädigungen manifestieren sich in einem erhöhten Anteil an Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht im Urin (WHO, 2004). Daneben treten bei chronischen oralen Vergiftungen mit Cadmium schwere Osteomalazien und Osteoporosen, Eisenmangelanämie, sowie Störungen der intestinalen Resorption und des Leberstoffwechsels auf (Hartwig, 2005a; WHO, 2004). Diese Symptome wurden erstmals im Rahmen einer Massenvergiftung in Japan durch mit Cadmium kontaminiertes Trinkwasser und Reis beobachtet und als Itai-Itai-Krankheit beschrieben.

Nach Modellrechnungen führen Cadmium-Konzentration über 200 mg/kg in der Nierenrinde bei 10 % der Allgemeinbevölkerung zum Auftreten von Nierenschäden (JECFA, 1989). Die erwähnte kritische Konzentration kann bei beruflich exponierten Personen, starken Rauchern und Menschen, die

regelmäßig Lebensmittel mit hoher Cadmiumbelastung zu sich nehmen, erreicht oder überschritten werden. Darüber hinaus trägt Cadmium zum kanzerogenen Potenzial des Rauchens bei (IARC, 2004b). Die IARC stuft Cadmium und seine Salze als krebserzeugend beim Menschen ein (Gruppe 1) (IARC, 1993b; IARC, 2004a). Auch die MAK-Kommission stuft Cadmium und seine anorganischen Verbindungen in einatembarer Form als beim Menschen krebserzeugend (Kategorie 1) und keimzellmutagen (Kategorie 3A) ein (DFG, 2005).

Die krebserzeugende Wirkung des Cadmiums wird nach Beyersmann und Hartwig auf mehrere Mechanismen zurückgeführt (Beyersmann und Hartwig, 2008): Die Induktion von oxidativem Stress durch Inhibierung antioxidativ wirksamer Enzyme wie Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Reduktase und Glutathion-Peroxidase. Hemmung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen wie der basenersetzenden Reparatur und der nukleotidersetzenden Reparatur, sowie der Enzyme zur Reparatur von Basenfehlpaarungen und oxidativen DNA-Schäden. Dies geschieht beispielsweise durch Verdrängung von Zn(II) aus den Zink-Finger-Strukturen DNA-bindender Proteine. Zusätzlich führt Cadmium zu einer Deregulation des Zellzyklus durch direkte Stimulation von mitogenen Signalen und Hemmung negativer Kontrollmechanismen des Zellzyklus, etwa durch Inaktivierung von p53. Cd(II) dereguliert das Zellwachstum weiterhin durch Störung der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation durch Verdrängung von Ca(II) aus E-Cadherin (Prozialeck und Lamar, 1999). Darüber hinaus wirkt Cadmium auch epigenetisch, durch Induktion von DNA-Hypomethylierung (Takiguchi et al., 2003). Eine Bewertung der Beiträge der einzelnen Effekte zur Kanzerogenität des Cadmiums ist jedoch noch nicht möglich (Beyersmann und Hartwig, 2008).

## 1.11 Cobalt

Das Element Cobalt bildet zusammen mit Nickel und Eisen im Periodensystem die Gruppe der Eisen-Metalle. Es ist härter und fester als Stahl. Cobalt bildet mit vielen Elementen Legierungen, darunter Molybdän, Wolfram, Chrom und Platin. In Verbindungen sind die wichtigsten Oxidationsstufen des Cobalt +2 und +3, wobei in den einfachen Verbindungen die zweiwertige Oxidationsstufe wesentlich beständiger ist als die dreiwertige. In Gegenwart von Komplexbildnern jedoch wird Co(II) leicht zu Co(III) oxidiert. Die wichtigsten Cobalterze sind Cobaltin (CoAsS), Skutterudit ($CoAs_3$) und Erythrin ($Co_3(AsO_4)_2 \cdot 8\ H_2O$). Auch der Arsengehalt dieser Erze birgt eine gesundheitliche Gefahr für die Beschäftigten in der Verhüttung der genannten Minerale und erschwert zudem auch die medizinische Beurteilung der Folgen einer Cobaltexposition an diesen Arbeitsplätzen.

Cobalt wird verwendet zur Herstellung von hochwarmfesten Hart- und Schneidmetallen und zur Bindung von Wolframcarbid für Schneidwerkzeuge. Darüber hinaus in Katalysatoren für die chemische Industrie und zur Herstellung von Pigmenten für Porzellan und Keramik, sowie zum Färben von Glas. Als Zentralatom des Vitamin $B_{12}$ (Cyanocobalamin) ist Cobalt für den Menschen essentiell. Vitamin $B_{12}$ ist beispielsweise an der enzymatischen Umlagerung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA sowie an der Reduktion von Ribonucleosid-triphosphaten zu 2′-Desoxyribonucleosidtriphosphaten beteiligt. Vitamin $B_{12}$ wird unter Beteiligung des Glykoproteins

*intrinsic factor* durch einen aktiven Mechanismus resorbiert und hauptsächlich in der Leber gespeichert (Belitz und Grosch, 1992). Die Aufnahme von Vitamin $B_{12}$ kann nicht durch andere Cobaltverbindungen substituiert werden.

Vulkane und die Verwendung fossiler Brennstoffe führen zu einer Freisetzung von Cobalt in die Luft, deren Gehalt an Cobalt in Städten normalerweise im Bereich von 1 ng/m$^3$ liegt (Cyrys et al., 2003; Hamilton, 1994). Daneben können Teile der Bevölkerung durch Freisetzung aus Implantaten wie Gelenksprothesen und Zahnersatz gegenüber geringen Mengen an Cobalt exponiert werden (IARC, 2006a). Zu einer deutlich höheren Belastung mit elementarem Cobalt und seinen Verbindungen kann es an einigen Arbeitsplätzen kommen. Hier wurden beispielsweise in einer Fabrik zur Aufbereitung von Cobalterzen in der Luft Konzentrationen bis zu 9,9 mg/m$^3$ gemessen, bei der Herstellung von Werkzeugen aus Hartmetall traten noch Cobaltgehalte bis zu 367 µg/m$^3$ in der Luft auf (IARC, 2006a). In Elektrogeräte-Recyclingbetrieben in Hessen wurden von Hengstler et al. Werte zwischen 0 und 10 µg/m$^3$ gemessen (Hengstler et al., 2003a).

Cobalt oder seine Verbindungen sind Atemwegs-Allergene, bei sensibilisierten Personen können nach erneutem Kontakt neben bronchialen Sofortreaktionen auch isolierte Spätreaktionen oder duale Reaktionen auftreten (IARC, 2006a). Die akute orale Toxizität löslicher Cobaltsalze ist nicht sehr hoch. Nach einem Fallbericht führte orale Einnahme von 500 mg $CoCl_2$ beim Menschen zu Erbrechen, Durchfall, Hitzegefühl und leichtem Kollaps (GESTIS, 2003b). Schäden durch chronische Exposition gegenüber Cobalt oder seinen Salzen wurden vor allem bei inhalativ exponierten Arbeitern, die in der Metallgewinnung, der Hartmetallverarbeitung oder der Herstellung von Pigmenten beschäftigt waren, beschrieben. Das Hauptzielorgan ist hier der Atemtrakt. Eine unspezifische Reizung der Schleimhäute kann zu Entzündungen in den oberen und unteren Atemwegen führen. Darüber hinaus kann es jedoch auch zur Entstehung von Bronchialasthma und einer fibrosierenden Alveolitis kommen. Diese tritt meist nach Exposition gegenüber Wolframcarbid-haltigen Hartmetallstäuben auf und wird auch als Hartmetall-Lunge oder *Hard-Metal Disease* bezeichnet. Dabei kann es durch Einschränkung der Lungenfunktion und eine daraus resultierende Herzschädigung zu einem tödlichen Krankheitsverlauf kommen. Jedoch entwickelt nur ein geringer Anteil der exponierten Arbeiter eine Fibrose, daher nimmt man an, dass es signifikante Unterschiede in der individuellen Empfindlichkeit gibt (GESTIS, 2003a; b; IARC, 2006a). Mitte der sechziger Jahre kam es in Canada, den USA und Belgien zu Vergiftungen infolge chronischer oraler Aufnahme von Cobaltsalzen durch ihre Anwendung zur Schaumstabilisierung bei Bier, hier traten schwere Herzmuskelschäden auf (Hartwig, 2005b).

Metallisches Cobalt und seine löslichen Salze werden von der IARC als beim Menschen möglicherweise krebserzeugend angesehen (Gruppe 2B), die MAK-Kommission sieht diese Substanzen als krebserzeugend für den Menschen an (Kategorie 2) (DFG, 2007; IARC, 2006a). Bei Arbeitern in der Hartmetallverarbeitung konnte in einigen epidemiologischen Studien eine erhöhte Inzidenz von Lungentumoren gezeigt werden, jedoch sind auch hier weitere Studien nötig (IARC, 2006a). Die IARC stuft Hartmetallstaub mit Cobalt und Wolframcarbid als beim Menschen wahrscheinlich krebserzeugend ein (Gruppe 2A) (IARC, 2006a). Die MAK-Kommission bewertet die einatembare Fraktion dieses Staubs als beim Menschen krebserzeugend (Kategorie 1) (DFG, 2007).

Wasserlösliche Cobaltsalze beeinträchtigten in Experimenten an Mäusen und Ratten deren Fortpflanzungsfähigkeit (BAuA, 2001; IARC, 2006a), sie sind auch als keimzellmutagen (Kategorie 3A) eingestuft (DFG, 2007).

Man geht davon aus, dass auch bei Exposition gegenüber elementarem Cobalt, aufgrund der guten Löslichkeit dieses Metalls in biologischen Flüssigkeiten, Co-Ionen das eigentliche toxische Agens darstellen (BAuA, 2001; GESTIS, 2003; IARC, 2006a). Co(II) führt über einen der Fenton-Reaktion ähnlichen Mechanismus zur Bildung von Hydroxylradikalen aus H2O2, dieser Effekt wird durch Wolframcarbidpartikel noch verstärkt (Lison et al., 1995). Darüber hinaus beeinträchtigt Co(II) die Reparatur von DNA-Schäden: In-vitro wurde eine Hemmung der nukleotidersetzenden Reparatur gezeigt (Kasten et al., 1997). Dies geschieht durch Substitution des Zn(II) aus der Zinkfingerdomäne des an der nukleotidersetzenden Reparatur beteiligten Xeroderma Pigmentosum Group A (XPA) Proteins durch Co(II) (Asmuss et al., 2000; Beyersmann und Hartwig, 2008; Kopera et al., 2004). Co(II)-Ionen gleichen in Ladung und Ionenradius (0,76 Å) den Zn(II)-Ionen, darüber hinaus besitzen sie auch Affinität zu denselben Liganden: Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel. Dies ermöglicht eine Verdrängung von Zn(II) durch Co(II) (Beyersmann und Hartwig, 2008). Co(II) führt weiterhin durch Stabilisierung des Hypoxia-inducible factor HIF-1α zu hypoxie-ähnlichen Zuständen in-vitro und in-vivo. Dies ist insofern relevant als im Inneren eines Tumors häufig hypoxische Zustände herrschen und das Tumorwachstum durch eine Aktivierung von HIF-1α unterstützt wird, da diese zu einer Erhöhung der Glykolyserate führt und die Angiogenese fördert (Beyersmann und Hartwig, 2008).

### 1.12 Kupfer

Das Halbedelmetall Kupfer wird zu den Übergangsmetallen gezählt. Industriell wird der größte Teil des durch Erzabbau u.a. in Chile, den USA und der GUS sowie durch Recycling gewonnenen Kupfers zur Herstellung von Kabeln und elektrischen Bauteilen verwendet. Daneben findet es als Material für Rohre und als Legierungsbestandteil etwa für Bronze und Messing Verwendung. Cu(II)-Salze werden zur Imprägnierung von Holz und als Pflanzenschutzmittel, vor allem im Weinbau, eingesetzt.

Durch die mit der Nahrung aufgenommene Menge von 1,8 bis 2,3 mg Kupfer täglich sind Erwachsene in Deutschland ausreichend versorgt (BfR, 2004; NVS, 1994). Darüber hinaus ist der Mensch in der Nähe von Betrieben der Metallgewinnung, sowie in Städten einer inhalativen Belastung mit Kupfer ausgesetzt. In Städten führt der Abrieb von Reifen und Bremsbelägen zur Freisetzung von Kupfer und Zink in Form von Staub. Cyrys et al. zeigten in einer Studie, dass der Gehalt von Kupfer und Zink in den alveolargängigen luftgetragenen Partikeln der Größenfraktion zwischen 0,05 und 1,62 µm gut mit dem Verkehrsaufkommen korreliert (Cyrys et al., 2003). In dieser Studie wurde für den Zeitraum zwischen September 1997 und Dezember 1998 ein Tagesmittelwert an Kupfer von 2,7 ng/m$^3$ in der Luft der Stadt Erfurt ermittelt. Über die inhalative Bioverfügbarkeit von Cu(II) gibt es weder Daten vom Menschen noch aus Tierexperimenten. Man geht von einer partiellen Resorption aus, da es nach chronischer inhalativer Exposition gegenüber Cu(II)-Lösungen neben den als „Weinspritzerlunge“ beschriebenen Lungenschäden auch zu systemischen Wirkungen wie Leberschäden kam.

Allerdings gibt es keine Informationen darüber wie groß der Anteil des Cu(II) ist, der über den mukoziliären Reinigungsweg in den Verdauungstrakt gelangt und erst dort resorbiert wird. Die Aufnahme von Kupfer aus der Nahrung findet vorwiegend im Magen und dem oberen Dünndarm statt, dabei ist die Resorptionsrate homöostatisch reguliert und liegt zwischen 35 und 70%, sie wird jedoch auch von der Zusammensetzung der Nahrung beeinflusst (BfR, 2004).

Kupfer ist für den Menschen, Höhere Tiere und zahlreiche Pflanzen ein essentielles Spurenelement und kommt in biologischen Systemen in ein- und zweiwertiger Form vor und ist daher an Elektronenübertragungsreaktionen beteiligt. Es ist Cofaktor einer großen Zahl von Enzymen, die häufig zur Klasse der Oxidasen oder Hydroxylasen gehören, beispielsweise die Cytochrom-C-Oxidase, die Cu/Zn-Superoxiddismutase oder die Tyrosinase (Löffler und Petrides, 2003). Kupfer ist jedoch auch ein toxisches Metall, weil Cu-Ionen über die Fenton-Reaktion zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beitragen können. Freie Kupferionen treten normalerweise nicht im Organismus auf, sie sind vielmehr an Proteine wie Caeruloplasmin, Albumin, Metallothioneine oder Metallochaperone gebunden, oder an Peptide wie Glutathion, sowie an Aminosäuren (z.B. Histidin). Um sowohl eine ausreichende Versorgung sicherzustellen als auch die Akkumulation toxischer Mengen zu vermeiden, unterliegt Kupfer im Organismus einer strikten homöostatischen Kontrolle.

Die homöostatische Regulierung des Kupferbestandes im Körper erfolgt zum einen über die intestinale Resorptionsrate und zum andern über eine Anpassung der biliären Eliminationsrate (BfR, 2004). Eine Unterversorgung mit Kupfer kann sich in Störungen des Blutbildes, wie Granulozytopenie und Neutropenie manifestieren, darüber hinaus in Osteoporose, spontanen Gefäßrupturen und Aneurismen, hypochromer Anämie und verminderter Pigmentierung von Haut und Haaren. Daneben kommt es zu einer erhöhten Anfälligkeit für Atemwegserkrankungen. Im fortgeschrittenen Stadium treten neurologische Störungen auf (BfR, 2004). Trotz der vielfältigen Anwendungen von Kupfer und seinen Salzen sind sowohl akute als auch chronische Vergiftungen selten (Kelleher et al., 2000).

Akute Exposition gegenüber Dämpfen oder Staub von metallischem Kupfer reizt die Augen und die Schleimhäute der oberen Atemwege, was bei hohen Konzentrationen zu schwerem Husten, Atemnot, Fieber (sog. Metallfieber oder Gießerfieber), Leukozytose und Lungeninfiltration führen kann (Buchwald, 2006; Kelleher et al., 2000). Die Inhalation des Aerosols einer 1-2%-igen, mit Calciumcarbonat neutralisierten, Lösung von $CuSO_4$ in Wasser, wie sie vor allem im Weinbau zum Einsatz kommt (Bordeaux-Mischung), soll bei den nicht näher quantifizierten Aerosolkonzentrationen einer üblichen Anwendung keine akuten Gesundheitsstörungen verursachen, diese treten erst nach häufigerer Exposition auf (GESTIS, 2004b). Durch Ingestion von kontaminierten Lebensmitteln aus Kupfergefäßen oder von stark mit Kupfer belastetem Trinkwasser kann es zu akuten Vergiftungen kommen. Hierbei treten bereits kurz nach der Aufnahme Erbrechen und Durchfall auf. Im weiteren Verlauf kann es zu gastrointestinalen Blutungen und im Zuge des Blut- und Flüssigkeitsverlusts zu Nierenfunktionsstörungen, Blutdruckabfall und Tachykardie kommen. Darüber hinaus können hohe Dosen Cu(II) über 200 mg/kg KG durch Verursachung zentrilobulärer Nekrosen zu einer Hepatitis führen (Buchwald, 2006; GESTIS, 2004b). Bei überhöhter chronischer Aufnahme von Cu(II) wird die biliäre Exkretion deutlich gesteigert, Vergiftungserscheinungen treten erst auf, wenn die

Eliminationskapazität der Leber überschritten wird. Kleinkinder sind hier eher gefährdet als Erwachsene, da sich dieser Exkretionsmechanismus erst im Laufe der ersten Lebensjahre voll entwickelt. In der Leber wird Kupfer an Metallothionein komplexiert gespeichert, sie ist auch Zielorgan der chronischen Toxizität dieses Metalls. Es kann zu Leberparenchymschädigung, Hepatitis, Leberzirrhose und einer hämolytischen Krise kommen (BfR, 2004). Die toxischen Effekte des Kupfers sind auf freie Kupferionen zurückzuführen, die über die Fenton-Reaktion zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen, welche Zellen und Organe schädigen. Bisher liegen keine Hinweise für eine teratogene, mutagene oder kanzerogene Wirkung von Kupfer vor. Der MAK-Wert für Kupfer und seine anorganischen Verbindungen liegt bei 0,1 mg/m$^3$ (DFG, 2007).

### 1.13 Quecksilber

Elementares Quecksilber ist das einzige bei 20°C flüssige Metall. Sein Schmelzpunkt liegt bei -38,87°C, es siedet bei 357,25°C, bereits bei 20°C weist es einen erheblichen Dampfdruck von 0,170 Pa auf. Neben der elementaren Form bildet Hg ein- und zweiwertige Salze, darüber hinaus gibt es organische Quecksilberverbindungen. Bei letzteren stellt Methylquecksilber ($MeHg^+$) den aus toxikologischer Sicht relevantesten Vertreter dar. Aufgrund seines lipophilen Charakters wird Methylquecksilber von Lebewesen leicht aufgenommen und akkumuliert beim Durchlaufen der Nahrungskette vom Phytoplankton über das Zooplankton bis hin zu Fischen und Vögeln. Der Schlüsselschritt zum Eintritt von Hg in die marine Nahrungskette ist die Bildung von Methylquecksilber aus Hg(II) durch sulfatreduzierende Bakterien in Wasser und Sediment. Das bekannteste Beispiel für eine Massenvergiftung durch mit $MeHg^+$ kontaminierten Fisch ereignete sich in der Umgebung der Minamata-Bucht in Japan zwischen 1960 und 1975.

Die häufigsten Fälle einer Belastung mit elementarem Quecksilber in biologisch relevanten Mengen sind auf berufliche Exposition zurückzuführen. So sind etwa Beschäftigte in Betrieben der Chloralkali-Elektrolyse und in der Lampenherstellung teilweise gegenüber deutlich höheren Konzentrationen exponiert als die Normalbevölkerung (WHO, 2003). In diesem Zusammenhang ist vor allem die Inhalation von elementarem Quecksilber als Dampf relevant, da hier mehr als 80% des eingeatmeten $Hg^0$ resorbiert werden. Wiederum 80% dieser Menge gehen sofort in das Blut über, der Rest wird im Lungengewebe zurückgehalten (Guzzi und La Porta, 2008). Über den Magen-Darm-Trakt wird metallisches Hg nur in sehr geringem Umfang resorbiert (0,01%) (WHO, 2003). Die intestinale Resorption der schwerlöslichen Hg(I)-Salze ist ebenfalls gering, wohingegen Hg(II) über diesen Pfad zu 10-15% aufgenommen wird. Über die inhalative Bioverfügbarkeit anorganischer Hg-Verbindungen gibt es keine quantitativen Angaben, sie wird allgemein als gering angesehen und sowohl vom Partikeldurchmesser als auch von der Wasserlöslichkeit der Verbindungen bestimmt (Kosnett, 2006c; WHO, 2003). Organische Quecksilberverbindungen treten bei oraler und wenn sie flüchtig sind auch bei inhalativer Aufnahme annähernd vollständig in den Körper über.

Die Verteilung von Quecksilber im Körper hängt von der chemischen Form, dem Aufnahmepfad und der Dosis ab. Unpolare Spezifikationen wie elementares Quecksilber und organische Hg-

Verbindungen können die Blut-Gewebeschranken überwinden, wozu die polaren Hg(II)-Salze nicht oder nur in geringem Umfang fähig sind. Dies erklärt auch die deutlich ausgeprägtere Neurotoxizität organischer Quecksilbervrbindungen. $Hg^0$ wird nach Inhalation einer einmaligen Dosis innerhalb von 24h im gesamten Körper verteilt. In Tierexperimenten wurde nach inhalativer Exposition gegenüber Quecksilberdampf eine Anreicherung von Quecksilber in Großhirnrinde, Nieren, Leber, Pankreas, Hoden, der intestinalen Mucosa, in Speichel- und Schweißdrüsen, sowie im Plattenepithel der Haut und in den Haaren nachgewiesen. Quecksilber bindet somit bevorzugt an ektodermale und entodermale Epithelien. Nach oraler Aufnahme von Hg(II) kommt es vor allem zu einer Akkumulation von Hg(II) in der Nierenrinde, wo es in den Tubuluszellen an Metallothionein gebunden vorliegt. Auch in Leber, Darmschleimhaut, Haut und Hoden wird Hg(II) in relevantem Umfang gebunden.
Nach Inhalation von Hg-Dampf findet eine Elimination als Hg(II) über Urin und Faeces statt. In den Nieren ist der Hauptanteil der Körperlast an Quecksilber gespeichert, sie weisen mit 64 Tagen die längste Retentionshalbwertzeit auf. Daneben weisen auch Gehirn und Hoden hohe Halbwertzeiten auf. Die Halbwertzeit im Gesamtorganismus beträgt etwa 58 Tage (Schäfer et al., 2004a). Hg(II) wird zu gleichen Teilen renal und über die Faeces ausgeschieden, in geringem Umfang findet eine Elimination auch über Speichel, Schweiß und die Atemluft statt. Die Halbwertzeit nach Applikation einer Einzeldosis beträgt beim Menschen 42 Tage.
Eine deutliche Beteiligung von MRP2 an der Elimination des Glutathionkomplexes von Hg(II) über die Galle konnte im Tierexperiment gezeigt werden, die Mitwirkung eines weiteren Transporters wird postuliert (Sugawara et al., 1998). Man vermutet, dass MRP2 auch Glutathionkomplexe mit Methylquecksilber transportiert (Ballatori, 2002).
Symptome einer akuten Vergiftung nach Inhalation von $Hg^0$ sind Atemnot, Bronchitis, Fieber und Kopfschmerzen, es kann auch zum Lungenödem sowie einer Schädigung des Gastrointestinaltrakts und der Nieren kommen. Bei chronischer Inhalation von metallischem Hg stellt das Zentralnervensystem das empfindlichste Zielorgan dar. Chronische Vergiftungen manifestieren sich in Tremor, vor allem der Hände, Lähmungserscheinungen, Schlaflosigkeit, Gedächtnisverlust, emotionaler Labilität, häufig kommt es zu Polyneuropathien.
Der Mechanismus der Toxizität sowohl organischer als auch anorganischer Quecksilberverbindungen beruht auf der Reaktion mit Amino- und besonders Sulfhydrylgruppen von Proteinen, wodurch es zu pathologischen Veränderungen an Zellmembranen und zur Störung enzymatischer Synthese- und Transportprozesse kommt. Dies führt unter anderem auch zu einer Beeinträchtigung der DNA-Reparatur.
Hinsichtlich ihres kanzerogenen Potentials sind sowohl elementares Quecksilber als auch seine anorganischen und organischen Verbindungen von der MAK-Kommission in die Kategorie 3B eingestuft worden (DFG, 2007). Diese Kategorie umfasst Substanzen, für die aus *in-vitro*- oder Tierexperimenten Anhaltspunkte für eine krebserzeugende Wirkung vorliegen, die jedoch zur Einordnung in eine andere Kategorie nicht ausreichen. Für eine endgültige Bewertung werden weitere Untersuchungen als erforderlich angesehen. Bei Ratten traten nach Injektion von metallischem Hg Sarkome und nach Injektion von Methylquecksilber Nierenkarzinome auf (Schäfer et al., 2004a).

Hg(II) und Methylquecksilber wirken in Säugerzellkulturen gentoxisch und klastogen (Torky und Foth, 2007; WHO, 2003). Metallisches Quecksilber und sämtliche Spezifikationen sind für den Menschen als sensibilisierend an der Haut eingestuft (DFG, 2007). Das *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) nennt als duldbare wöchentliche Aufnahmemenge (PTWI) für Quecksilber einen Wert von 5 µg/kg Körpergewicht, davon sollten jedoch nur 1,6 µg/kg KG als Methylquecksilber aufgenommen werden (JECFA, 2003a).

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Zellkultur

### 2.1.1 Tumorzelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die humane Lungentumorzelllinie H322 verwendet. Die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Friedrich J. Wiebel, Helmholtz-Zentrum München, Institut für Toxikologie, zur Verfügung gestellt. Die Zellen der Linie H322 stammen von einem nicht-kleinzelligen Lungentumor, es sind nicht zilientragende Bronchialepithelzellen vom Clara-Zellentyp. Sie besitzen eine endogene Mutation im p53 Gen (Schuller et al., 1987).

### 2.1.2 Kultivierung der Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in 35-$cm^2$-Kulturflaschen mit *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium* (DMEM) mit 10 % FKS (v/v) und 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) (10000 I.E./ml) bei 37 °C, 5 % $CO_2$ und 95 % rel. Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kulturmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt und die Zellen geerntet und subkultiviert, wenn das Wachstum nach etwa 7–10 Tagen 90% Konfluenz erreicht hatte. Zu diesem Zweck wurde das Medium von den Kulturen abgesaugt und die Kulturen einmal behutsam mit PBS gespült. Anschließend wurden die Tumorzellen mit 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 10 ml Zellkulturmedium versetzt und 5 min bei 900 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in PBS resuspendiert. In einem Aliquot dieser Suspension wurde mittels Fuchs-Rosenthal Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Nach nochmaliger Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand entfernt, die Zellen in Kulturmedium resuspendiert ($2\times10^4$ bis $5\times10^4$ Zellen $ml^{-1}$) und anschließend in Kulturschalen oder auf Kulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden zu den Versuchen eingesetzt, wenn ihr Wachstum 80 % Konfluenz erreicht hatte.

### 2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Tumorzelllinien

Die Tumorzellen wurden jeweils aus logarithmisch wachsenden Populationen eingefroren. Sie wurden zunächst mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet (s.o.). Die Zellsuspension wurde in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 10 ml Zellkulturmedium versetzt und zentrifugiert (5 min, 900 U/min, RT). Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 3 ml Einfriermedium (Kulturmedium + 10 % DMSO) resuspendiert und jeweils 1,5 ml in je ein 2 ml Cryo-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen eine Stunde bei -20 °C gelagert und danach über Nacht bei -80 °C. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C kurz aufgetaut und in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kulturmedium resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 900 U/min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer 35-$cm^2$-Kulturflasche ausgesät.

### 2.1.4 Patienten

Normale humane Bronchialepithelzellen wurden aus Bronchiusresektaten tumorfreier Regionen von Lungenteilresektionen gewonnen. Das verwendete Lungengewebe stammte von Patienten, die am Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität in der Abteilung für Herz-Thorax-Chirurgie (Prof. Silber, PD Dr. S. Hofmann) operativ behandelt wurden. Die verwendeten Resektate wurden ausschließlich nach tumorchirurgischen Gesichtspunkten entnommen. Alter, Geschlecht, Medikation, berufliche Exposition, Tabakkonsum und andere Besonderheiten wurden mittels Patientenfragebögen erfasst; waren jedoch keine Ausschlusskriterien. Eine Genehmigung der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle für die Nutzung der Proben zu Forschungszwecken liegt vor.

### 2.1.5 Kultivierung normaler humaner Bronchialepithelzellen

Im Rahmen von Vorarbeiten (Etablierung der Kultivierungsmethode, Stock et al., 2002; erste Anwendungsversuche, Runge et al., 2001) wurde die Methode der Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE-Zellen) am Institut für Umwelttoxikologie etabliert.

Das in Kultur gebrachte, nach pathologischer Begutachtung gesunde Bronchialgewebe stammt aus Lungenteilresektionen, die größtenteils im Rahmen von Tumorresektionen durchgeführt wurden. Es wurde jedoch nur nach pathologischer Begutachtung gesundes Gewebe aus Bereichen distal des Tumors in Kultur gebracht. Hierzu wurden die Gewebestücke nach der Entnahme mehrmals mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in eiskaltem Leibovitz L-15 Medium transportiert. Das Bronchialgewebe wurde unter sterilen Bedingungen mechanisch, mittels Pinzetten und Scheren vom übrigen Lungengewebe getrennt und gesäubert. Anschließend wurde das Bronchialgewebe in 2-5 $mm^2$ große Stücke geschnitten und dreimal mit PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen. Die Gewebestücke wurden dann auf beschichtete 60 mm Kulturschalen (2 % Kollagen, 1 % Fibronektin, 0,1 % Rinderserumalbumin in L-15 Medium) gebracht. Nach fünf Minuten Antrocknungszeit wurde serumfreies AECG-Medium mit Supplement (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) zugegeben. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Nach zwei bis drei Wochen waren die Zellen zu einer Konfluenz von 80–90 % herangewachsen (1.Generation). Durch Versetzen der Gewebestücke auf neue beschichtete Kulturschalen konnten weitere Generationen erhalten werden. Die subkonfluenten Zellkulturen konnten enzymatisch abgelöst und passagiert werden. Für die Versuche mit NHBE-Zellen in dieser Arbeit wurden ausschließlich passagierte Zellen verwendet.

Die verwendeten Zellkulturen wurden täglich phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Auffälligkeiten wurden dokumentiert. Hierfür wurde ein Lichtmikroskop mit Phasenkontraskondensor und einer Digitalkamera Nikon Coolpix 5000 verwendet.

### 2.1.6 Passagieren der normalen humanen Bronchialepithelzellen

Zum Passagieren der NHBE-Zellen wurde das *Detach Kit* (Promo Cell) benutzt. Zuerst wurde das Medium vorsichtig von den Kulturen abgesaugt und diese dann 30 s mit je 4 ml HepesBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert (5 min, 37 °C). Nach Zugabe von 2 ml Trypsin Neutralising Solution (0,05 % Trypsininhibitor aus Soja) wurde in einem Aliquot mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Der Rest der Suspension wurde zentrifugiert (900 U/min, 5 min, RT). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in AECG-Medium mit Supplement resuspendiert ($4 \times 10^4$ Zellen / ml) und auf beschichtete Kulturgefäße ausgesät. Für die RNA-Isolation für die RT-PCR wurden 60-mm-Kulturschalen verwendet. Nach etwa einer Woche hatten die Kulturen etwa 70 % Konfluenz erreicht und wurden zu den Versuchen eingesetzt.

### 2.1.7 Durchführung der Langzeitexperimente mit normalen humanen Bronchialepithelzellen

Zur Untersuchung der Langzeiteffekte von Arsenit, Cu(II) und Hg(II) in geringen Konzentrationen auf die Expression der mRNA von MRP1, 2, 3, 4, 5 und UMAT in Primärkulturen von NHBE-Zellen wurden diese über einen Zeitraum von acht Wochen kultiviert. Dabei konnten die Zellen nach der Aussaat vier Tage in reinem Medium anwachsen, danach wurden sie für fünf Tage mit dem jeweiligen Metall behandelt. Anschließend wurde die Hälfte der Kulturen aller Dosisgruppen zur Isolation und Analyse der RNA mit TRItidy G geerntet. Die verbliebenen zwei Schalen je Dosisgruppe wurden gesplittet und auf neue beschichtete Kulturschalen ausgesät. Nach vier Tagen wurden die Zellen wieder für fünf Tage mit den Metallen behandelt. Dieser Ablauf wurde bis zum Abschluss der sechsten Behandlung der Kulturen wiederholt. Im Rahmen dieser Arbeit ergab sich die Gelegenheit für Langzeitexperimente mit Arsenit (vgl. 3.2.2), Cu(II) (vgl. 3.3.2) und Hg(II) (vgl. 3.4.2) an Kulturen vom selben Patienten. Die Experimente wurden mit Material von drei Patienten (B182, B201, B222) durchgeführt. Da das Gewebe, aus dem die Primärkulturen gewonnen wurden, nur in sehr begrenztem Umfang zu Verfügung stand, konnten in jeder Dosisgruppe nur jeweils zwei Kulturen behandelt werden.

### 2.1.8 Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellkulturen wurde in den Experimenten zur vorliegenden Arbeit der MTT-Test verwendet (Carmichael et. al., 1987). Er basiert auf der Umsetzung des wasserlöslichen, gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) durch intrazelluläre Dehydrogenasen intakter Zellen zum nicht wasserlöslichen, violetten Formazan, das die Zellen nicht mehr verlassen kann. Die zur Durchführung des Tests verwendeten Zellen wurden auf 24-Well-Kulturplatten ausgesät; wenn die Kulturen ca. 70 % Konfluenz erreicht hatten, wurden die zu prüfenden Substanzen dem Medium zugegeben. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit auf 37 °C vorgewärmtem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min im Hybridisierungsofen bei 37 °C mit MTT in PBS (0,7 mg/ml)

inkubiert. Nach dem Entfernen des Überstandes und einmaligem Waschen mit PBS wurde das Formazan mit Isopropanol / Ameisensäure (95 / 5 v/v) gelöst und die Absorption des Farbstoffs bei 560 nm mit dem Photometer (Beckman DU 7000) gegen Isopropanol / Ameisensäure bestimmt.

## 2.2 *Real-time* Genexpressionsanalysen

### 2.2.1 RNA-Isolation

Zur Untersuchung der RNA wurden die Tumorzelllinie H322 in 6-Well-Kulturplatten und normale humane Bronchialepithelzellen in 60-mm-Kulturschalen kultiviert. Aus den Zellkulturen wurde die RNA unter Verwendung der Methode nach Chomczynski (1993) mit dem Reagenz TRItidy G isoliert. Bei diesem Verfahren wird die RNA durch eine saure Guanidinthiocyanat-Phenol-Extraktion von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellkulturen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Tritidy G pro Kulturschale oder Kavität geerntet, in 1,9-ml-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Isolation der RNA wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und mit jeweils 100 µl 1-Brom-3-chlorpropan versetzt und 15 s per Hand geschüttelt. Dann wurden die Proben 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Phasentrennung wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 11000 U/min und 4 °C unterstützt. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues 1,9ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und 15 s Schütteln für 15 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation bei 11000 U/min und 4 °C für 15 min wurde der Überstand entfernt und die RNA mit 1 ml 70 % Ethanol (Ethanol / DEPC-Wasser (70 / 30 v/v)) gewaschen und nochmals 10 min bei 9000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die RNA mit 1 ml abs. Ethanol gewaschen und für 10 min bei 9000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die RNA für 5 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet. Zum Lösen wurde die RNA mit 20 µl DEPC-Wasser versetzt und 30 min auf Eis stehen gelassen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

DEPC-Wasser:

Ein Liter aqua dest. wurde mit 1 ml Diethylpyrocarbonat versetzt und 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung autoklaviert.

### 2.2.2 RNA-Quantifizierung mittels UV-Spektrometrie

Die RNA wurde 1:200 mit 3 mM $NaH_2PO_4$-Puffer (pH 8,5) in DEPC-Wasser verdünnt. Die Absorption dieser Lösung bei 260 nm wurde in einer Quarzküvette bestimmt. Zur Berechnung des Gehalts wurde bei einer Absorption von 1 OD ein RNA-Gehalt von 40 ng/µl zugrunde gelegt. Um Proteinverunreinigungen festzustellen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die RNA wurde nur weiter verwendet, wenn der Quotient aus der OD bei 260 nm und bei 280 nm zwischen 1,7 und 2,0 lag.

### 2.2.3 Synthese der cDNA

Zur Synthese der cDNA wurden 2 µg RNA eingesetzt. Zuerst wurde der Ansatz

| | |
|---|---|
| RNA (2 µg) | x µl |
| DNAse (1 u/µl) | 2 µl |
| DNAse 10x Puffer | 1 µl |
| DEPC-Wasser | ad 10 µl |

für 30 min bei 37 °C im Thermocycler mit DNAse inkubiert.
Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl DNAse-Stopplösung und Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min gestoppt. Nach Zugabe von 1 µl *Random* Primer wurde 5 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Während der Inkubation wurde der RT-Mastermix auf Eis vorbereitet:

| RT-Mastermix | |
|---|---|
| DEPC-Wasser | 5,12 µl |
| M-MLV 5x Puffer | 5 µl |
| dNTP (10 mM) | 1,25 µl |
| M-MLV Reverse Transkriptase (200 u/µl) | 1 µl |
| RNAsin (40 u/µl) | 0,63 µl |

Anschließend wurde jeder Probe 12 µl RT-Mastermix zugegeben und im Thermocycler inkubiert: (60 min 37 °C; 5 min 95 °C). Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4 *Real-time* PCR

Es wurden jeweils 2 µg DNAse-behandelte RNA aus einer Zellkultur in cDNA umgeschrieben. Bei der Untersuchung dieser cDNA wurde die Technik der *Real-time* PCR (*Rotor-Gene 2000* Thermocycler, Corbett Research, Mortlake, Australien) mit Sybr-Green-I-Detektion angewendet. (Morrison, et al., 1998, Kubista et al., 2006). Zur relativen Quantifizierung der untersuchten Gene wurde der cDNA jeder Probe eines Experiments jeweils ein Aliquot von 7,5 µl entnommen, die verbleibenden 17,5 µl cDNA wurden vor der Verwendung im Verhältnis 1:4 mit DEPC-Wasser verdünnt. Die Aliquote wurden zum Standard 1 vereinigt, für den für jedes Gen eine Konzentration von $10^6$ Kopien festgelegt wurde. Aus dem Standard 1 wurde eine Eichgerade in Form einer Verdünnungsreihe nach folgendem Schema erstellt:

| Bezeichnung | Verdünnung | Anzahl Kopien |
|---|---|---|
| Standard 1 | unverdünnt | $1 \times 10^6$ |
| Standard 2 | 1:1 | $5 \times 10^5$ |
| Standard 3 | 1:10 | $1 \times 10^5$ |
| Standard 4 | 1:10 (von Std 2) | $5 \times 10^4$ |
| Standard 5 | 1:10 (von Std 3) | $1 \times 10^4$ |

Zur *Real-time* PCR wurden jeweils 2,5 µl der Standards, der verdünnten cDNA der Proben, oder DEPC-Wasser als Blindwert eingesetzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt weiterhin 6,5 µl Aqua dest., 1 µl $MgCl_2$-Lösung (25 mM), 1 µl Sybr-Green I (1:3000 Verdünnung der Stammlösung), 1,5 µl Primergemisch (jeder Primer 10 µM), 12,5 µl 2x PCR *Master Mix*. Die PCR wurde 2 min bei 95 °C initialisiert. Anschließend wurde für 45 Zyklen wiederholt:

| | |
|---|---|
| Denaturierung: | 95 °C; 30 sec. |
| Anlagerung der Primer: | (Temperatur s. Tab. 3, S.34); 30 sec. |
| Elongation: | 72 °C; 30 sec. |
| Fluoreszenzmessung: | (Temperatur s. Tab. 3, S.34); 10 sec. |

(Anregungswellenlänge: 470 nm; Emissionswellenlänge: 585 nm)

Es folgte ein abschließender Elongationsschritt bei 72 °C für 4 min. Im Anschluss daran wurde der Schmelzpunkt des PCR-Produktes bestimmt. Es wurden ausschließlich Experimente ausgewertet, die nur ein Produkt zeigten. Weiterhin musste der Schmelzpunkt des Produktes mit dem des bei der Etablierung der Methode sequenzierten Produktes übereinstimmen.

Für die Quantifizierung des Produktes wurde die Methode des Schwellenwertzyklus (eng.: *threshold cycle* $C_t$) verwendet. Der $C_t$ entspricht dabei der Zyklenzahl, bei welcher das Fluoreszenzsignal der Probe erstmalig signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt (Gibson et al., 1996). Zur Erstellung der Eichgerade für die semi-quantitative Quantifizierung wurden die Logarithmen der Kopienzahlen der Standardverdünnungen gegen die $C_t$-Werte aufgetragen. Aus den $C_t$-Werten der Proben wurden mit dieser Eichgerade dann die entsprechenden Kopienzahlen ermittelt. Die Ermittlung der $C_t$-Werte und die Quantifizierung wurden mit der Software *Rotor-Gene* 4.6.94 (Corbett Research, Mortlake, Australien) durchgeführt, dabei wurden die PCRs der Zielgene und der Referenzgene immer mit den gleichen Parametern ausgewertet. Um Streuungen in der zur cDNA-Synthese eingesetzten RNA-Menge sowie Unterschiede in der Effizienz der cDNA-Synthese und der PCR zu kompensieren (Thellin et al., 1999; Bustin et al., 2005) wurde die Genexpression immer relativ zu geeigneten Referenzgenen (GAPDH, 18S rRNA) als interne Standards ermittelt. Die Expressionsänderungen wurden im Vergleich zu einer entsprechenden unbehandelten Kultur ermittelt.

### 2.2.5 Primer für die *Real-time* PCR

Die Primer für die *Real-time* PCR wurden mit der Software Oligo 6 erstellt, oder aus geeigneten Publikationen übernommen: MRP2 (Dietrich et al., 2004), GAPDH (Corbett Research, 2003), 18S-rRNA (Bartling et al., 2003). Für sämtliche verwendeten Primer wurden die Bedingungen der PCR entsprechend optimiert (Bustin, 2000). Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Gelelektrophorese und Sequenzierung (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Deutschland) überprüft. Am Ende jeder *Real-time* PCR wurde automatisch eine Schmelzkurve des Produkts aufgenommen um die Spezifität der PCR und die Abwesenheit unspezifischer PCR-Produkte sicherzustellen (Ririe et al., 1997). Die Ergebnisse einer PCR wurden nur verwendet, wenn der Schmelzpunkt des Produkts der jeweiligen PCR mit dem Schmelzpunkt des Produkts bei der

Etablierung der Methode für das jeweilige Gen übereinstimmte und keine unspezifischen PCR-Produkte aufgetreten waren.

**Tab. 3 Primersequenzen für die *Real-time* PCR.**

| Name: | Sequenz (5´→3´): | Produkt-größe (bp): | Annealing-temp.: | Mess-temp.: |
|---|---|---|---|---|
| MRP1 | F: TACATGAAGGCCATCGGACTC<br>R: AGACGCTCAGCCGGACTTT | 160 | 57 °C | 83 °C |
| MRP2 | F: GTGTTTCCACAGAGCGGCTAG<br>R: GCATGGCTGATATCAAGGAG | 234 | 56 °C | 84 °C |
| MRP3 | F: CTCAATGTGGCAGACATCGG<br>R: GGGAGCTCACAAACGTGTG | 178 | 55 °C | 85 °C |
| MRP4 | F: ACCACAGGCCAGATAGTCAA<br>R: GGGCAGGAGAAT GATTAGAAC | 180 | 55 °C | 81 °C |
| MRP5 | F: CGCATCGCACACGTAAAC<br>R: TGGACAATAACACGCAGTCAC | 163 | 57 °C | 82 °C |
| UMAT | F: GGGTGCTGCGGTATGTG<br>R: AATCTCGCCAGGTAGACTGTT | 149 | 56 °C | 85 °C |
| GAPDH | F: GAAGATGGTGATGGGATTTC<br>R: GAAGGTGAAGGTCGGAGT | 226 | 60 °C | 82 °C |
| 18S-rRNA | F: GTTGGTGGAGCGATTTGTCTG<br>R: AGGGCAGGGACTTAATCAACGC | 348 | 60 °C | 88 °C |

## 2.3 Genexpressionsanalyse mittels Microarray

### 2.3.1 Analyse der Microarrays

Zur Untersuchung der Wirkung von Cd(II), Co(II), Pb(II) und Hg(II) auf die Genexpression in Primärkulturen von NHBE-Zellen wurden Microarrays verwendet. Dazu wurde zuerst aus den Primärkulturen wie unter 2.2.1 beschrieben die RNA mittels TRItidy G isoliert.

Die Microarrayanalysen wurden am Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt (Projekt Z03). Vor der Durchführung der Microarrayanalysen wurden Konzentration und Qualität der RNA mit einem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornien, USA) bestimmt. Dabei wurde ein *RNA 6000 Nano LabChip Kit* (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornien, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. Bei diesem Verfahren wird die RNA aus den Proben mittels Mikrokapillarelektrophorese auf einem vorgefertigten Chip aufgetrennt. Anschließend werden die einzelnen Fraktionen der RNA mittels laserinduzierter Fluoreszenz detektiert und in einem Chromatogramm dargestellt. Die Mitführung einer RNA-Leiter als Massen- und Größenstandard bei der Elektrophorese erlaubt eine Bewertung der einzelnen RNA-Banden. Die Integrität der untersuchten RNA wurde anhand des Verhältnisses zwischen der 18S- und der 28S-Fraktion der

ribosomalen RNA bestimmt. Dabei sollte die Peakfläche der 28S rRNA in etwa das doppelte der Fläche der 18S rRNA betragen, um von einer ausreichenden Qualität der mRNA für die weitere Analysen ausgehen zu können (Sambrook, Russel, 2001). Zu Beginn der Mikroarrayanalysen wurden 5 µg Gesamt-RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die Synthese doppelsträngiger cDNA geschah in zwei Schritten. Der erste Strang wurde synthetisiert unter Verwendung einer *Superscript II* Reverse Transkriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD USA) und Oligo-dT-Primern, die einen T7 RNA Polymerasepromotor (Genset SA, Paris, Frankreich) enthielten. Anschließend wurden nach Zugabe von E. coli RNAse H, E. coli DNA Polymerase I und E. coli DNA Ligase, sowie T4 DNA Polymerase die komplementären Stränge synthetisiert (Affymetrix, 2004). Die doppelsträngige cDNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt bevor sie zur Synthese der cRNA mittels in-vitro Transkription mit dem *IVT Labeling Kit* (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA) eingesetzt wurde. Dabei wurde in Gegenwart von T7 RNA Polymerase und einer Mischung aus einem biotinylierten Ribonucleotidanalogon und Ribonucleotiden, biotinmarkierte cRNA synthetisiert. Nach der in-vitro Transkription wurde die cRNA mit einem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt um freie Nucleotide zu entfernen. Anschließend wurde die cRNA fragmentiert und während einer 16-stündigen Inkubation bei 45 °C an Affymetrix *GeneChip HG-U133 Plus 2.0 Arrays* hybridisiert. Die Arrays wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers gewaschen und gefärbt. Anschließend wurden die Arrays mit einem *Affymetrix GeneChipScanner 3000* mit *7G Upgrade* gescannt (Affymetrix, 2004).

### 2.3.2 Analyse der Daten

Die Analyse der Daten wurde am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - Hans-Knöll-Institut (HKI), Abt. Molekulare und Angewandte Mikrobiologie in Jena von Dr. R. Guthke und Herrn W. Schmidt-Heck durchgeführt.

Aus den Fluoreszenzintensitäten der Affymetrix GeneChips wurde die Expression von etwa 47000 Transkripten ermittelt, die das gesamte humane Genom abdecken. Die Daten wurden unter Verwendung der Softwarepakete AffyPLM der Bioconductor Software ausgewertet (Bolstad, 2007; Development Core Team, 2007). Aus den Datensätzen wurden differentiell exprimierte Gene herausgefiltert, deren Expression sich zwischen Kontrolle und behandelter Kultur mindestens um das Zweifache änderte. Diese Gene wurden dazu verwendet überrepräsentierte GO (*Gene Ontology*) Kategorien und KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) *Biochemical Pathways* zu identifizieren, hierfür wurde das Softwarepaket GOstats verwendet (Falcon, Gentleman, 2007). Das GO Konsortium ist eine Kooperation von Datenbanken über Modellorganismen und Proteindatenbanken, sowie von Forschungseinrichtungen, die im Bereich der Entwicklung und Anwendung von Gene Ontology arbeiten. Ziel dieses Konsortiums ist die Etablierung eines strukturierten, exakt definierten, kontrollierten, allgemein angewandten Vokabulars zur Beschreibung der Funktionen von Genen und Genprodukten in allen Organismen. Das Projekt entstand 1998 als Kooperation zwischen den Datenbanken über drei Modellorganismen. Das GO Projekt hat drei von einander unabhängige strukturierte und kontrollierte Systeme von Bezeichnungen (Ontologien)

entwickelt, die Genprodukte speziesunabhängig hinsichtlich ihrer zugehörigen zellulären Bestandteile (*Cellular Components*), biologischen Prozesse (B*iological Processes*) und ihrer Funktionen auf molekularer Ebene (M*olecular Functions*) beschreiben (Ashburner et al., 2000). Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) ist eine frei zugängliche Datenbank mit Informationen über biologische Systeme, die funktionelle Informationen auf genomischer, systemischer und chemischer Ebene beinhaltet. Sie hat zum Ziel, mittels bioinformatischer Methoden Verbindungen zwischen Informationen auf genetischer und molekularer Ebene und komplexen Abläufen in lebenden Zellen und Organismen zu schaffen. Dies geschieht unter anderem mit der schematischen Darstellung der Abläufe des Metabolismus, unterschiedlicher zellulärer Prozesse sowie von Krankheiten des Menschen auf molekularer Ebene und den daran beteiligten Genen und Genprodukten in den sog. KEGG Pathways. Das KEGG-Projekt wurde 1995 gestartet und umfasste im Januar 2008 bereits 19 Datenbanken (Kanehisa et al., 2008). Des Weiteren wurden aus den Daten der Affymetrix GeneChips mit dem Programm PRIMA (*Promoter Integration in Microarray Analysis*) Transkriptionsfaktoren ermittelt, deren Bindungsstellen in den Promotoren der differentiell exprimierten Gene überrepräsentiert waren (Elkon et al., 2003).

### 2.4 Fixierung der Zellen

Sowohl Kulturen der Tumorlinie H322 als auch NHBE-Zellen wurden für die nachfolgende immunhistochemische Untersuchung nach einer modifizierten Form des Protokolls von Vielkind und Swierenga fixiert (Vielkind und Swierenga, 1989). Die Zellen für diese Experimente wurden entweder auf 0,17±0,01 mm dicken Deckgläschen (Hecht Assistent, Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland) oder auf transparenten PET Membraneinsätzen für 6 Wellplatten (BD Falcon Cell Culture Inserts, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm kultiviert. Wenn die Kulturen ungefähr 90 % Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und die Kulturen bei RT zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie bei RT für fünf Minuten mit PEM-Puffer mit Triton-X 100 und Formalin (s.u.) fixiert. Daraufhin wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS für 10 min bei -20 °C mit Ethanol nachfixiert und anschließend zweimal bei RT mit PBS gewaschen. Zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz wurden die Zellen dann bei 4 °C für 6 min mit einer jeweils frisch hergestellten Lösung von 0,1 % $NaBH_4$ in PBS (pH 8,0) behandelt. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen entweder direkt weiter immunhistochemisch behandelt oder bei -80 °C gelagert.

| **PEM-Puffer mit Triton-X 100** | |
|---|---|
| PIPES | 2,72 g |
| EGTA | 0,171 g |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,037 g |
| Triton-X 100 | 180 µl |

Mit bidest. Wasser auf 90 ml auffüllen. Kurz vor der Verwendung 10 ml 37 % Formalin zugeben.

## 2.5 Immunhistochemische Verfahren

Der Nachweis der untersuchten Proteine in den Lungenzellkulturen wurde mittels immunhistochemischer Detektion durchgeführt. Vor der Antikörperbehandlung wurden die - wie unter 2.4 beschrieben - fixierten Zellen mindestens 30 min in PBS rehydratisiert. Zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperwechselwirkungen wurden die Proben für 30 min bei RT mit einer 10 %-igen Lösung des Serums der Spezies, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde (Ziege), in PBS mit 0,5 % BSA inkubiert. Anschließend wurden die Proben in eine feuchte Kammer überführt, mit 50 – 75 µl der Lösung des Primärantikörpers (s.Tab. 4, S.37) überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal bei RT mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern *goat-anti-mouse*, markiert mit Alexa Fluor 633 (1:1000, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) (Anregung: 633 nm, Emission: 650 nm), erfolgte bei 37 °C für 30 min in einer feuchten Kammer. Im Anschluss wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen und bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert. Die Spezifität der Sekundärantikörper wurde durch mitgeführte Negativkontrollen, die ohne Primärantikörper behandelt wurden, geprüft. Zur Auswertung der Proben wurden ein Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop 20 mit 100 Watt Quecksilberdampflampe und einer Digitalkamera Nikon Coolpix 5000 sowie ein konfokales Laserscanmikroskop Leica TCS SL mit HeNe-Laser und Argon-Laser unter Verwendung der *Leica Confocal Software LCS Lite 2.61* benutzt. Dieses Programm wurde auch zur Bearbeitung der erhaltenen Aufnahmen und der Erstellung von einer *Maximum Intensity Projection* verwendet. Die *Maximum Intensity Projection* ist ein softwaregestütztes Verfahren mit dem eine Serie von Aufnahmen, die ein Präparat dreidimensional darstellt, in ein zweidimensionales Bild umgewandelt wird. Hierbei erhält jeder Bildpunkt in der resultierenden Darstellung den Wert der an dieser Position gemessenen maximalen Intensität aus der Serie von Aufnahmen entlang der Z-Ebene. Beide Mikroskope waren mit Objektiven mit einer Deckglaskorrektur für 0,17 mm starke Deckgläser ausgestattet. Die Laserscanmikroskopie wurde am Fraunhofer-Institut für Werkstoffmechanik, Halle (Saale) durchgeführt.

**Tab. 4 Übersicht über die für die Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper**

| Antikörper: | Verdünnung: | Hersteller: |
|---|---|---|
| Maus-anti-MRP1 | 1:500 | Sigma |
| Maus-anti-β-Aktin | 1:1000 | Novus Biologicals |

Beide Antikörper waren monoklonal.

Die Primärantikörper wurden mit einer 5%-igen Ziegenserum-Lösung in PBS mit 0,5 % BSA verdünnt.

## 2.6 Aktivitätsbestimmung der MRP-Transporter

Zur Bestimmung der funktionellen Aktivität einiger MRP-Transporter nutzt man das Isomerengemisch 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein (CDF), ein gemeinsames Substrat von MRP1, 2, 3, 4 und 5 (Courtois et al., 1999; Rychlik et al., 2000; Zamek-Gliszczynski et al., 2003; Pratt et al., 2006). Der Fluoreszenzfarbstoff CDF gelangt durch Diffusion in die Zellen, die intrazelluläre Fluoreszenz wird

dann mittels Einzelzellfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dabei wird zur Anregung Licht der Wellenlänge 460 nm verwendet, die Fluoreszenz des CDF wird im Maximum des Emissionspektrums bei 490 nm gemessen. Die Transportaktivität von MRP1, 2, 4 und 5 wird demnach indirekt in Summe über die Fluoreszenz des intrazellulär verbliebenen CDF bestimmt. Die Zellen für die Transportaktivitätsexperimente wurden auf 0,17±0,01 mm dicken Deckgläschen (Hecht Assistent, Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland) kultiviert. Vier Stunden vor der Messung der intrazellulären Fluoreszenz wurden die Kulturen mit CDF (4 µg/ml) inkubiert, nach dieser Zeit hat die CDF-Aufnahme ein Plateau erreicht (Stehfest et al., 2005). Unmittelbar vor der Messung wurden die Kulturen nach Absaugen des CDF-haltigen Mediums viermal schnell mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Fluoreszenz an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Nikon AFX-DX) mit 30 Messungen pro Sekunde und einer Messdauer von zehn Sekunden jeweils in zehn Zellen pro Präparat bestimmt. Erfassung der Daten und Steuerung der Lichtquelle für die Anregung geschahen unter Verwendung der Software DSCAN (Amko LTI, Tornesch, Deutschland).

## 2.7 Gentoxizitätsbestimmung im Comet-Assay

### 2.7.1 Durchführung der Einzelzellgelelektrophorese

Die zu den Experimenten eingesetzten Puffer und Gele wurden jeweils am Vortag frisch hergestellt und bei 4 °C gelagert. Ebenfalls vor dem Versuchstag wurden mattierte Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshafen) vorbeschichtet. Dazu wurde die angeraute Seite der Objektträger mit 1 ml 1 % NMP in bidest. Wasser bedeckt und die Schicht eine Stunde lang erstarren gelassen. Anschließend wurde die Agaroseschicht mit einem Skalpell wieder abgekratzt und die Objektträger im Kühlschrank gelagert. Zur Vermeidung von Schäden an der DNA in den Proben, wurden die nachfolgenden Arbeitsschritte bei möglichst geringer Beleuchtung durchgeführt. Aus demselben Grund und um die Stabilität der Gele zu gewährleisten, wurden die Objektträger im weiteren Verlauf des Experiments auf Eis gehalten, die Versuchsdurchführung fand in der Kühlzelle bei 7 °C statt. Die vorbehandelten Objektträger wurden mit einer Grundschicht aus 300 µl 0,6 % NMP Agarose in PBS versehen, mit einem Deckglas abgedeckt und 15 min auf Eis erstarren gelassen. Die Zellen wurden einmal vorsichtig mit warmem PBS gewaschen und, wie unter 2.1.2 beschrieben, mit Trypsin geerntet. Anschließend wurden von jeder Probe 50.000 bis 75.000 Zellen pro Objektträger in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 6 min bei 1.600 U/min zentrifugiert. Von jeder Dosisgruppe wurden zwei Objektträger erstellt. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstands mit einer Pipette wurden die Zellpellets auf Eis gelagert. Nach dem Erstarren der Grundschicht wurden die Zellpellets gründlich in jeweils 85 µl 0,5 % LMP Agarose in PBS resuspendiert und nach Entfernen des Deckglases auf die Objektträger aufgebracht. Die Deckgläser wurden wieder aufgelegt und die Gelschicht 15 min erstarren gelassen. Abschließend wurde eine weitere Schicht von 65 µl 0,5 % NMP Agarose in PBS aufgetragen und 15 min erstarren gelassen. Im Anschluss wurden die Objektträger für eine Stunde in den Lysepuffer gelegt, dies geschah bei 4 °C im Dunkeln. Die Behandlung mit dem Lysepuffer führt zu einer Zerstörung von Zell- und Kernmembranen, sowie zur Lyse DNA-organisierender Proteine.

Nach der Lyse wurden die Objektträger mehrmals mit auf 4 °C gekühltem Elektrophoresepuffer gewaschen und für 40 min in Elektrophoresepuffer gelegt. Unter Einwirkung dieses alkalischen Puffers kommt es zur Entwindung der Doppelhelix der DNA und der Überführung von Einzelstrangbrüchen in Doppelstrangbrüche wodurch diese ebenfalls erfasst werden können. Entstandene DNA-Fragmente wandern dann im nächsten Schritt, der Elektrophorese, in Richtung der Anode. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 40 V und 500 mA 40 min lang durchgeführt. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur dreimal jeweils 5 min mit Neutralisationspuffer gewaschen. Die Objektträger können auch bis zu 48 h bei 4 °C in diesem Puffer aufbewahrt werden.

### 2.7.2 Messung der Proben am Fluoreszenzmikroskop

Zur Anfärbung der DNA wurden die Objektträger jeweils mit 80 µl 0,6 % Ethidiumbromid in PBS überschichtet, die Deckgläschen wieder aufgelegt und die Proben für 30 min lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die DNA einlagert. Die Präparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 20, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet, dabei kamen folgende Filter zu Einsatz: Anregung: 510 nm, Emission: 595 nm, als Lichtquelle wurde eine 100 W Quecksilberdampflampe eingesetzt.

### 2.7.3 Bestimmung der DNA-Schädigung

Das verwendete Fluoreszenzmikroskop war mit einer CCD-Kamera ausgerüstet, die damit aufgenommenen digitalen Bilder wurden mit der Software Komet 5.5 (Kinetic Imaging, Liverpool, England) ausgewertet. Dabei wurde jeweils der gesamte Bereich markiert indem sich die DNA einer Zelle befand und die Fluoreszenzintensität innerhalb dieses Bereichs analysiert. Während intakte DNA nicht im elektrischen Feld wandert und daher als Punkt oder Kometenkopf erscheint, migrieren DNA-Fragmente auf die Anode zu, was zu einem kometenschweifähnlichen Bild führt (vgl. Abb. 4, S.40). Die Schweiflänge (eng. *Tail Length*) entspricht demnach der Migrationsstrecke der DNA-Bruchstücke, wobei kleinere Fragmente schneller wandern, was die Länge des Kometenschweifs erhöht. Bei alleiniger Betrachtung der Schweiflänge bleibt jedoch das Verhältnis zwischen der Menge an DNA im Kopf und im Schweif der Kometen unberücksichtigt. Bei zunehmender Schädigung der DNA kann es vorkommen, dass die Schweiflänge nicht mehr zunimmt während der Anteil der DNA im Schweif ansteigt. Aus diesem Grund wurde das Schweifmoment (eng. *Olive Tail Moment* (OTM)) als weiterer Parameter zur Beurteilung der DNA-Schädigung verwendet. Das *Olive Tail Moment* ist definiert als das Verhältnis zwischen der Fluoreszenz im Kopf des Kometen und der im Schweif, multipliziert mit Schweiflänge (Olive und Banath, 1993). Je größer der Schädigungsgrad der DNA, desto größer ist das Schweifmoment. Nach Markierung eines Kometen wurden sämtliche zur Beurteilung notwendigen Parameter von der Software unter Berücksichtigung festgelegter Parameter (s.u.) bestimmt. Auf jedem Objektträger wurden 50 zufällig ausgewählte Zellen gemessen. Die einzelnen Objektträger wurden vor

der Messung durch eine zweite Person codiert, um eine objektive Auswahl der Zellen zu gewährleisten (Wiklund und Agurell, 2003).

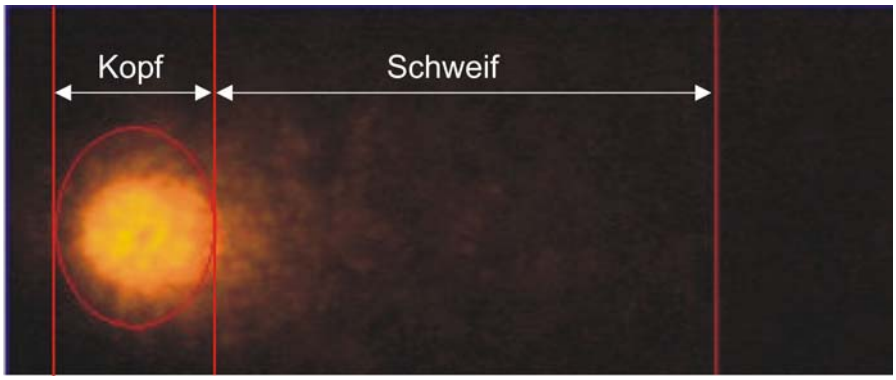



**Abb. 4 Bestimmung der DNA-Schädigung im Comet-Assay.**

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA einer Zelle nach dem Comet-Assay. Intakte DNA wandert nicht im elektrischen Feld und bildet den Kopf des Kometen, wohingegen DNA-Fragmente in Richtung der Anode migrieren und als Kometenschweif erscheinen. Die Bilder wurden mit dem Programm Komet 5.5 ausgewertet.

Folgende Parameter wurden zur bei der Auswertung der Bilder mit dem Programm Komet 5.5 verwendet:

| **Parameter:** | **Wert:** |
|---|---|
| Head threshold [%] | 30 |
| Smoothing value | 15 |
| Tail break lenght [µm] | 5 |
| Tail threshold / 1000 | 10 |
| Background hight | 20 |
| Saturation limit | 25 |
| Saturation maximum | 254 |

### 2.7.4 Reagenzien für den Comet-Assay:

Agaroselösungen:

1 % (g/v) Normal melting point (NMP) Agarose in bidest. Wasser

0,6 % (g/v) Normal melting point (NMP) Agarose in PBS

0,5 % (g/v) Low melting point (LMP) Agarose in PBS

Die Agarose durch kurzes Erhitzen in der Mikrowelle lösen. Eine Stunde vor Versuchsbeginn in der Mikrowelle schmelzen und bis zur Verwendung bei 40 °C im Wasserbad lassen.

Stammlösung Lysepuffer:

| | | |
|---|---|---|
| 146,1 g | NaCl | (2,5 M) |
| 1,21 g | TRIS | (10 mM) |
| 10 g | N-Lauroylsarcosin Natriumsalz (1%) | |
| 37,2 g | $Na_2$-EDTA | (100 mM) |

ad 1l mit bidest. Wasser auffüllen, pH-Wert: 10. Lichtgeschützt bei RT lagern.

Lysepuffer:

| | |
|---|---|
| 0,8 ml | Triton-X 100 |
| 8 ml | DMSO |
| 72 ml | Stammlösung Lysepuffer |

Eine Stunde vor Versuchsbeginn herstellen und bei 4 °C lagern.

Elektrophoresepuffer:

| | |
|---|---|
| 12 g | NaOH |
| 0,37 g | $Na_2$-EDTA |

ad 1l mit bidest. Wasser auffüllen, pH-Wert: 13. Bei 4 °C lagern.

Neutralisationspuffer:

| | |
|---|---|
| 48 g | TRIS |

in 900 ml bidest. Wasser lösen, pH 7,5 einstellen und auf 1l mit bidest. Wasser auffüllen und bei 4 °C lagern.

### 2.8 Statistische Analysen

Zur Aufbereitung der Rohdaten wurde die Software Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmont, USA) verwendet. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Programms GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und nachfolgendem Tukey-Kramer Test. Die verschiedenen Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet: Irrtumswahrscheinlichkeiten p kleiner 5 % als $p<0,05$ und kleiner 1 % als $p<0,01$. Die grafischen Darstellungen wurden mit Sigma Plot 10 (Systat Software Inc., USA) erstellt.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Lungenzellkulturen

### 3.1.1 Kultur der humanen Lungentumorzelllinie H322

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden unter anderem adhärent wachsende Kulturen der humanen Lungentumorzelllinie H322 verwendet.

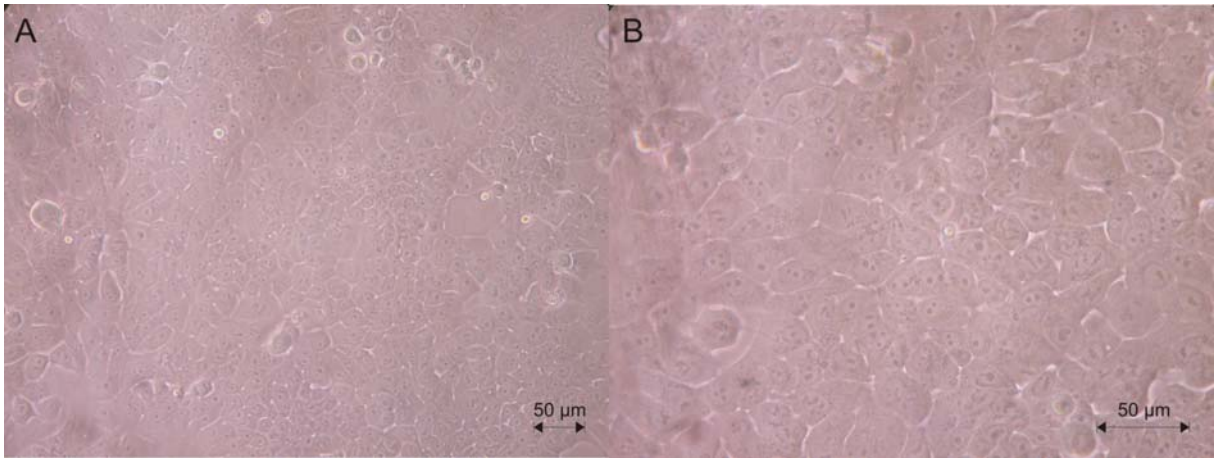



**Abb. 5 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von H322 Zellen.**

(A) 200-fache Vergrößerung. (B) 400-fache Vergrößerung.

### 3.1.2 Primärkulturen von normalen humanen Lungenzellen

Als ein weiteres Modellsystem für die menschliche Lunge wurden in dieser Arbeit Primärkulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE-Zellen) aus Resektaten von Patienten eingesetzt. Informationen über die Patienten, denen das Gewebe entnommen wurde sind aus Tab. 9 (S.155) ersichtlich.

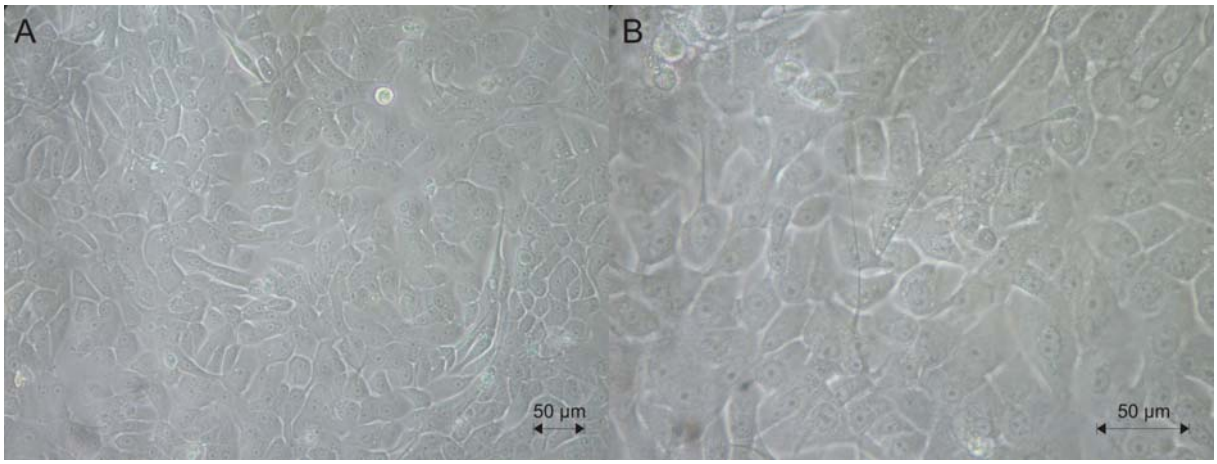



**Abb. 6 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von normalen humanen Bronchial-epithelzellen.**

(A) 200-fache Vergrößerung. (B) 400-fache Vergrößerung.

**- Langzeitkultur primärer Bronchialepithelzellen**

Im Rahmen von Langzeitexperimenten zur Untersuchung des Einflusses von Arsenit, Cu(II) und Hg(II) auf die Expression von MRP-mRNA in Primärkulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen, gelang es, die Zellen über einen Zeitraum von acht Wochen in Kultur zu halten. Dabei wurden jeweils nach neun, 18, 27, 36, 45 und 54 Tagen in Kultur Zellen geerntet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von MRP1, 2, 3, 4 und 5 auf mRNA-Ebene über eine Kulturdauer von bis zu 36 Tagen mittels *Real-time* RT-PCR in Doppelbestimmung analysiert. Zur näheren Charakterisierung des verwendeten Modellsystems soll hier zunächst der Verlauf der mRNA-Expression der MRP1-5 in unbehandelten Kontrollen über die Kulturdauer beschrieben werden. Mit Primärkulturen aus dem Gewebe von drei Patienten wurden jeweils Langzeitexperimente mit Arsenit, Cu(II) und Hg(II) durchgeführt, dabei wurden pro Patient jeweils zwei Paare unbehandelter Kulturen als Kontrollen mitgeführt. Das erste Paar fungierte als Kontrolle für die Experimente mit Arsenit, dem Medium wurde 1 µl 3,75 mM NaOH-Lösung pro ml Medium zugegeben um vergleichbare Bedingungen zu den mit Arsenit behandelten Kulturen zu schaffen, da bei der Herstellung der Arsenitstammlösung NaOH zugesetzt wurde um das $As_2O_3$ zu lösen. Die Zugabe des NaOH führte zu einer Erhöhung des Natriumgehalts im Medium (130 mM) um 0,003 % und ist somit vernachlässigbar, sie hatte keinen Einfluss auf den pH-Wert des Mediums. Daher sind diese Proben mit dem zweiten Paar vergleichbar dem nur jeweils 1 µl steriles bidest Wasser pro ml Medium zugegeben wurde. Das zweite Paar fungierte als Kontrolle für die Experimente mit Cu(II) und Hg(II). Die Bestimmung der Expression der mRNA der untersuchten MRP-Transporter erfolgte semi-quantitativ. Zur Kompensation der Effekte durch Variationen in Menge und Qualität des Ausgangsmaterials, unterschiedlicher Effizienzen in cDNA-Synthese und PCR wurden die Expressionsdaten auf ein im Verlauf der Langzeitkultur in den Kontrollen stabil exprimiertes Referenzgen bezogen (Thellin et al., 1999; Bustin et al., 2005). Als mögliche Referenzen wurden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und 18S rRNA untersucht (Abb. 7, S.45). Als Referenz für die Analyse des Expressionsverlaufs der MRP-mRNA in den Kontrollen der Experimente mit Cu(II) und Hg(II) an B182 und B201, sowie in den Kontrollen der Experimente mit Arsenit an B201 wurde 18S rRNA gewählt, da diese RNA im Verlauf des Kulturzeitraumes nicht signifikant moduliert war (Abb. 7, S.44). Während des Langzeitversuchs mit Arsenit an B182 (B182 (1)) zeigte die 18S rRNA in den Kontrollen einen deutlichen Rückgang der Expression (ca. 1/3 nach 18 Tagen). Die Expression der untersuchten Transporter wurde in diesem Experiment auf die konstant expremierte GAPDH bezogen (Abb. 7, S.44). In den Kontrollen des Experiments mit Arsenit an B201 war GAPDH nach 18 Tagen verdoppelt.

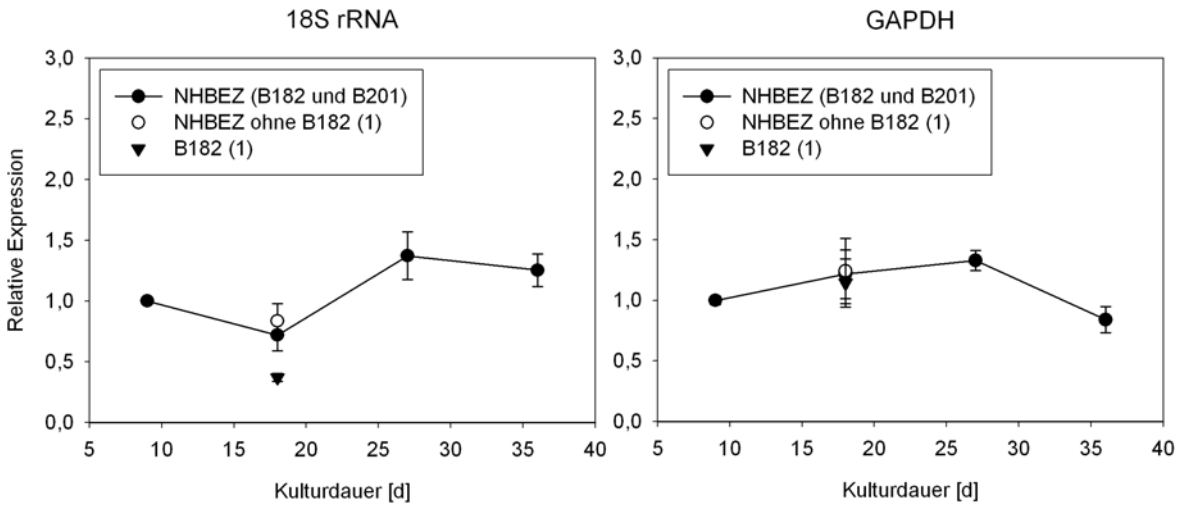



**Abb. 7 Relative Expression der 18S rRNA und der GAPDH-mRNA in Primärkulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patienten B182 und B201) im Verlauf der Experimente.**

Die untersuchten Referenzgene wurden mittels *Real-time* RT-PCR semi-quantitativ bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Expression ± SEM aus den angegebenen Experimenten, bezogen auf die Expression der jeweiligen Experimente nach den ersten neun Tagen in Kultur. n=8

Bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen der Langzeitversuche wurde die Expression des jeweiligen Experiments nach neun Tagen als Bezug genommen. Die getrennt geführten Kulturen aus den Geweben von zwei Patienten (B182 und B201) zeigten nach 18 Tagen zwar - verglichen mit den jeweiligen Kulturen nach 9 Tagen - keine signifikanten Änderungen der mRNA-Menge von MRP1, 3 und 4 (Abb. 8, S.45; Tab. 10 (Anh.), S.156), dennoch sind bereits nach dieser Zeit signifikante inter-individuelle Unterschiede zwischen den Donoren detektierbar. Die Expressionen dieser Transporter in den Kulturen beider Patienten entwickelten sich gegenläufig: Während es bei B201 zu einer Induktion vor allem von MRP4 (1,8-fach), aber auch von MRP1 (1,4-fach) kommt, verringert sich in B182 die Expression von MRP1 und 3 entsprechend auf das 0,6-fache und das 0,5-fache. Die Mengen von MRP5 in B182 und B201 nach 18 Tagen sowie die in B201 nach 36 Tagen können aufgrund der Streuung der Ergebnisse, die möglicherweise durch die geringe absolute Expression dieses Gens verursacht wird, nicht abschließend bewertet werden. Nach 27 Tagen ist in B201 ein nicht signifikanter Rückgang der Expression von MRP1, 4 und 5 erkennbar, MRP3 bleibt konstant. Im weiteren Verlauf der Kultur kommt es nach 36 Tagen in B201 zu einer signifikanten Repression von MRP1 und 3 auf das 0,4-fache. In den Kulturen von B182 und B201 war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Expression der mRNA von MRP2 oder UMAT mittels der verwendeten *Real-time* PCR-Methode nachweisbar.

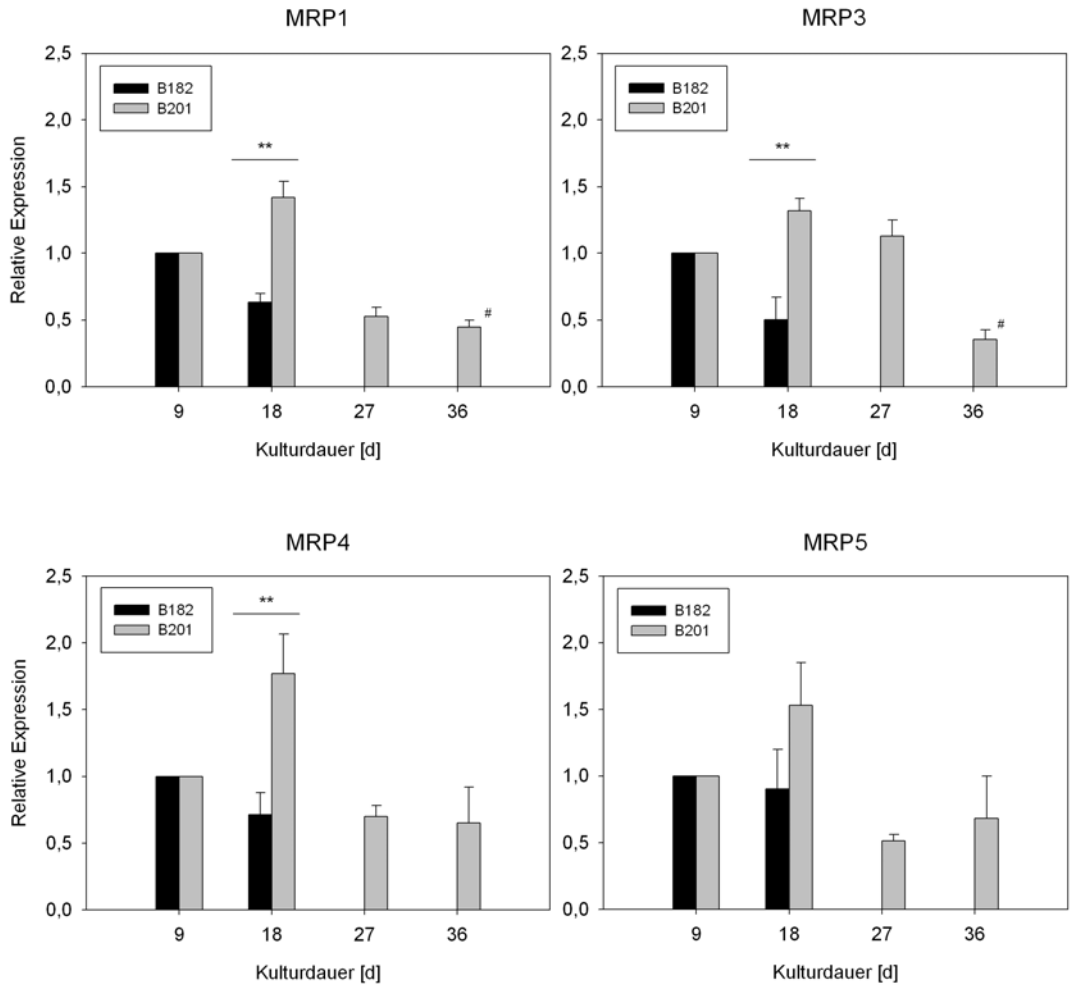



**Abb. 8 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patienten B182 und B201).**

Die mRNA der untersuchten MRP-Transporter wurde mittels *Real-time* RT-PCR semi-quantitativ bestimmt. Die Expression der einzelnen Isoformen wurde bei B182 (1) auf GAPDH als Referenzgen normiert. Die Expressionsdaten aus den anderen Experimenten wurden auf 18S rRNA als Referenz normiert. Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Expression + SEM, bezogen auf die Expression des jeweiligen Experiments nach neun Kulturtagen. n=8; * $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B182 (9 d).

**- MRP1 Nachweis mit konfokaler Laserscanmikroskopie**

Die Induktion des Transporters MRP1 auf Proteinebene wurde in Primärkulturen von NHBE-Zellen nach Fixierung und immunhistochemischer Färbung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie untersucht. MRP1 wurde in B248/3/I in beiden Kulturen (PET-Membranen in Submerskultur, auf Deckgläschen) sowohl im Zytoplasma als auch in der apicalen und in der basalen Membran exprimiert (vgl. Abb. 9, S.46; Abb. 10, S.47).

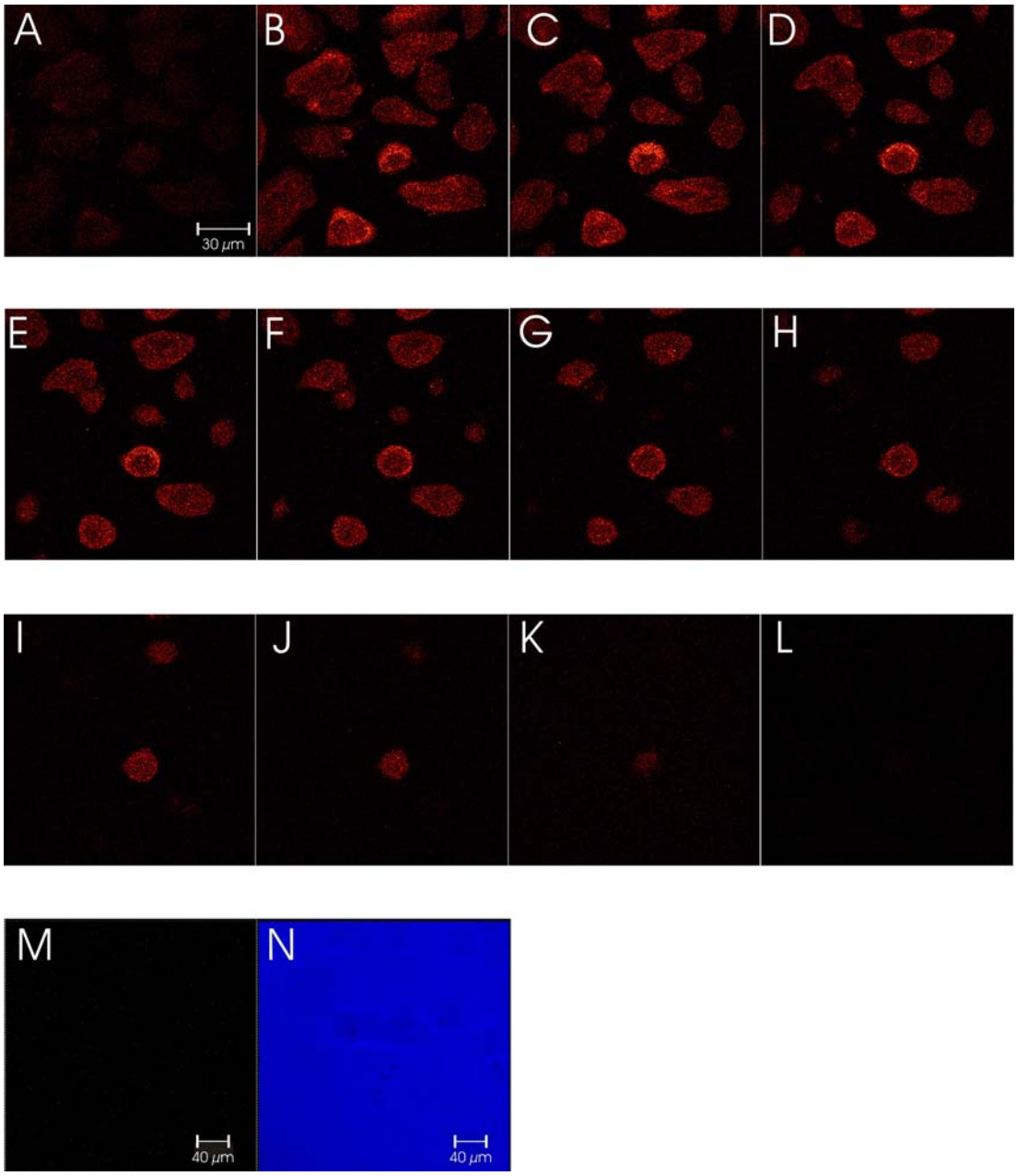



**Abb. 9 Immunhistochemischer Nachweis von MRP1 in Kulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen B248/3/I auf Deckgläschen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.**

Die Abbildung zeigt eine Serie von Aufnahmen von der apicalen (A) zur basalen (L) Seite der Kulturen, sowie die Kontrolle (M), welche ohne Primärantikörperbehandlung mitgeführt wurde und die Transmissionsmikroskopische Aufnahme der Kontrolle (N).

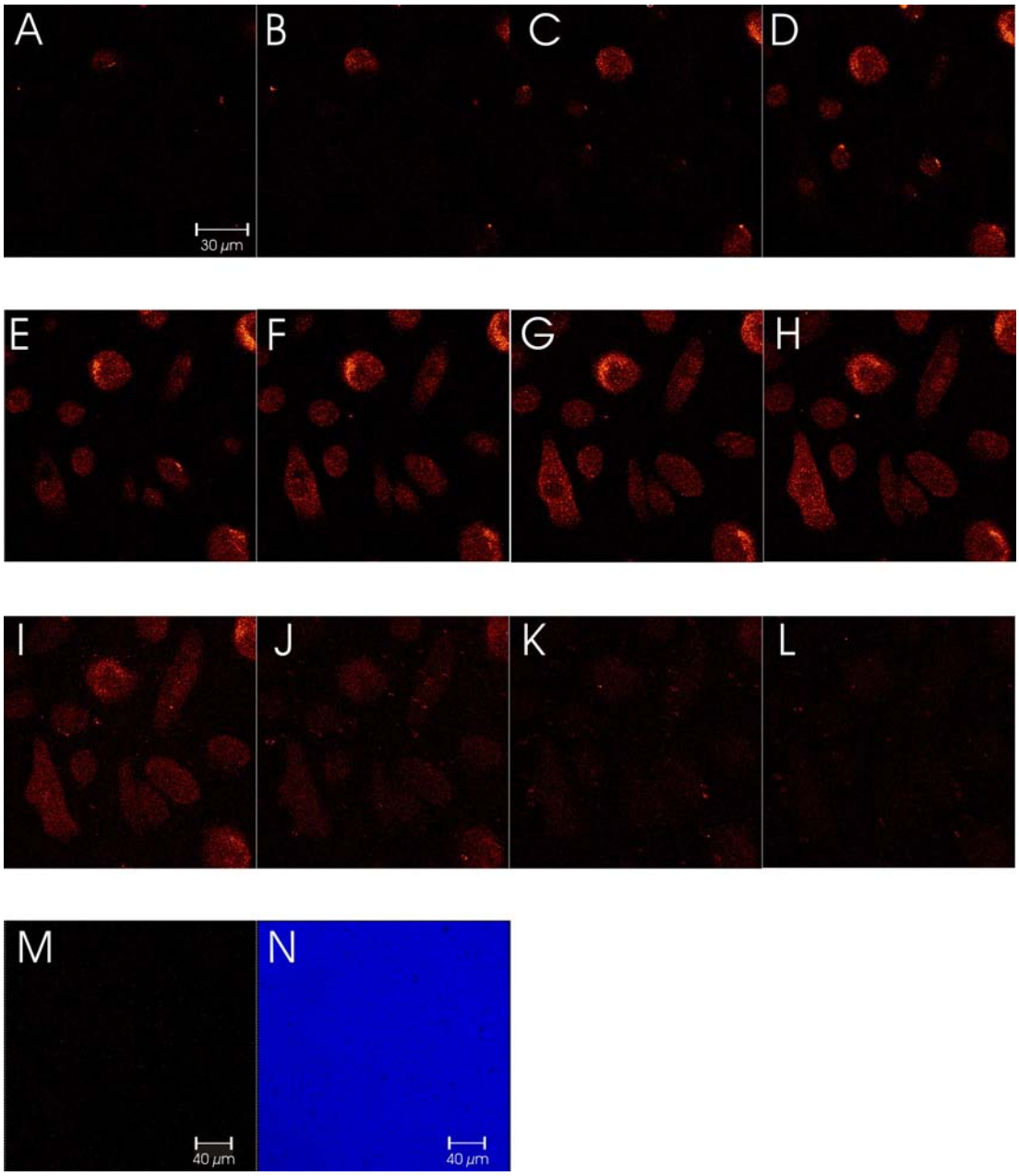



**Abb. 10 Immunhistochemischer Nachweis von MRP1 in Kulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen B248/3/I auf PET-Membranen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.**

Die Abbildung zeigt eine Serie von Aufnahmen von der apicalen (A) zur basalen (L) Seite der Kulturen, sowie die Kontrolle (M), welche ohne Primärantikörperbehandlung mitgeführt wurde und die Transmissionsmikroskopische Aufnahme der Kontrolle (N).

**- Morphologie der normalen humanen Bronchialepithelzellen in konfokaler Laserscanmikroskopie**

Zur Untersuchung des Effekts unterschiedlicher Kulturmaterialien auf die Morphologie von NHBE-Zellen wurden diese entweder auf Deckgläschen oder auf transparenten PET Membraneinsätzen für 6 Wellplatten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Zur Darstellung der Morphologie der Zellen wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Primärantikörper gegen Beta-Aktin durchgeführt. Die Präparate wurden mittels konfokaler Laserscanmikroskopie untersucht. Die Abbildung zeigt jeweils eine *Maximum Intensity Projection* einer Serie von Aufnahmen entlang der Z-Ebene der Präparate. Wie aus Abb. 11 (S.48) ersichtlich ist zeigen die Kulturen von B248/3/I auf beiden verwendeten Kulturmaterialien das gleiche morphlogische Erscheinungsbild. Sie weisen die für epitheliale Zellen typische polygonale Form auf, die Größe der Zellen ist auf beiden Materialien ebenfalls gleich.

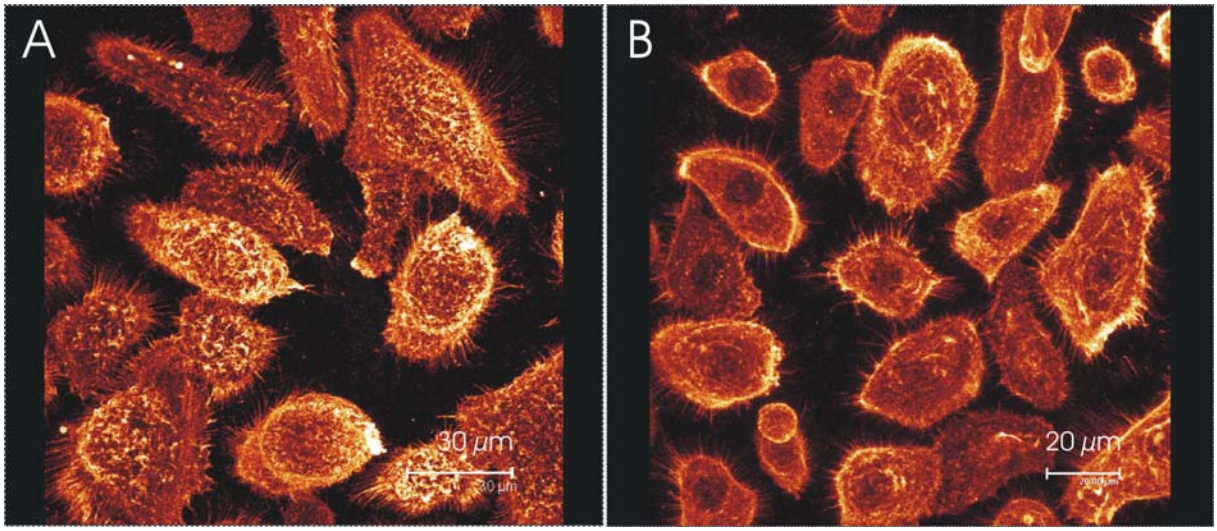



**Abb. 11 Die Morphologie von normalen humanen Bronchialepithelzellen auf verschiedenen Kulturmaterialien.**

Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen Beta-Aktin inkubiert und mittels Laserscanmikroskop dargestellt. Die Abbildung zeigt jeweils eine Maximum Intensity Projection einer Serie von Aufnahmen entlang der Z-Ebene der Präparate und wurde mit der Leica Confocal Software LCS Lite 2.61 erstellt. (A) NHBE-Zellen B248/3/I kultiviert auf Deckgläschen. (B) NHBE-Zellen B248/3/I auf PET-Membranen in Submerskultur.

## 3.2 Die Wirkung von As(III) auf humane Lungenzellkulturen

### 3.2.1 Wirkung von Arsenit auf H322 Lungentumorzellen

**- Zytotoxizität von Arsenit in Tumorzellen**

Der Einfluss von As(III) auf die Vitalität von H322 Zellen wurde unter Verwendung des MTT-Test ermittelt. Diese Experimente dienten auch der Ermittlung von nicht-zytotoxischen Konzentrationen für die Behandlung von Zellkulturen mit As(III) zur nachfolgenden Isolation von RNA für die Untersuchung der Genexpression mittels *Real-time* PCR. Zur Darstellung der Vitalität wurde die Vitalität der behandelten Proben jeweils auf die Vitalität der unbehandelten Kulturen bezogen, diese wurde dabei 100 % gesetzt. Bei H322 Zellen war nach 24-stündiger Inkubation mit As(III) in Konzentrationen ab 25 µM die Vitalität um 21 % reduziert (vgl. Abb. 12, S.49).

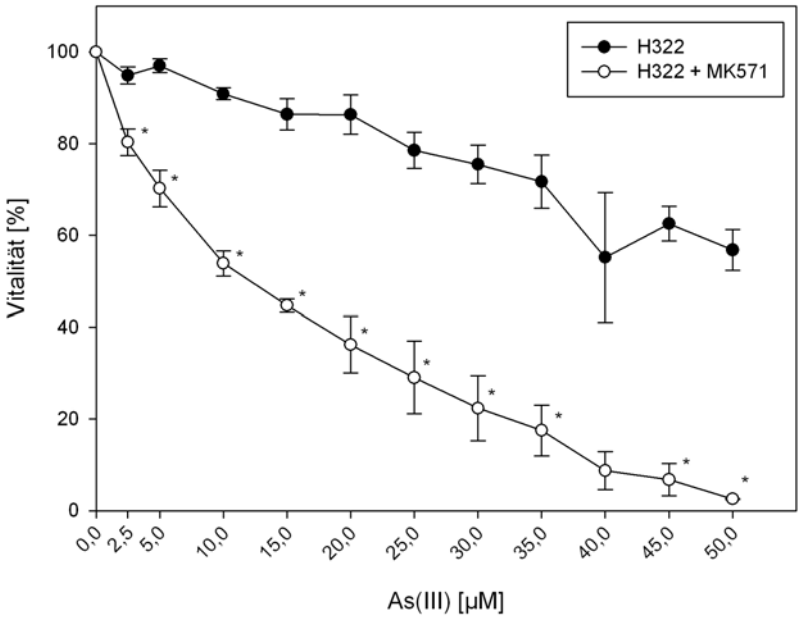



**Abb. 12 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) über 24 h.**

Vergleich der Experimente mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (20 mg/l) über 3 h. Anschließend wurde die Vitalität mittels MTT-Assay bestimmt. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert aus zwei Experimenten ± SEM bezogen auf in Abwesenheit von As(III) kultivierte H322 Zellen.

N=2, n=2; * $p \leq 0{,}05$ Signifikanz zu H322 ohne Vorbehandlung mit MK571, jedoch mit As(III) in der jeweils entsprechenden Konzentration. Bei den H322 Zellen ohne Vorbehandlung mit MK571 ist ab 25 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten H322 um 20 % reduziert. Bei den H322 Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 über 3 h ist bei Konzentrationen über 2,5 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 über 3 h, ohne As(III) um 20 % reduziert.

Da in dieser Arbeit unter anderem ein möglicher Beitrag der MRP-Transporter zur Toleranz von humanen Lungenzellen gegenüber As(III) untersucht wurde, wurden in den Experimenten auch

Kulturen mitgeführt, die drei Stunden vor der Zugabe des As(III) mit MK571 (20 mg/l), einem Inhibitor von MRP1, 2, 3, 4 und 5 (Gekeler et al., 1995; Rius et al., 2003; Haimeur et al., 2004), inkubiert wurden. Dreistündige Inkubation von H322 Zellen mit MK571 führt zu kompletter Hemmung der Transportaktivität von MRP1, ohne das dabei zytotoxische Effekte auftreten (Stehfest et al., 2005). H322 Zellen, die mit MK571 vorinkubiert waren zeigten bereits bei Konzentrationen über 2,5 µM As(III) eine Reduktion der Vitalität um 20 % im Vergleich zu den arsenitfrei kultivierten Kontrollen (vgl. Abb. 12, S.49). Die Behandlung mit MK571 alleine hatte keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Kontrollen. Die mit MK571 vorbehandelten H322 Zellen zeigten einen deutlich ausgeprägteren negativen Effekt steigender As(III)-Konzentrationen auf ihre Vitalität, dieser Unterschied ist bereits ab 2,5 µM As(III) signifikant (vgl. Abb. 12, S.49). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine oder mehrere der inhibierten MRP-Transporterisoformen einen Beitrag zum Schutz der H322 Zellen vor den toxischen Effekten von As(III) leisten.

Nach fünftägiger Inkubation führten bereits 5 µM Arsenit zu einer Reduktion der Vitalität der H322 Zellen um 22% (vgl. Abb. 13, S.50). Kulturen, die mit MK571 (20 mg/l) vorbehandelt wurden wiesen bereits bei 2,5 µM nur noch eine Vitalität von 47 % auf.

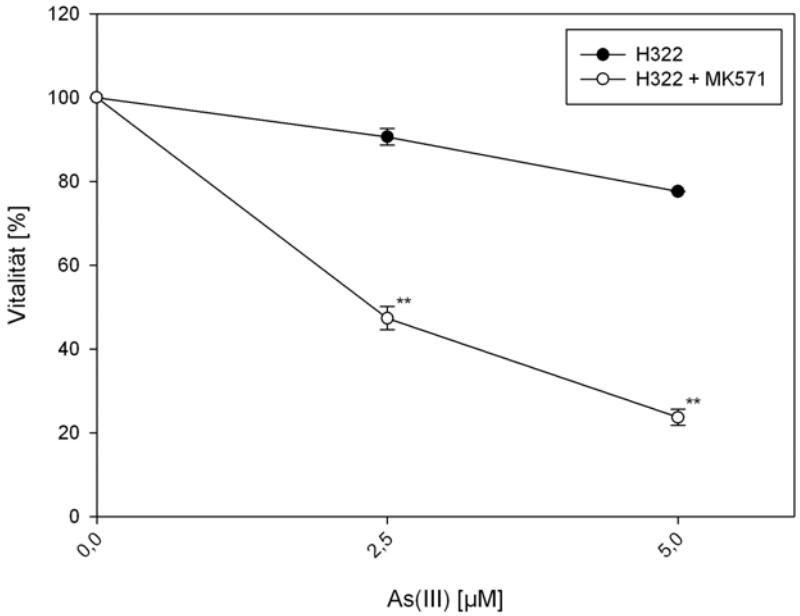



**Abb. 13 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) über 5 Tage.**

Vergleich der Experimente mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (20 mg/l) über 3 h. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert aus zwei Experimenten ± SEM bezogen auf in Abwesenheit von As(III) kultivierte H322 Zellen.

n=8; ** $p \leq 0{,}01$ Signifikanz zu H322 ohne Vorbehandlung mit MK571, jedoch mit As(III) in der jeweils entsprechenden Konzentration. Bei den H322 Zellen ohne Vorbehandlung mit MK571 ist ab 5 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten H322 um 22 % reduziert. Bei den H322 Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 ist bereits bei 2,5 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu Zellen mit Vorbehandlung mit MK571, ohne As(III) um 53 % reduziert.

Auch hier zeigte sich also bei den mit MK571 vorbehandelten Kulturen, wie auch nach 24h Inkubation, ein deutlich steilerer Verlauf der Toxizität des Arsenit.

**- Expression von MRP-mRNA in Tumorzellen unter Arsenit-Einfluss**

Die mRNA-Expression von MRP1, 2, 3, 4 und 5 wurde nach 24-stündiger Inkubation von H322 mit Arsenit mittels *Real-time* RT-PCR semi-quantitativ bestimmt. Dies erfolgte nach der Methode der relativen Quantifizierung, dabei werden Induktion oder Repression der untersuchten Gene relativ zu einem unter den Versuchsbedingungen nicht modulierten Referenzgen bestimmt (Bustin, 2002; Bustin et al., 2005). Für die relative Quantifizierung in diesem Experiment wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen gewählt, da die Expression bei 24-stündiger Behandlung mit Arsenit nicht beeinflusst war (vgl. Tab. 11 (Anh.), S.156). In den mit 5 µM Arsenit behandelten Kulturen waren, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, signifikante Effekte nachweisbar; MRP1 war auf das 0,4-fache repimiert, MRP2 und 4 auf das 0,7-fache (vgl. Abb. 14, S.51; Tab. 11 (Anh.), S.156).

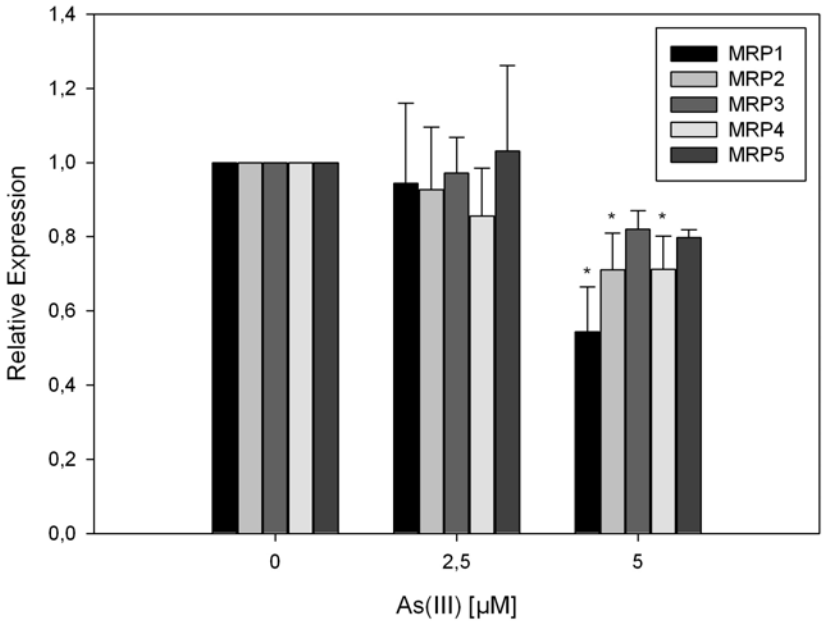



**Abb. 14 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) über 24 h.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Mittelwert der relativen Expression + SEM, jeweils bezogen auf unbehandelte Kulturen von H322. n=4;
* $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten H322

**- MRP TransportAktivität in Tumorzellen unter Arsenit-Einfluss**

Zur weiteren Untersuchung der Frage, ob MRP-Transporter in Kulturen von humanen Lungenzellen einen Beitrag zur Entgiftung von Arsenit leisten, wurde die Transportaktivität von MRP1, 2, 3, 4 und 5 in Summe gemessen. Hierfür wurde die intrazelluläre Fluoreszenz von 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein (CDF), einem gemeinsamen Substrat von MRP1, 2, 3, 4 und 5 (Courtois et al., 1999; Rychlik et al., 2000; Zamek-Gliszczynski et al., 2003; Pratt et al., 2006) fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Dabei wurde jeweils die Fluoreszenz in 10 Zellen bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet. Bei diesem Verfahren wurde die Aktivität der MRP-Transporter also indirekt über die Messung des intrazellulär verbliebenen Substrats bestimmt. Vor der Aktivitätsmessung wurden Kulturen der humanen Lungentumorzelllinie H322 für einen, drei und fünf Tage mit Arsenit (2,5 und 5 µM) behandelt. Weiterhin wurden Kulturen mitgeführt, die drei Stunden vor der Zugabe von Arsenit mit MK571 (5 mg/l) versetzt wurden. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde jeweils die relative Fluoreszenz, bezogen auf die Fluoreszenz in unbehandelten H322 Zellen, angegeben. Nachdem bei der Herstellung der Arsenit-Stammlösung Natriumhydroxid zugesetzt wurde, wurden auch in diesem Experiment Kulturen mitgeführt, denen die gleiche Menge NaOH (3,75 µM) zugesetzt wurde (vgl. 3.2.2), dies hatte keinen Effekt auf die Transportaktivität. Die Behandlung mit Arsenit führte zu einem signifikanten Anstieg der Transportaktivität um ungefähr 20 % in allen untersuchten Kulturen, unabhängig von der Konzentration des Arsenit (2,5 µM oder 5 µM) oder der Inkubationszeit (vgl. Abb. 15, S.53 und Tab. 12 (Anh.), S.157). In den Kulturen, die zusätzlich mit MK571, einem Inhibitor von MRP1 bis 5, behandelt wurden, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Transportaktivität um ungefähr 20 %, die ebenfalls unabhängig von Konzentration und Einwirkungszeit des Arsenit war.

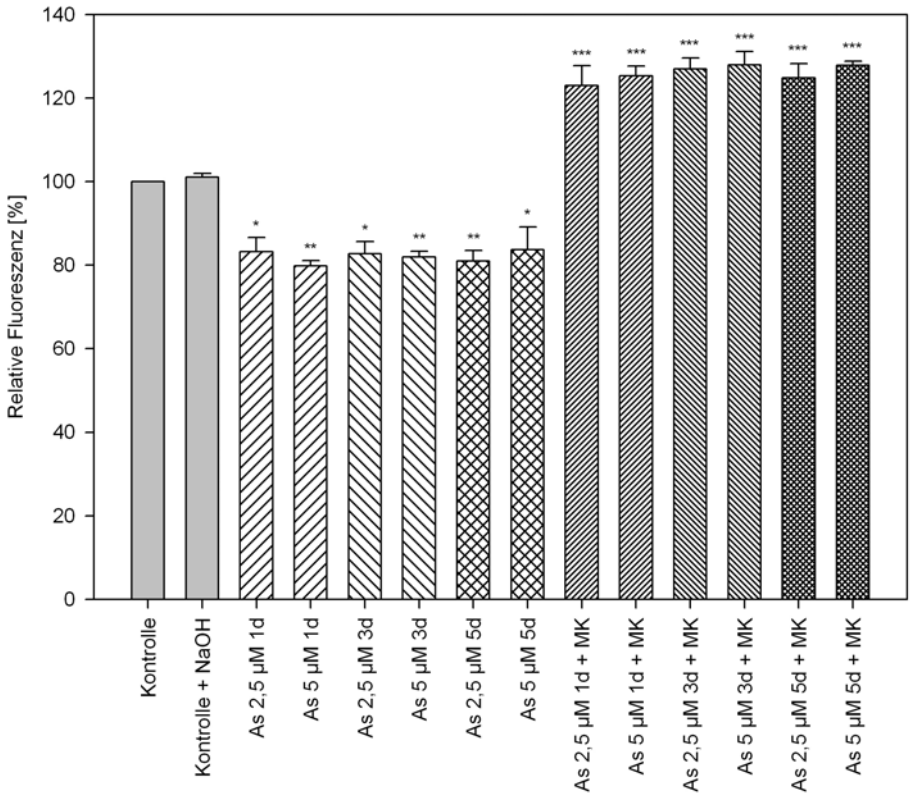



**Abb. 15 Der Transport von CDF durch MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) über 24 h, 3 und 5 Tage.**

H322 Zellen wurden über 24 h, 3 und 5 Tage mit As(III) inkubiert. Mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (5 mg/l) über drei Stunden. Anschließend wurde die Transportaktivität verschiedener MRP-Transporter in Summe indirekt über die Messung der intrazellulären Fluoreszenz bestimmt. Dargestellt ist jeweils die relative Fluoreszenz als Mittelwert aus drei Experimenten + SEM, bezogen auf in Abwesenheit von As(III) kultivierte H322 Zellen.

N=3, n=10; * $p \leq 0,05$ Signifikanz zu H322 ohne Vorbehandlung mit MK571; ** $p \leq 0,01$ Signifikanz zu H322 ohne Vorbehandlung mit MK571; *** $p \leq 0,001$ Signifikanz zu H322 ohne Vorbehandlung mit MK571;

**- Gentoxizität von Arsenit im Comet-Assay**

Zur Untersuchung des gentoxischen Potenzials von Arsenit in humanen Lungenzellkulturen wurden H322 Zellen über einen und fünf Tage mit Arsenit behandelt (2,5 µM und 5 µM). Anschließend wurden DNA-Schäden mittels Comet-Assay untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte jeweils relativ zu unbehandelten Kulturen. Auch in diesen Experimenten wurde zur Bewertung des Beitrags von MRP-Transportern zum Schutz der Zellen vor Arsenit Kulturen mitgeführt, die zusätzlich mit dem MRP-Inhibitor MK571 behandelt wurden. Das gesamte Experiment wurde sechsmal mit Zellen aus unterschiedlichen Passagen wiederholt. Nach Einwirkung von Arsenit für 24h

war weder anhand der Schweiflänge noch anhand des *Olive Tail Moment* (OTM) eine DNA-Schädigung erkennbar (vgl. Abb. 16, S.54). Die alleinige Behandlung mit MK571 schädigte das Erbgut der Zellen ebenfalls nicht. Bei gleichzeitiger Inkubation mit MK571 und Arsenit waren jedoch signifikante gentoxische Effekte erkennbar. Die mittleren Schweiflängen der Behandelten Kulturen waren bei 2,5 µM und 5 µM entsprechend auf das 1,7-fache und das 1,9-fache erhöht. Die Mittelwerte der Schweifmomente dieser Proben stiegen um den Faktor 1,6 und 1,8.

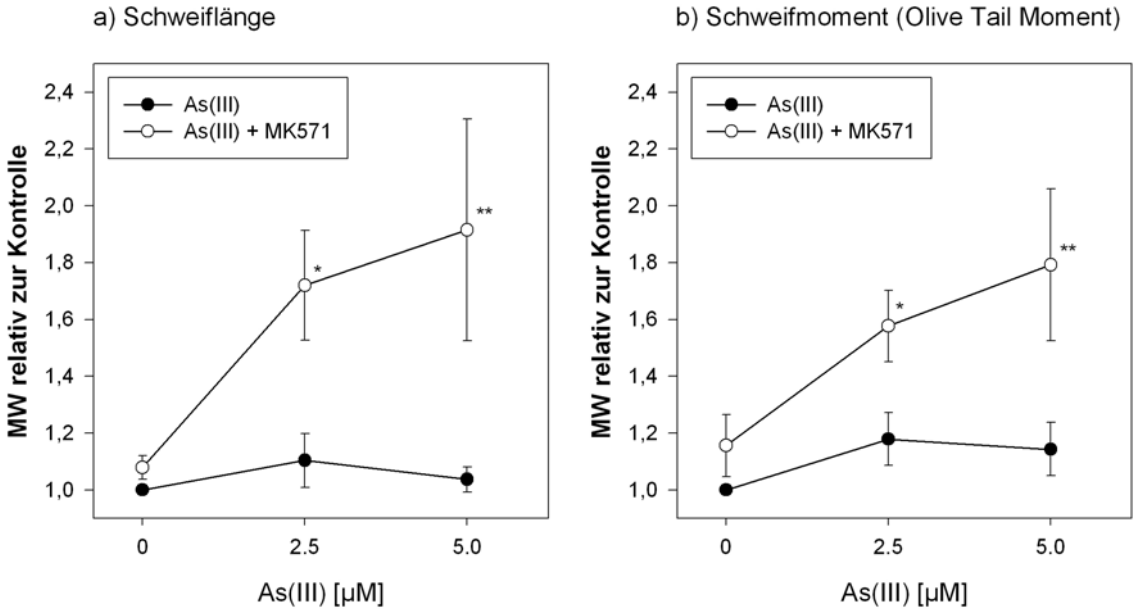



**Abb. 16 Genotoxizität von As(III) im Comet-Assay an H322 Zellen nach Inkubation über 24 h.**

H322 Zellen wurden über 24 h mit As(III) in Konzentrationen bis zu 5 µM inkubiert. Mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (20 mg/l) über 3 h. a) Schweiflänge und b) Schweifmoment im Comet-Assay. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM. Die Werte sind jeweils relativ zur Kontrolle ohne Arsenit und ohne MK571 angegeben.

n=12; * $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten H322; ** $p \leq 0,01$ Signifikanz zu unbehandelten H322.

Bei einer Inkubationszeit von fünf Tagen schädigte bereits Arsenit allein die DNA der Zellen deutlich (vgl. Abb. 17, S.55). Behandlung mit 2,5 µM Arsenit erhöhte die mittlere Schweiflänge das 2,8-fache der Kontrolle, bei 5 µM Arsenit stieg die mittlere Schweiflänge signifikant auf das 3,8-fache. Auch nach fünf Tagen führte MK571 nicht zu DNA-Schäden in den Kulturen. Simultane Behandlung mit MK571 und Arsenit erhöhte die DNA-Schäden durch Arsenit jedoch abermals deutlich. Die mittleren Schweiflängen zeigten bei 2,5 µM und 5 µM Arsenit signifikante Steigerungen, entsprechend auf das 4,5- und 5,6-fache der Kontrollen. Auch die mittleren Schweifmomente waren signifikant auf das 8,2- und 10-fache erhöht.

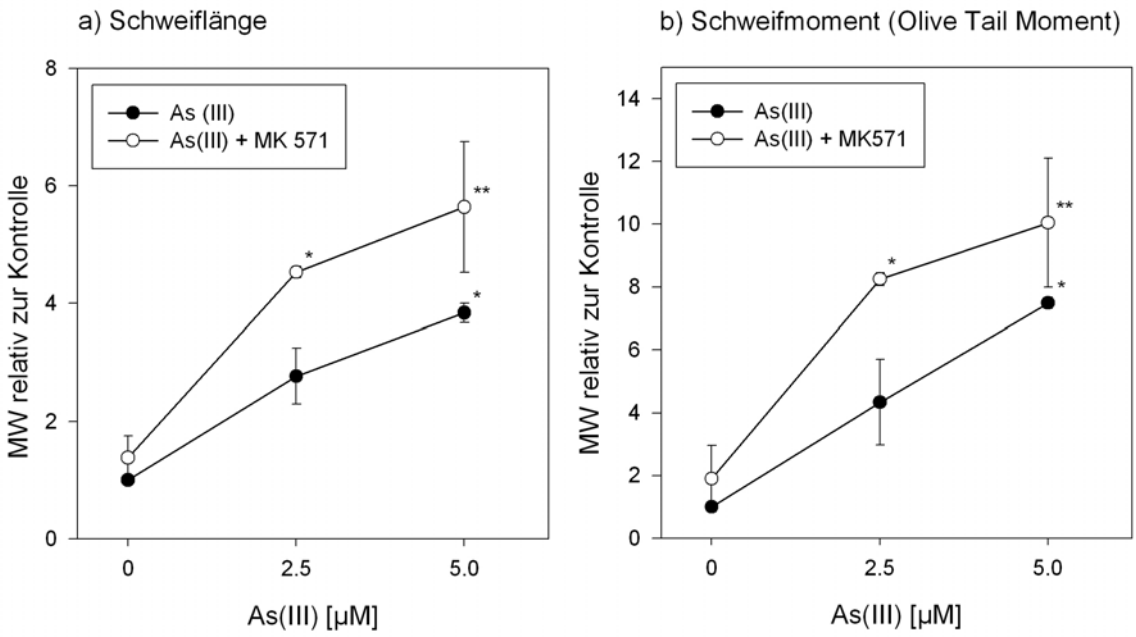



**Abb. 17 Genotoxizität von As(III) im Comet-Assay an H322 Zellen nach Inkubation über 5 d.**

H322 Zellen wurden über 5 Tage mit As(III) in Konzentrationen bis zu 5 µM inkubiert. Mit und ohne MK571 (20 mg/l). a) Mittlere Schweiflänge und b) Schweifmoment im Comet-Assay. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM. Die Werte sind jeweils relativ zur Kontrolle ohne Arsenit und ohne MK571 angegeben.

n=4; * $p \leq 0{,}05$ Signifikanz zu unbehandelten H322; ** $p \leq 0{,}01$ Signifikanz zu unbehandelten H322.

### 3.2.2 Wirkung von Arsenit auf normale humane Bronchialepithelzellen

**- Zytotoxizität von Arsenit in normalen Bronchialzellen**

Die Wirkung von As(III) auf die Vitalität primärer Kulturen von NHBE-Zellen wurde ebenfalls mittels MTT-Assay untersucht. Hier zeigte sich in den Experimenten mit den Kulturen von B242/3/II nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Reduktion der Vitalität um 23 % ab 25 µM As(III) (vgl. Abb. 18, S.56). Bei den Vitalitätsbestimmungen an den NHBE-Zellen wurden ebenfalls Kulturen mitgeführt, denen drei Stunden vor der Beimpfung mit As(III) MK571 (5 mg/l) zugegeben wurde. Mit MK571 vorbehandelte Kulturen von B242/3/II wiesen bei 5 µM As(III) eine signifikant um 30% verringerte Vitalität auf. Die Behandlung mit MK571 alleine hatte keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen. Die mit MK571 vorinkubierten Kulturen zeigten bei Konzentrationen zwischen 5 und 10 µM As(III) signifikant reduzierte Vitalität im Vergleich zu den nur mit As(III) behandelten Zellen, bei höheren Konzentrationen bis 30 µM war dieser Effekt weiterhin als Tendenz erkennbar, aufgrund der Streuungen jedoch nicht mehr signifikant. Bemerkenswert ist an den Ergebnissen dieses Experiments, dass sich die Vitalitätskurven der Experimente mit und ohne Inhibitor bei Konzentrationen ab 25 µM Arsenit einander annäherten. Dies könnte auf das Vorhandensein eines nicht durch MK571

blockierbaren Schutzmechanismus in diesen Zellen hindeuten. Die Experimente an H322 Zellen und an den Kulturen von B246/3/I zeigten keinen derartigen Effekt.

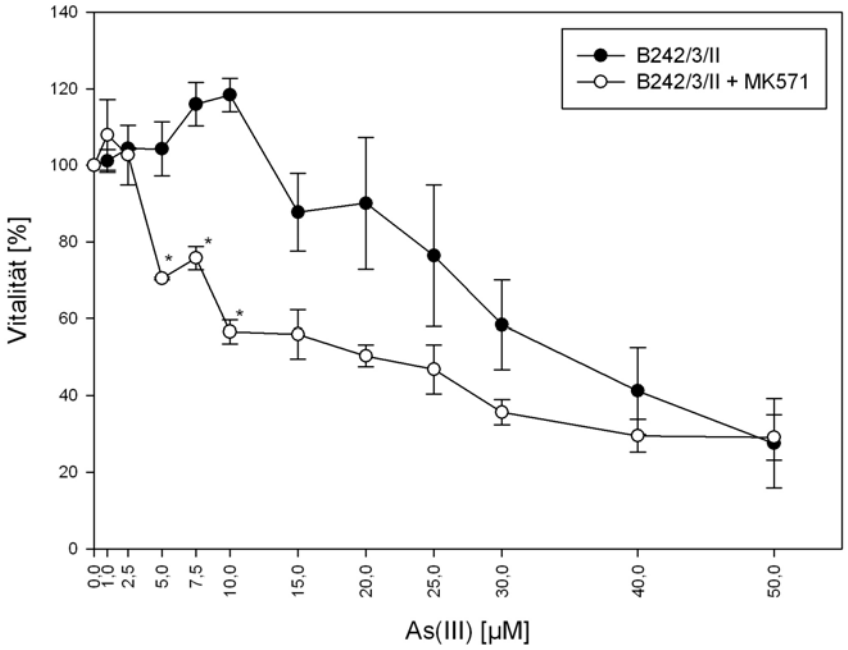



**Abb. 18 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patient 242/3/II) nach Inkubation mit As(III) über 24 h.**

Vergleich der Experimente mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (5 mg/l) über 3 h. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert aus zwei Experimenten ± SEM bezogen auf in Abwesenheit von As(III) kultivierte NHBE-Zellen.

N=2, n=2; * $p \leq 0{,}05$ Signifikanz zu Kulturen von B242/3/II ohne Vorbehandlung mit MK571, jedoch mit As(III) in der jeweils entsprechenden Konzentration. Bei den NHBE-Zellen ohne Vorbehandlung mit MK571 ist ab 25 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten NHBE-Zellen signifikant um 23 % reduziert ($p \leq 0{,}05$). Bei den NHBE-Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 über 3 h ist bei 5 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 über drei Stunden, ohne As(III) signifikant um 30 % reduziert.

Bei der Wiederholung des Experiments mit Kulturen von B246/3/I war die Vitalität der Zellen bereits ab 5 µM As(III) signifikant um 25 % reduziert (vgl. Abb. 19, S.57). Nach Vorbehandlung der Kulturen mit MK571 (5 mg/l) führten bereits 2,5 µM As(III) zu einer Verringerung der Vitalität um 34 % (vgl. Abb. 19, S.57). Die Kulturen von B246/3/I zeigten nach Vorbehandlung mit MK571 bei 25 µM und 35 µM As(III) signifikant reduzierte Vitalität, verglichen mit den nicht vorbehandelten.

Die Vitalitätstests an den Primärkulturen von NHBE-Zellen zeigten nach Inkubation mit Arsenit Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den Kulturen von verschiedenen Spendern. Obwohl die Ergebnisse der MTT-Assays mit den NHBE-Zellen aufgrund der bei Primärkulturen häufiger zu beobachtenden Streuungen den Effekt des MRP-Inhibitors MK571 weniger deutlich zeigten, ist auch

hier bei den mit MK571 vorbehandelten Kulturen eine erhöhte Sensibilität der Zellen gegenüber As(III) erkennbar. Dies lässt darauf schließen, dass mindestens einer der durch MK571 inhibierten MRP-Transporter MRP1-5 einen Beitrag zum Schutz der NHBE-Zellen vor der Toxizität des Arsenits leistet.

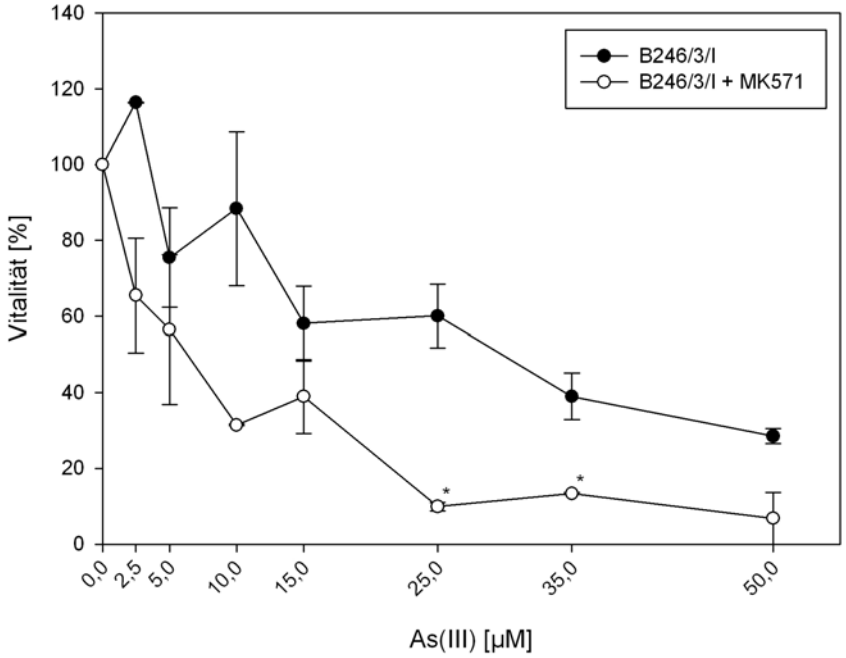



**Abb. 19 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patient 246/3/I) nach Inkubation mit As(III) über 24 h.**

Vergleich der Experimente mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (5 mg/l) über 3 h. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert aus zwei Experimenten ± SEM bezogen auf in Abwesenheit von As(III) kultivierte NHBE-Zellen.

N=2, n=3; * $p \leq 0{,}05$ Signifikanz zu Kulturen von B246/3/I ohne Vorbehandlung mit MK571, jedoch mit As(III) in der jeweils entsprechenden Konzentration. Bei den NHBE-Zellen ohne Vorbehandlung mit MK571 ist ab 5 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten NHBE-Zellen um 25 % reduziert. Bei den NHBE-Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 über 3 h ist ab 2,5 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 über drei Stunden, ohne As(III) um 34 % reduziert.

**- Langzeitwirkung von Arsenit in normalen Bronchialzellen**

Zur Untersuchung des Langzeiteffekts von Arsenit in geringen Konzentrationen auf die Expression der mRNA von MRP1, 2, 3, 4, 5 und UMAT in Primärkulturen von NHBE-Zellen wurden diese über einen Zeitraum von acht Wochen kultiviert. Dabei wurden die Zellen kultiviert und mit Arsenit (1 µM und 2,5 µM) behandelt, wie unter 2.1.7 beschrieben. Jeweils nach Abschluss einer fünftägigen Behandlung mit Arsenit wurden von jeder Dosisgruppe jeweils zwei Schalen mittels *Real-time* PCR untersucht. Dieser Ablauf wurde bis zum Abschluss der sechsten Behandlung der Kulturen mit Arsenit

wiederholt (vgl. Abb. 20, S.58). Die Experimente wurden mit Material von drei Patienten (B182, B201, B222) durchgeführt. Da das Gewebe, aus dem die Primärkulturen gewonnen wurden, nur in sehr begrenztem Umfang zu Verfügung stand, konnten in jeder Dosisgruppe nur jeweils zwei Kulturen untersucht werden.

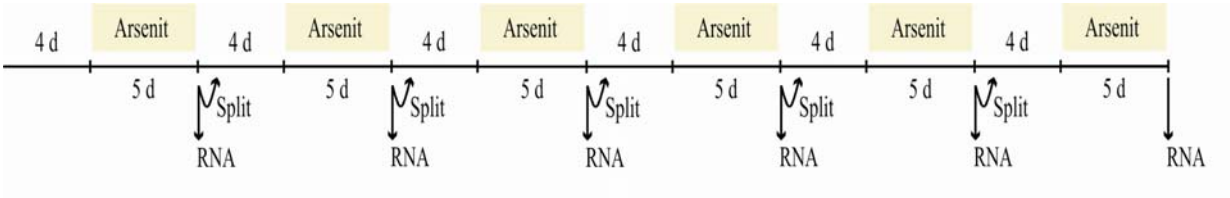



**Abb. 20 Schematischer Ablauf der Langzeitversuche mit Arsenit an normalen humanen Bronchialepithelzellen.**

Die Zellen wurden jeweils über fünf Tage mit Arsenit (1 µM und 2,5 µM) behandelt (vgl. 2.1.7).

Während des Experiments wurden auch Kulturen mitgeführt, denen anstatt Arsenit 1 µl 3,75 mM NaOH-Lösung pro ml Medium zugegeben wurde, um vergleichbare Bedingungen zu den mit Arsenit behandelten Kulturen zu schaffen, da bei der Herstellung der Arsenitstammlösung Natriumhydroxid zugesetzt wurde, um das $As_2O_3$ zu lösen. Die Zugabe des Natriumhydroxids führte zu einer vernachlässigbaren Erhöhung des Natriumgehalts im Medium (130 mM) um 0,003 %, der pH-Wert des Mediums blieb unverändert. Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von bis zu vier fünftägigen Arsenitbehandlungen innerhalb einer Kulturdauer von bis zu 36 Tagen. Bei der Analyse der Wirkung der Arsenitbehandlung auf die MRP-Expression der NHBE-Zellen dienten die nur unter Zugabe von NaOH kultivierten Zellen als Bezugspunkt. Der Verlauf der MRP-Expression in den Kontrollen ist unter 3.1.2 dargestellt. Die Expression der untersuchten MRP-Transporter wurde auf mRNA-Ebene semi-quantitativ mittels *Real-time* RT-PCR bestimmt. Diese Messungen wurden an jeder Kultur in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus den bereits unter 2.2.4 und 3.1.2 ausgeführten Gründen ist hierfür ein in seiner Expression durch die Langzeitbehandlung mit Arsenit nicht moduliertes Referenzgen als Bezug erforderlich. Als potenzielle Referenzgene wurden GAPDH und 18S rRNA untersucht. Wie aus Tab. 13 (Anh.) (S.157) ersichtlich, mussten für die Auswertung der Experimente mit den Kulturen der unterschiedlichen Patienten verschiedene Referenzgene verwendet werden. Als Referenzgen für die Analyse der Expression der untersuchten MRP-Transporter in den Kulturen von B182 wurde GAPDH gewählt, da die Expression dieses Gens durch die Behandlung mit Arsenit nicht beeinflusst wurde. Die Expressionsanalyse der MRP-mRNA in den Kulturen von B201 nach der ersten und vierten Behandlung mit Arsenit wurde auf 18S rRNA bezogen, nach der zweiten und dritten Behandlung wurde GAPDH als Referenzgen verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Referenzgene wurden die Experimente an den Kulturen der verschiedenen Patienten getrennt ausgewertet und die Expression der untersuchten MRP-Transporter in den behandelten Kulturen auf die unbehandelten Kulturen des entsprechenden Patienten bezogen. In den untersuchten Proben war

mit der verwendeten Methode zu keinem Zeitpunkt eine Expression von MRP2 und UMAT nachweisbar.

Fünftägige Inkubation mit Arsenit hatte keinen Effekt auf die Expression der mRNA von MRP1, sowohl in den Kulturen von B182 als auch in denen von B201 (vgl. Abb. 21, S.60; Tab. 14 (Anh.), S.158). Die mittlere Expression von MRP3 war in den mit 2,5 µM Arsenit behandelten Kulturen signifikant erhöht, bei B182 und B201 entsprechend auf das 1,4-fache und das 1,5-fache. Bereits in den mit 1 µM Arsenit behandelten Kulturen von B182 kam es zu einer signifikanten Induktion von MRP4 auf das 1,8-fache, bei 2,5 µM Arsenit auf das 2,1-fache. In B201 zeigte sich in den mit 2,5 µM Arsenit behandelten Kulturen jeweils eine signifikant auf das 1,6-fache gesteigerte Expression von MRP4 und 5. Auch in B182 steigerten 2,5 µM Arsenit die MRP5-Menge signifikant auf das 2,3-fache.

Nach der zweiten fünftägigen Behandlung mit Arsenit war die MRP1-mRNA Menge in den Kulturen von B182 nicht signifikant verändert (vgl. Abb. 22, S.61; Tab. 15 (Anh.), S.158). In den Kulturen von B201 jedoch war die Expression von MRP1 signifikant reduziert, bei 1 und 2,5 µM Arsenit entsprechend auf das 0,5- und 0,4-fache. Die Kontrollen von B182 und B201 unterschieden sich nicht signifikant in ihrer MRP1-Expression, wohingegen die mittlere mRNA-Menge von MRP3 in den unbehandelten Kulturen von B201 2,6-fach höher war als in denen von B182 (vgl. Tab. 5, S.62). Die Transkriptmengen von MRP3, 4 und 5 wurde in den Kulturen von B182 durch die fortgesetzte Arsenitbehandlung nicht beeinflusst. Die Expression von MRP3 war in den mit 1 µM behandelten Kulturen von B201 auf die Hälfte reprimiert, die mit 2,5 µM inkubierten Kulturen zeigten keinen signifikanten Effekt der Behandlung, sie wiesen jedoch eine signifikant höhere MRP3-Menge auf (2,4-fach), verglichen mit den Kulturen von B182 aus derselben Dosisgruppe. Die mit 1 und 2,5 µM Arsenit inkubierten Kulturen von B201 zeigten eine auf das 0,4-fache reduzierte mittlere Expression von MRP4, die mRNA-Menge von MRP5 in diesen Kulturen war auf das 0,5-fache reprimiert. Die unbehandelten Kulturen von B182 und B201 unterschieden sich nicht signifikant in ihren Transkriptmengen, sowohl bei MRP4 als auch bei MRP5.

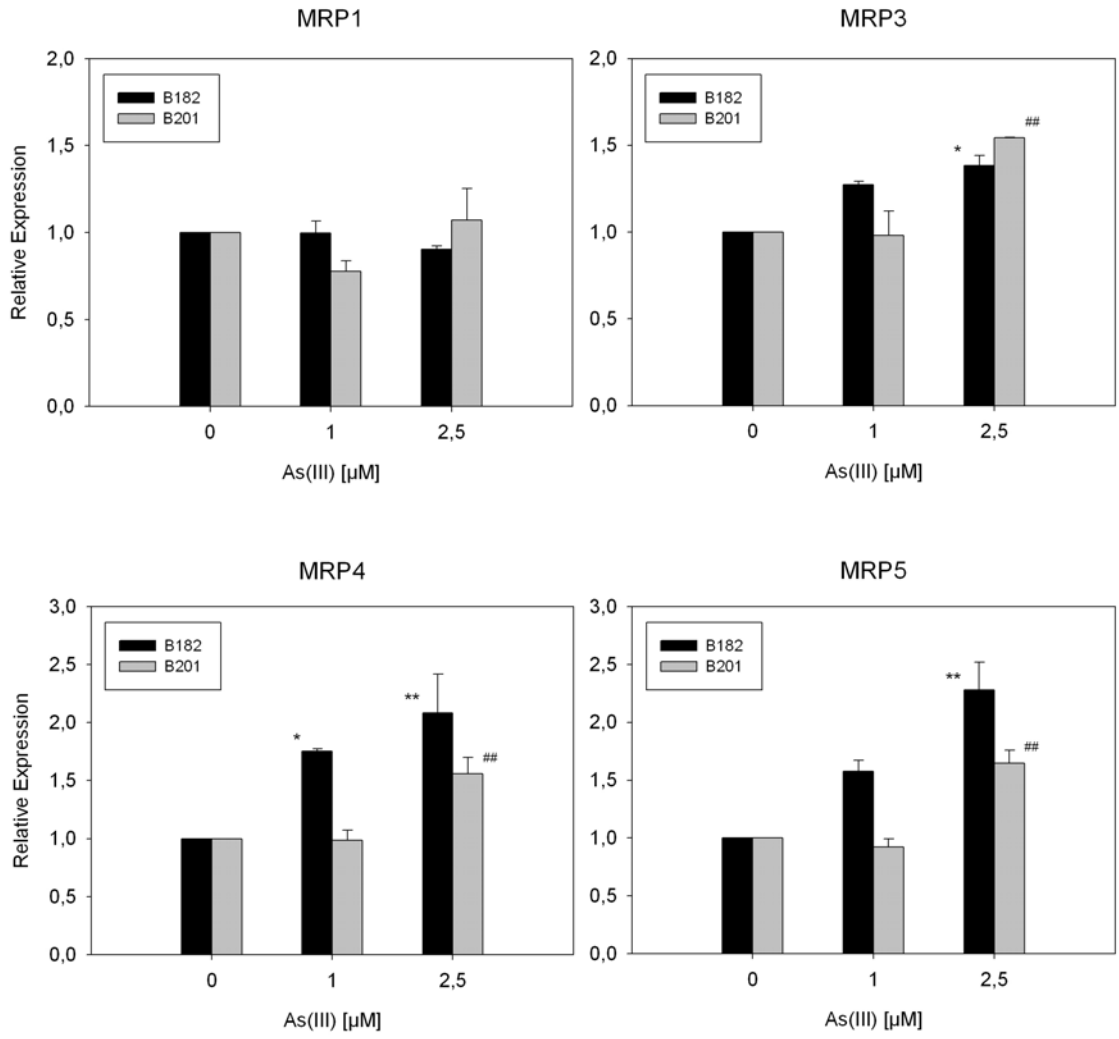



**Abb. 21 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach Inkubation mit As(III) über 5 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgene: B182: GAPDH; B201: 18S rRNA. Mittelwert der relativen Expression + SEM bezogen auf die unbehandelten Kulturen des jeweiligen Patienten. N=2; n =4;

* $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B182; ** $p \leq 0,01$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B182; $^{\#\#}$ $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B201.

Vergleicht man die Expressionsmuster der MRP-Transporter in B182 nach der ersten und der zweiten fünftägigen Behandlung mit Arsenit kann man zusammenfassend feststellen, dass die Effekte des Arsenit durch den Einfluss der Kulturdauer von 18 Tagen deutlich überwogen wurden (vgl. Abb. 23, S.62). Beim Vergleich der MRP1-Expression der Kontrollen nach der ersten und der zweiten Inkubation mit Arsenit ist eine signifikante Reduktion auf das 0,6-fache zu erkennen, auch die behandelten Kulturen zeigen diesen Effekt, er ist hier jedoch nicht signifikant. Vergleicht man jedoch die MRP3-mRNA-Menge zeigen alle Proben nach der zweiten Behandlung und der damit

verbundenen längeren Kulturdauer eine signifikante Repression von MRP3, ungefähr auf das 0,2-fache der Expression der Kontrolle nach neun Tagen in Kultur. Die Expression von MRP4 war in den Kontrollen über den Verlauf der ersten 18 Tage unverändert. Im Unterschied zur ersten Arsenitbehandlung, die zu einer Induktion von MRP4 führte war nach der zweiten Behandlung kein Effekt mehr auf die MRP4-Expresion erkennbar. Die MRP5-mRNA-Menge in den Kontrollen blieb über die ersten 18 Tage ebenfalls gleich. Die MRP5-Expression ist nach der zweiten Behandlung in allen Kulturen auf dem Niveau der Kontrollen, der Expressionsunterschied zwischen der ersten und der zweiten Inkubation mit 2,5 µM Arsenit kann wegen der Streuung der Daten nicht abschließend beurteilt werden.

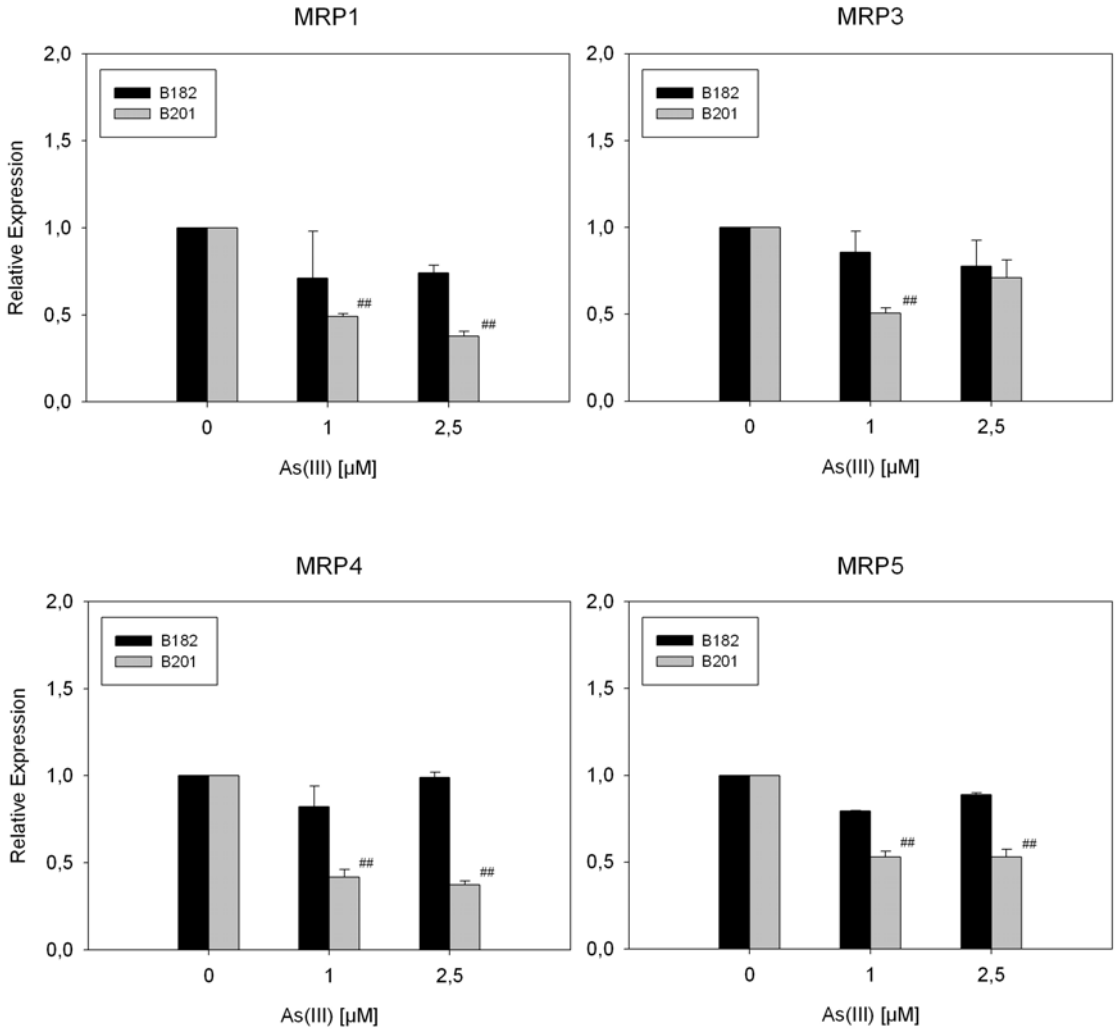



**Abb. 22 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach der zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgene: B182 und B201: GAPDH. Mittelwert der relativen Expression + SEM, bezogen auf die unbehandelten Kulturen des jeweiligen Patienten nach der zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III). n=4; $^{\#}$ $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B201; $^{\#\#}$ $p \leq 0,01$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B201.

**Tab. 5 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen des Langzeitexperiments nach der zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Mittelwert der relativen Expression bezogen auf das Referenzgen GAPDH ± SEM.

| Patient: | MRP1 | MRP3 | MRP4 | MRP5 |
|---|---|---|---|---|
| B182 | 0,67±0,01 | 0,27±0,03 | 0,50±0,14 | 0,70±0,10 |
| B201 | 0,97±0,03 | 0,71±0,02 | 0,82±0,14 | 0,70±0,10 |

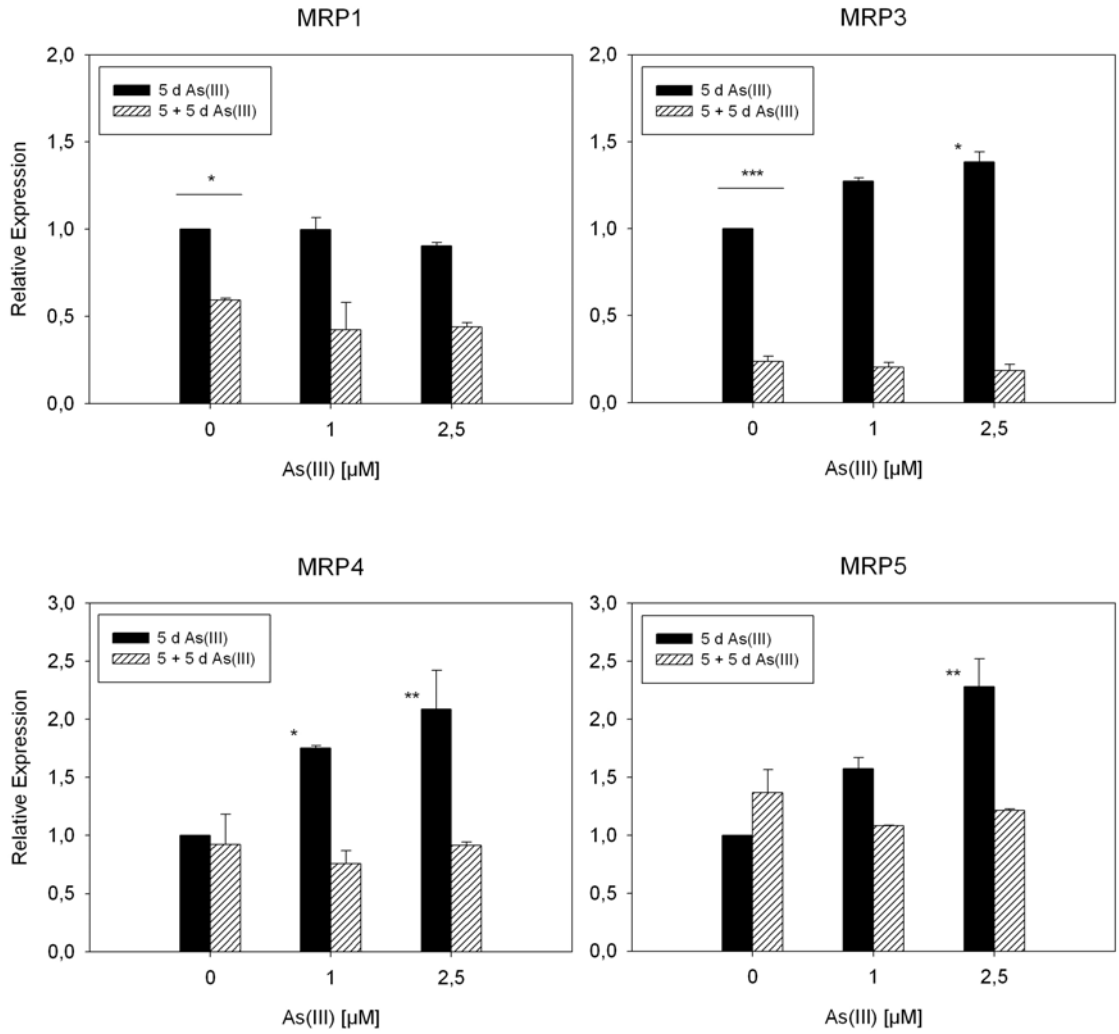



**Abb. 23 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B182) nach der ersten und zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelten Kulturen von B182 nach der ersten Woche. n=4 * $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B182; ** $p \leq 0,01$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B182.

Die dritte Inkubation mit Arsenit hatte in den Kulturen von B201 keine Wirkung auf die Expression von MRP1 (vgl. Abb. 24, S.63 und Tab. 16 (Anh.), S.159). MRP3 dagegen war in den mit 1 und 2,5 µM behandelten Proben entsprechend auf das 0,4- und 0,6-fache reduziert. Die mRNA-Menge von MRP4 und 5 blieb in allen Kulturen unverändert.

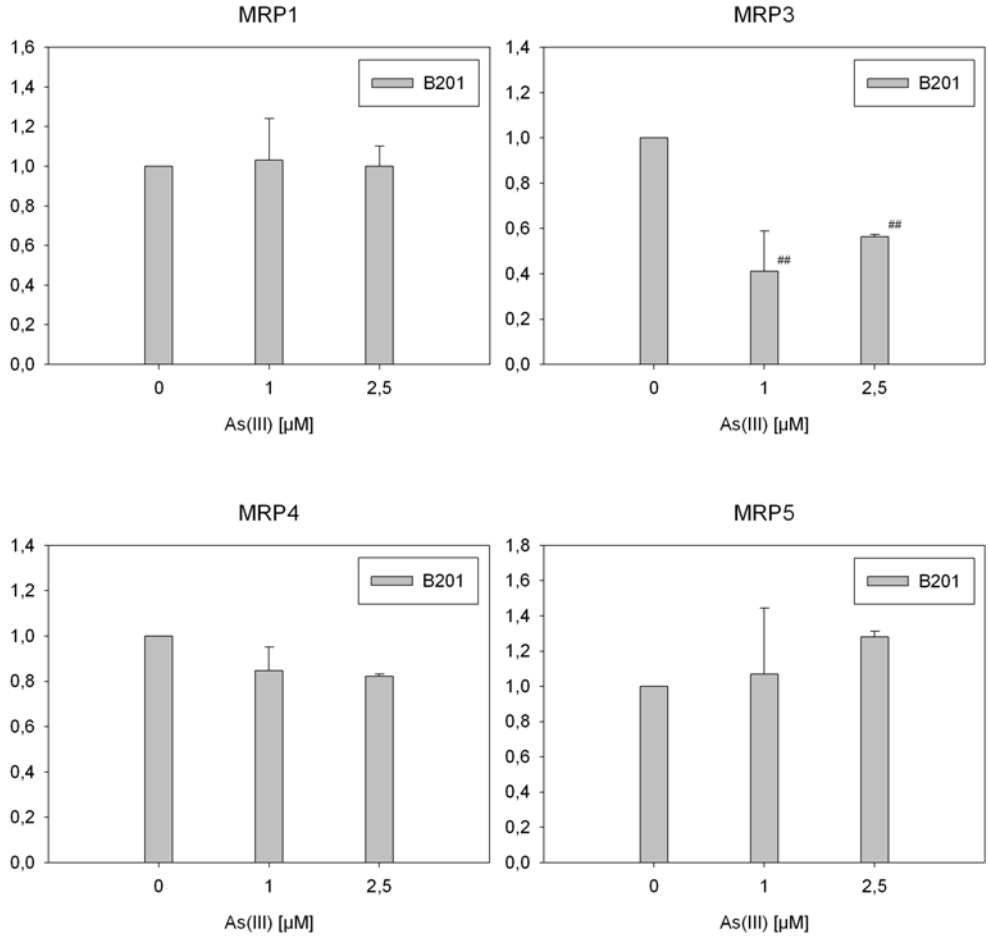



**Abb. 24 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B201) nach der dritten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelten Kulturen von B201.

N=1; n=4; $^{\#\#}$ $p \leq 0{,}01$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B201.

**Tab. 6 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen des Langzeitexperiments nach der dritten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Mittelwert ± SEM der relativen Expression bezogen auf das Referenzgen GAPDH.

| Patient: | MRP1 | MRP3 | MRP4 | MRP5 |
|---|---|---|---|---|
| B201 | 1,02±0,22 | 1,57±0,04 | 0,98±0,19 | 0,80±0,14 |

Nach der vierten fünftägigen Behandlung mit Arsenit war wieder kein Einfluss auf die Expression von MRP1 erkennbar (Abb. 25, S.64 und Tab. 17 (Anh.), S.159). MRP3 war jedoch in den mit 1 und 2,5 µM inkubierten Kulturen auf das 1,5- und 2,2-fache erhöht. Die Expression von MRP4 und 5 war von der Arsenitbehandlung unbeeinflusst.

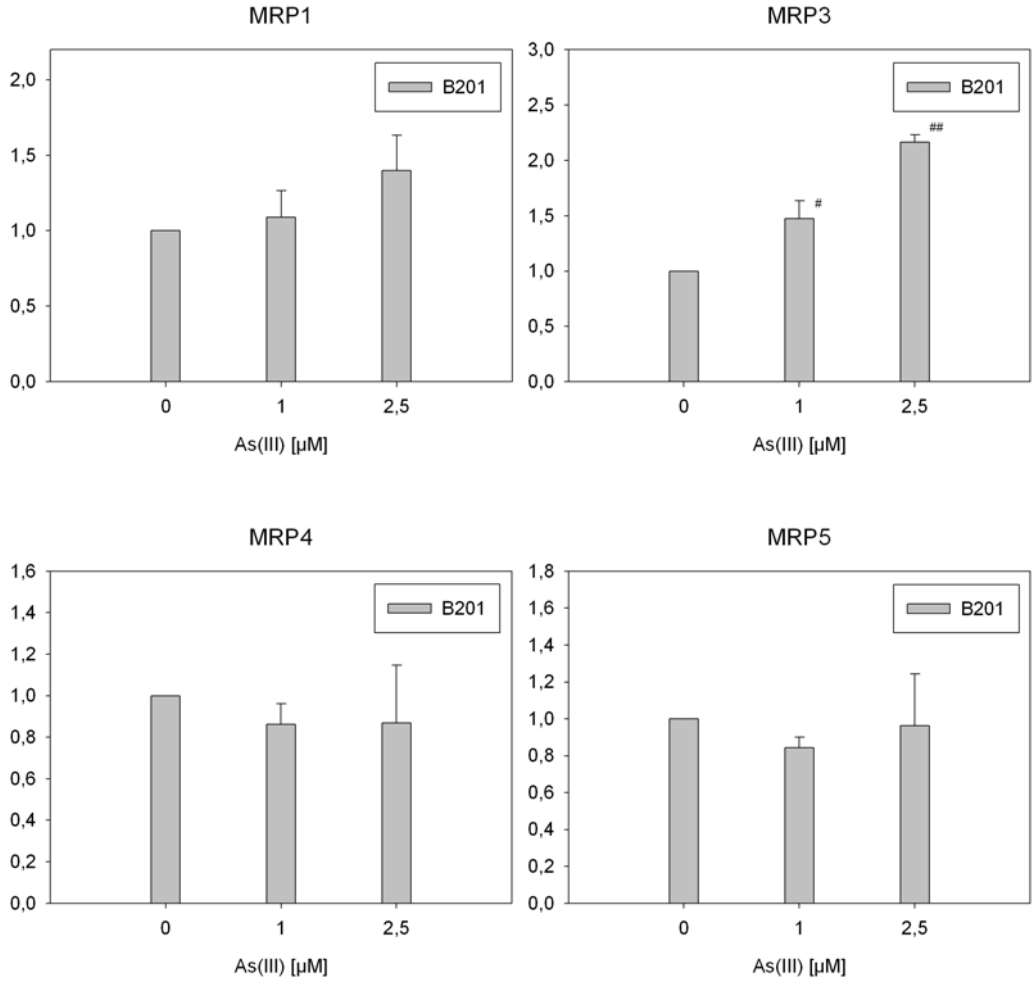



**Abb. 25 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B201) nach der vierten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S RNA. Relative Expression ± SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kulturen von B201. N=1; n=4

$^{\#}$ $p \leq 0{,}05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B201.

**Tab. 7 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen des Langzeitexperiments nach der vierten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Mittelwert der relativen Expression ± SEM, bezogen auf das Referenzgen 18S RNA.

| Patient: | MRP1 | MRP3 | MRP4 | MRP5 |
|---|---|---|---|---|
| B201 | 0,68±0,08 | 0,39±0,08 | 0,72±0,30 | 0,83±0,39 |

**- Zellmorphologie unter Arsenit im Langzeitversuch**

Die Untersuchung der Kulturen von B182 aus dem Langzeitexperiment mit Arsenit unter dem Phasenkontrastmikroskop zeigte morphologische Veränderungen in den behandelten Zellen. Nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Arsenit waren sowohl in den mit 1 µM als auch in den mit 2,5 µM Arsenit inkubierten Zellen zytoplasmatische Vesikel erkennbar, weiterhin zeigten die behandelten Kulturen schwächer erkennbare Zellgrenzen (vgl. Abb. 26, S.65). Die Form der Zellen war unter Arsenitbehandlung unverändert epitheltypisch polygonal. Kerne und Membranen der Zellen waren intakt. Wie aus der vergleichbaren Konfluenz der Kulturen erkennbar ist, hatte Arsenit in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

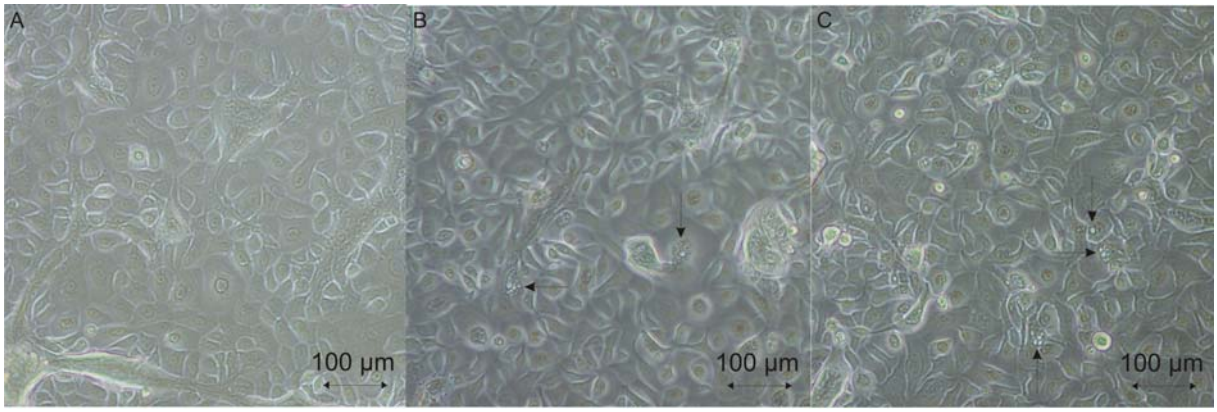



**Abb. 26 Die Kulturen von B182 nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Arsenit.**

Der Effekt von Arsenit auf die Morphologie der Zellen. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Kulturen. (A) Kontrolle; (B) 1 µM Arsenit; (C) 2,5 µM Arsenit. Die Pfeile zeigen zytoplasmatische Vesikel.

**- Zytotoxizität von Arsenit im Langzeitversuch**

Nach Abschluss der sechsten Behandlung der NHBE-Zellen im Langzeitexperiment mit Arsenit an den Kulturen von B222 wurden die Zellen mit Trypsin geerntet, nach Dosisgruppen getrennt auf 24-Wells ausgesät und in der Folge über 67 Stunden mit Arsenit in Konzentrationen von 0 bis 50 µM behandelt. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Zur Ermittlung der Vitalität wurden dabei jeweils die Kulturen der jeweiligen Dosisgruppe als Bezug verwendet, denen zu Beginn der 67-stündigen Inkubation kein Arsenit zugesetzt worden war. Bei den nicht mit Arsenit vorbehandelten Kulturen führten bereits Konzentrationen von 2,5 µM Arsenit zu einer Reduktion der Vitalität auf 77 % (vgl. Abb. 27, S.66). Bei den sechsmal für fünf Tage mit 1 µM Arsenit vorbehandelten Zellen war die Vitalität nach 67-stündiger Inkubation mit 5 µM Arsenit auf 78 % reduziert. Vergleicht man den Verlauf der Vitalität der Kulturen aus dem Langzeitversuch im 67h-Experiment mit Arsenit zwischen den mit 1 µM Arsenit vorbehandelten und den in Abwesenheit von Arsenit kultivierten Zellen, zeigt sich bei 5 und 7,5 µM eine signifikant höhere Toleranz der mit Arsenit vorinkubierten Kulturen. Dies spricht für eine Anpassung der Zellen an die Kultur in Gegenwart geringer Mengen Arsenit im Verlauf des Langzeitexperiments.

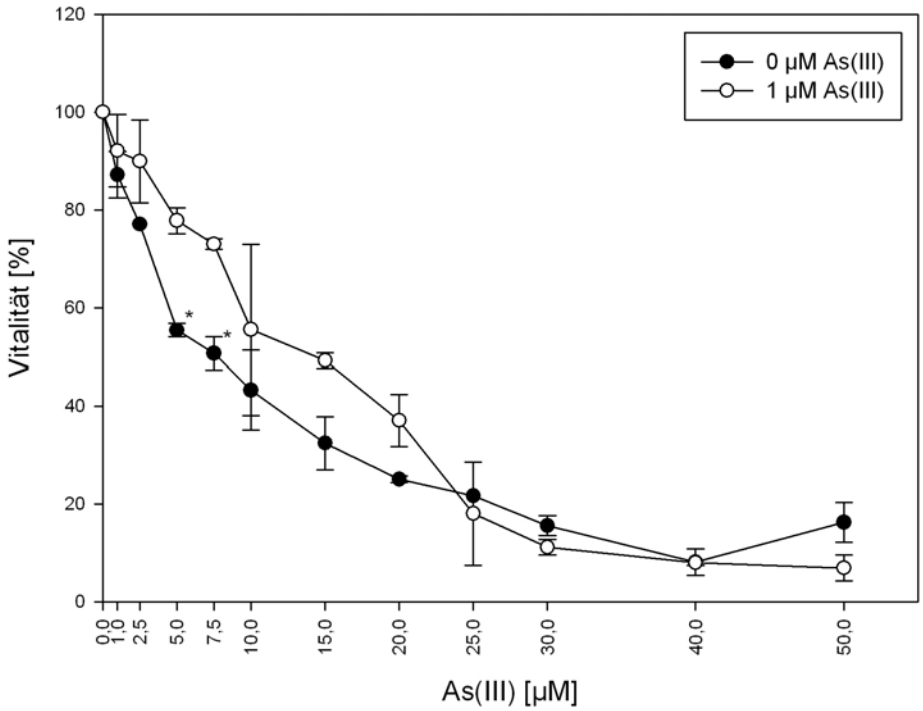



**Abb. 27 Vergleich der Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patient 222/6/I) mit und ohne Vorbehandlung mit Arsenit (6x 5 Tage) nach Inkubation mit As(III) über 67 h.**

NHBE-Zellen aus dem Langzeitversuch mit Arsenit an B222 (Behandlung: 6x 5 Tage mit 0 µM oder 1 µM Arsenit) wurden anschließend über 67 h mit As(III) in Konzentrationen bis zu 50 µM inkubiert. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert aus zwei Experimenten ± SEM bezogen auf in diesen 67 h ohne As(III) kultivierte NHBE-Zellen aus demselben Langzeitversuch.

N=2, n=2; * $p \leq 0{,}05$ Signifikanz zu Kulturen von B222/6/I ohne Vorbehandlung mit Arsenit (0 µM), jedoch mit As(III) in der jeweils entsprechenden Konzentration. Bei den Kulturen ohne Vorbehandlung mit Arsenit ist ab 2,5 µM As(III) die Vitalität im Vergleich zu ohne erneute Zugabe von Arsenit kultivierten Zellen um 23 % reduziert. Bei den Kulturen, die mit Arsenit (1 µM) vorbehandelt wurden, ist ab 5 µM As(III) die Vitalität um 22 % reduziert, im Vergleich zu ohne erneute Zugabe von Arsenit kultivierten Zellen, die jedoch mit Arsenit vorbehandelt wurden.

## 3.3 Die Wirkung von Cu(II) auf humane Lungenzellkulturen

### 3.3.1 Wirkung von Cu(II) auf H322 Lungentumorzellen

**- Zytotoxizität von Cu(II)**

Der Effekt von Cu(II) auf die Vitalität von Lungenzellkulturen wurde mit dem MTT-Assay untersucht. Die Ergebnisse dienten zum einen der Ableitung der Konzentrationen für die Experimente zur Untersuchung der Wirkung von Cu(II) auf die Expression von MRP-Transportern, und zum anderen bei gleichzeitiger Inkubation mit MK571 (20 mg/l), einem Inhibitor von MRP1 bis 5 (Gekeler et al., 1995; Rius et al., 2003; Haimeur et al., 2004), als Modell zur Untersuchung des Beitrags der MRP-Transporter zum Schutz der Zellen vor den toxischen Effekten von Cu(II). Zur Bestimmung der Vitalität wurde jeweils die Vitalität der ohne Metallzugabe kultivierten Zellen als Bezug verwendet. Zur Inkubation der Zellen wurden Verdünnungen einer Lösung von $CuSO_4 \cdot 6H_2O$ in bidest. Wasser verwendet. Diese Lösung wurde vor der Verwendung durch einen Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert.

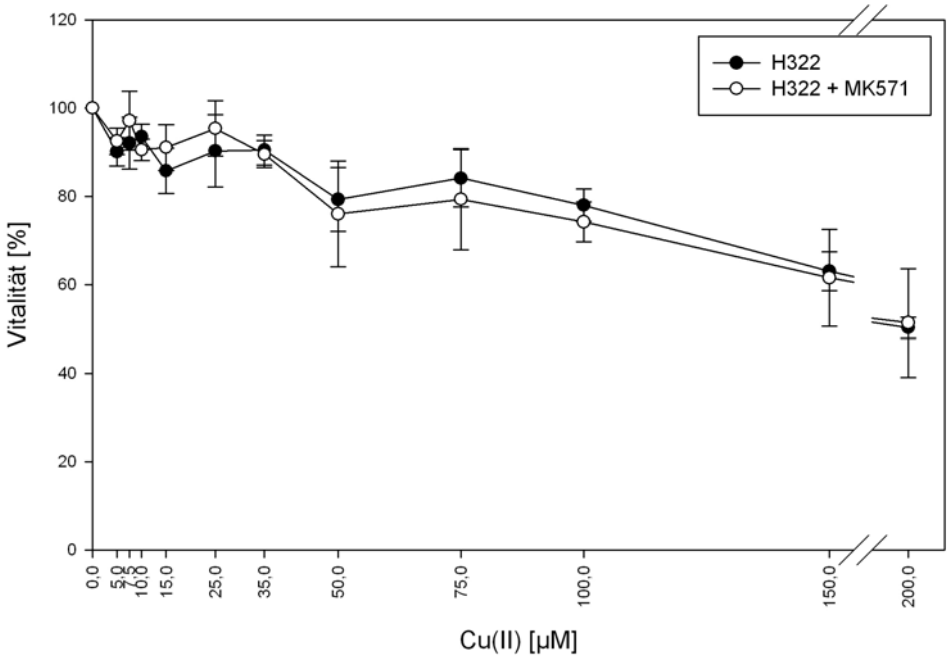



**Abb. 28 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit Cu(II) über 24 h.**

Vergleich der Experimente mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (20 mg/l) über 3 h. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert ± SEM bezogen auf in Abwesenheit von Cu(II) kultivierte H322 Zellen. N=4, n=2;

Bei H322 Zellen ohne Vorbehandlung mit MK571 ist bei 50 µM Cu(II) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten H322 um 21 % reduziert ($p \leq 0,05$). Bei H322 Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 ist bei 50 µM Cu(II) die Vitalität im Vergleich zu Zellen mit Vorbehandlung mit MK571, ohne Cu(II), um 24 % reduziert ($p \leq 0,05$).

H322 Zellen, die 24 Stunden mit Cu(II) inkubiert wurden, zeigten bei einer Konzentration von 50 µM eine Vitalität von 79 %. Die gleiche Konzentration von Cu(II) führte bei Kulturen von H322, denen drei Stunden vor der Cu(II)-Zugabe MK571 zugesetzt wurde, zu einer Reduktion der Vitalität auf 76 % (vgl. Abb. 28, S.67). Vergleicht man die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests mit und ohne Vorinkubation mit MK571, ist im untersuchten Konzentrationsbereich kein signifikanter Unterschied erkennbar. Nachdem die Behandlung mit Cu(II) sowohl mit als auch ohne MK571 bei hohen Konzentrationen von Cu(II) zu einer deutlichen Reduktion der Vitalität der Zellen in vergleichbarem Umfang führte, lässt sich schließen, dass die Transporter MRP1 bis 5 unter diesen Bedingungen keinen biologisch relevanten Beitrag zum Schutz der H322 Zellen vor der toxischen Wirkung von Cu(II) haben.

Bei 72-stündiger Inkubation von H322 Zellen mit Cu(II) führten bereits 5 µM Cu(II) zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität auf 80 % (vgl Abb. 29, S.68).

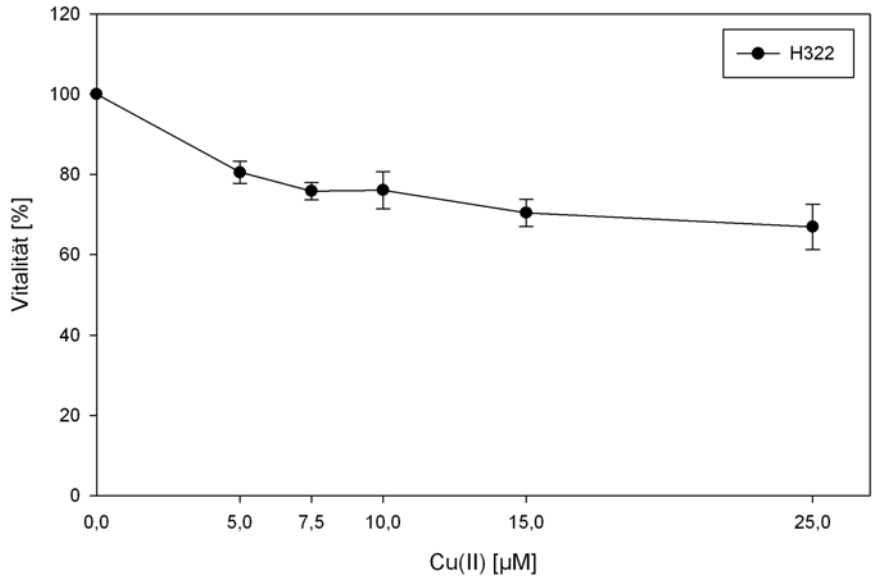



**Abb. 29 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit Cu(II) über 72 h.**

Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert ± SEM bezogen auf in Abwesenheit von Cu(II) kultivierte H322 Zellen.

N=2, n=4; Bei Konzentrationen ab 5 µM Cu(II) ist die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten H322 signifikant auf 80 % reduziert ($p \leq 0{,}01$).

**- Expression von MRP-mRNA unter dem Einfluss von Cu(II)**

Die Expression der Transporter MRP1, 3, 4, 5 und UMAT wurde nach 24-stündiger Behandlung von H322 Zellen mit Cu(II) auf mRNA-Ebene semi-quantitativ mittels *Real-time* RT-PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde GAPDH gewählt, da dieses Gen unter den Versuchsbedingungen gleichmäßig exprimiert war (vgl. Tab. 18 (Anh.), S.159). Nach Inkubation der H322 Zellen über 24 h mit Cu(II) war auf RNA-Ebene keine Veränderung der Expression der Transporter erkennbar (vgl. Abb. 30, S.69 und Tab. 18 (Anh.), S.159).

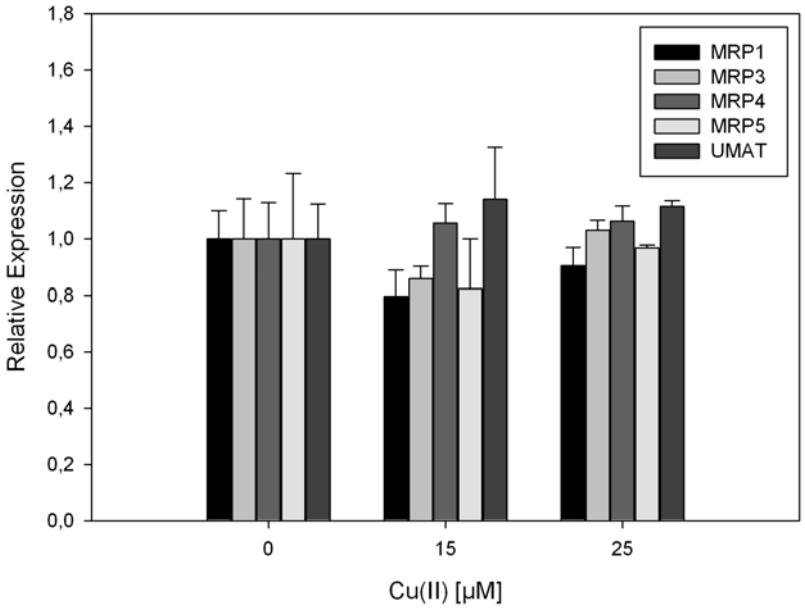



**Abb. 30 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter und UMAT in H322 Zellen nach Inkubation mit Cu(II) über 24 h.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf unbehandelte H322. n=4

Zur Untersuchung der Wirkung einer längeren Behandlung wurden H322 Zellen über sieben Tage mit Cu(II) inkubiert. Anschließend wurden MRP1 bis 5 und UMAT semi-quantitativ mittels *Real-time* RT-PCR bestimmt. Nachdem GAPDH unter diesen Bedingungen nicht moduliert wurde, konnte es als Referenzgen verwendet werden (vgl. Tab. 19 (Anh.), S.160). Die Inkubation mit Cu(II) über sieben Tage führte nicht zu signifikanten Änderungen der Expression der untersuchten Transporter (vgl. Abb. 31, S.70 und Tab. 19 (Anh.), S.160).

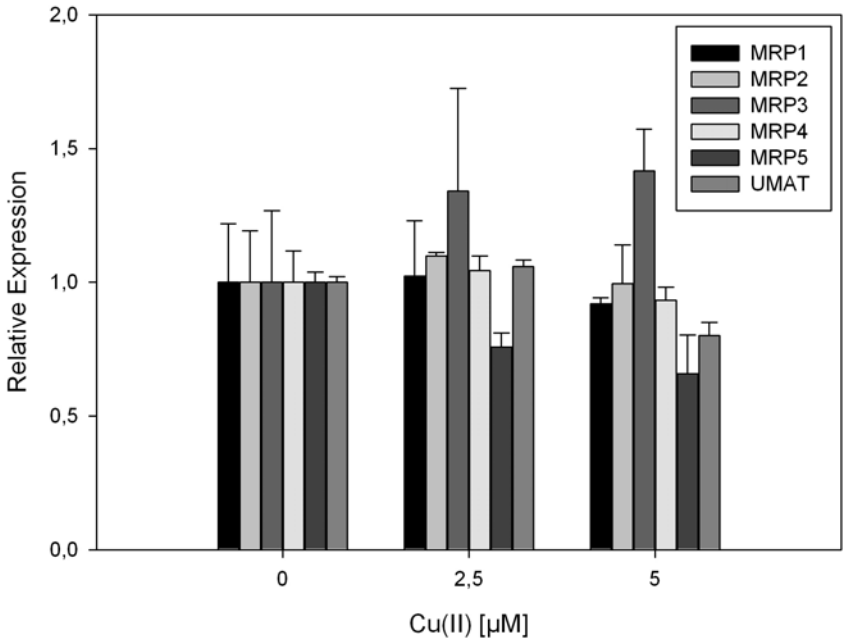



**Abb. 31 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter und UMAT in H322 Zellen nach Inkubation mit Cu(II) über 7 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf unbehandelte H322. n=4

### 3.3.2 Die Wirkung von Cu(II) auf normale humane Bronchialepithelzellen

**- Zytotoxizität von Cu(II)**

Primärkulturen von NHBE-Zellen wurden über 24h mit einer Konzentrationsreihe von Cu(II) inkubiert. Hierfür wurden die Kulturen mit unterschiedlichen Verdünnungen einer steril filtrierten Lösung von $CuSO_4 \cdot 6H_2O$ in bidest. Wasser versetzt. Im Folgenden wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Die Vitalität wurde jeweils bezogen auf ohne Zugabe von Cu(II) kultivierte Zellen angegeben. Zur Untersuchung eines möglichen Beitrags von MRP1 bis 5 zur Toleranz der Zellen gegenüber Cu(II) wurden Kulturen mitgeführt, deren Medium drei Stunden vor der Behandlung mit Cu(II) der Inhibitor von MRP1 bis 5 MK571 zugesetzt wurde (5 mg/l). NHBE-Zellen zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit Cu(II) bei einer Konzentration von 25 µM eine Reduktion der Vitalität auf 85 % (vgl. Abb. 32, S.71). Kulturen, die drei Stunden vor der Zugabe von Cu(II) mit MK571 versetzt wurden, wiesen bei 25 µM Cu(II) eine Vitalität von 82 % auf. Die Behandlung mit MK571 allein hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Kulturen. Die Zytotoxizitätskurven der Experimente mit und ohne MK571 zeigen weitgehend übereinstimmenden Verlauf. Da im untersuchten Dosisbereich erkennbare Zytotoxizität auftritt, legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass die MRP-Transporter 1 bis 5 unter den Bedingungen des vorliegenden Experimentes keinen Beitrag zum Schutz der Zellen vor den toxischen Effekten des Cu(II) leisten.

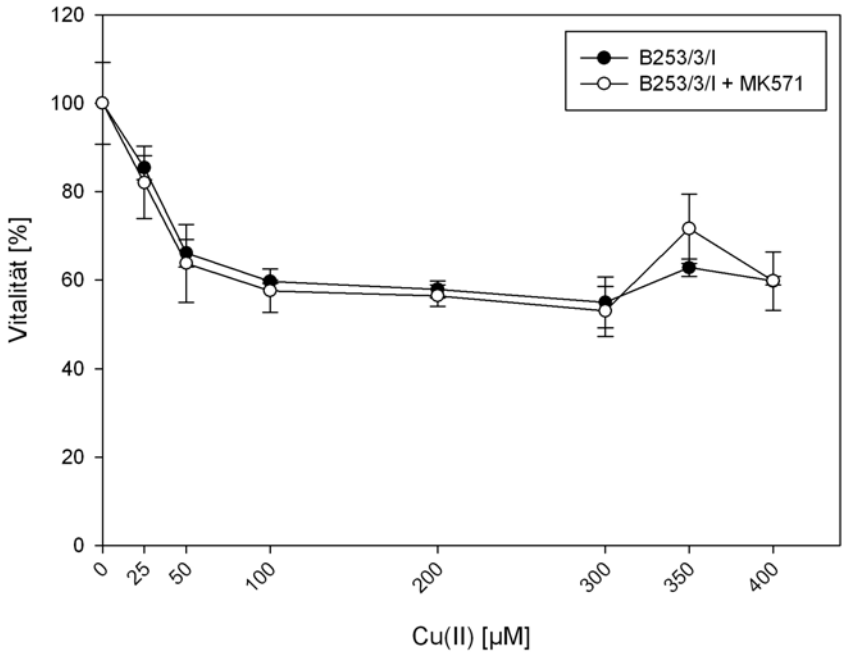



**Abb. 32 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patient B253/3/I) nach Inkubation mit Cu(II) über 24 h.**

Vergleich der Experimente mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (5 mg/l) über drei Stunden. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert ± SEM bezogen auf in Abwesenheit von Cu(II) kultivierte NHBE-Zellen. N=4, n=3;

Bei den Kulturen ohne Vorbehandlung mit MK571 ist bei Konzentrationen von 25 µM Cu(II) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 15 % reduziert. Die mit MK571 über drei Stunden vorbehandelten Zellen zeigen bei Konzentrationen von 25 µM Cu(II) eine Reduktion der Vitalität um 18 %, im Vergleich zu Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 über drei Stunden, ohne Zugabe von Cu(II).

**- MRP-mRNA Expression unter Cu(II)-Einfluss**

Die Wirkung der Exposition von NHBE-Zellen gegenüber Cu(II) auf die Expression der mRNA verschiedener MRP-Transporter wurde mittels *Real-time* RT-PCR semi-quantitativ untersucht. Nach 24 Stunden Inkubation mit Cu(II) war in den Kulturen von B146/1/I kein Effekt auf die Expression der untersuchten Transporter MRP1, 3 und 5 nachweisbar (vgl. Abb. 33, S.72 und Tab. 20 (Anh.), S.160). Dabei wurde GAPDH für die Quantifizierung als Referenzgen verwendet, da es im Experiment nicht moduliert war.

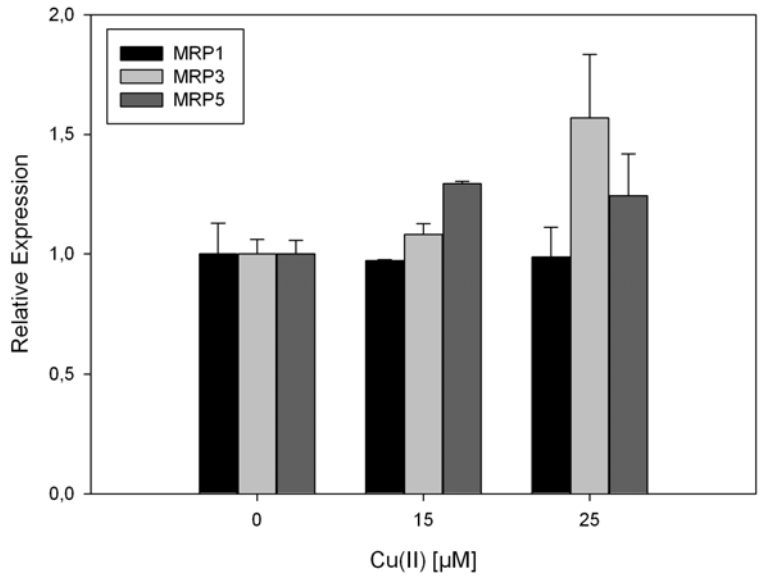



**Abb. 33 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen (B146/1/I) nach Inkubation mit Cu(II) über 24 h.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kulturen von B146. n=4

Zur Untersuchung der Wirkung einer Langzeitbehandlung mit niedrigen Dosen von Cu(II) auf Primärkulturen von NHBE-Zellen wurde ein Experiment, wie bereits unter 3.2.2 für Arsenit beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden Primärkulturen aus dem Material von drei verschiedenen Patienten (B182, B201 und B222) verwendet. Die Zellen wurden kultiviert und mit Cu(II) (2,5 µM und 5 µM) behandelt, wie unter 2.1.7 beschrieben. Dieser Ablauf wurde bis zum Abschluss der sechsten Behandlung nach acht Wochen fortgeführt (vgl. Abb. 34, S.72).

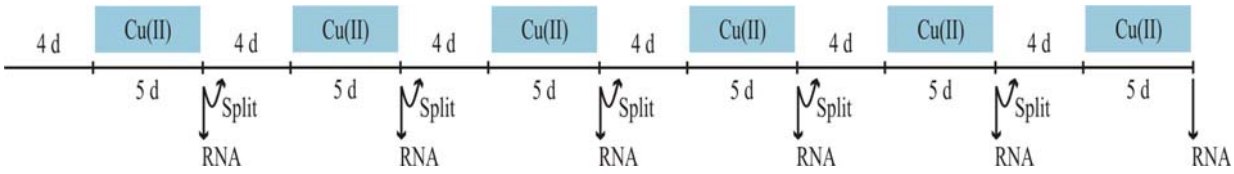



**Abb. 34 Schematischer Ablauf der Langzeitversuche mit Cu(II) an normalen humanen Bronchialepithelzellen.**

Die Zellen wurden jeweils über fünf Tage mit Cu(II) (2,5 µM und 5 µM) behandelt (vgl. 2.1.7).

In dieser Arbeit wurde die nach Abschluss der ersten und zweiten Inkubation mit Cu(II) isolierte RNA untersucht. Die Expression der Transporter MRP1 bis 5 und UMAT wurde mittels *Real-time* RT-PCR semi-quantitativ bestimmt. Als mögliche Referenzgene wurden GAPDH und 18S rRNA untersucht. Diese Messungen wurden an jeder Kultur in Doppelbestimmung durchgeführt. Als Referenzgen für die Untersuchung der Wirkung von Cu(II) im vorliegenden Langzeitexperiment, wurde für die

Experimente an den Kulturen von allen drei Patienten in den ersten beiden Wochen 18S rRNA gewählt, da die Transkription dieses Gens unter den Bedingungen des Experiments konstant blieb (vgl. Tab. 21 (Anh.), S.160). Die Transporter MRP2 und UMAT waren in den untersuchten Proben auf mRNA-Ebene zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Zur besseren Erkennbarkeit der Expressionsunterschiede zwischen den Kulturen aus dem Material der verschiedenen Patienten wurde bei der Darstellung der Ergebnisse die relative Expression, bezogen auf die mittlere Expression der jeweiligen Isoform, in den unbehandelten Kulturen von B182 angegeben.

Nach Abschluss der ersten fünftägigen Behandlung mit Cu(II) ist in keinem der drei Experimente ein signifikanter Effekt auf die Expression von MRP1, 3, 4 und 5 erkennbar. Die Kontrollen der einzelnen Patienten zeigen untereinander ebenfalls keine signifikanten Expressionsunterschiede (vgl. Abb. 35, S.74 und Tab. 22 (Anh.), S.166). Eine mögliche Wirkung der Behandlung mit Cu(II) auf die mRNA-Menge von MRP1 und 4 in B182 kann aufgrund der Streuung der Daten nicht abschließend bewertet werden.

Nach der zweiten Inkubation mit Cu(II) über fünf Tage und insgesamt 18 Tagen in Kultur, war die Expression von MRP1 in den Kontrollen von B182 nicht signifikant verändert. Die Kontrollen von B201 zeigten eine im Vergleich zu den Kontrollen aller drei Patienten nach der ersten Behandlung erkennbar aber nicht signifikant erhöhte Expression von MRP1, die jedoch signifikant ca. dreifach höher war als die in den Kontrollen von B182 nach 18 Tagen in Kultur (vgl. Abb. 35, S.74 und Tab. 23 (Anh.), S.162). Die zweite Behandlung mit Cu(II) hatte in B182 keinen Effekt auf die Menge der MRP1-mRNA. Eine mögliche Repression von MRP1 in B201 kann aufgrund der Streuung der Werte nicht abschließend beurteilt werden. Die Expression von MRP3 in den Kontrollen von B182 war nach 18 Tagen in Kultur unverändert, im Vergleich zu diesen Proben war die MRP3-Menge in den Kontrollen von B201 nach dieser Zeit erkennbar, aber nicht signifikant erhöht. Verglichen mit den Kontrollen von B201 nach neun Tagen in Kultur, war die Expression ebenfalls nicht signifikant verändert. Die zweite Behandlung mit Cu(II) hatte keinen Effekt auf die MRP3-Menge in B182, eine mögliche Repression in den mit 5 µM Cu(II) behandelten Proben von B201 kann nicht komplett bewertet werden. Die Menge der MRP4-mRNA in den Kontrollen von B182 zeigt keine signifikanten Unterschiede zu einer der Kontrollen nach neun Tagen in Kultur. Über den Unterschied zur Kontrolle von B201 nach 18 Tagen sowie über eine mögliche Auswirkung der Inkubation mit Cu(II) auf B201 kann aufgrund der Streuung der Daten keine Aussage getroffen werden. In den Kulturen von B182 führte die zweite Behandlung mit Cu(II) zu einer signifikanten Verdoppelung der mRNA-Menge von MRP4, womit die Expression wieder das Niveau der Kontrollen nach neun Tagen erreicht. Aufgrund der Streuung der Expressionsdaten der MRP5-mRNA in den Proben von B201 sowie in den Kontrollen von B182, lässt sich keine Aussage über die Wirkung der zweiten Inkubation mit Cu(II) auf die Expression dieses Transporters in den Kulturen der beiden Patienten, oder Unterschiede zwischen den Kontrollen machen.

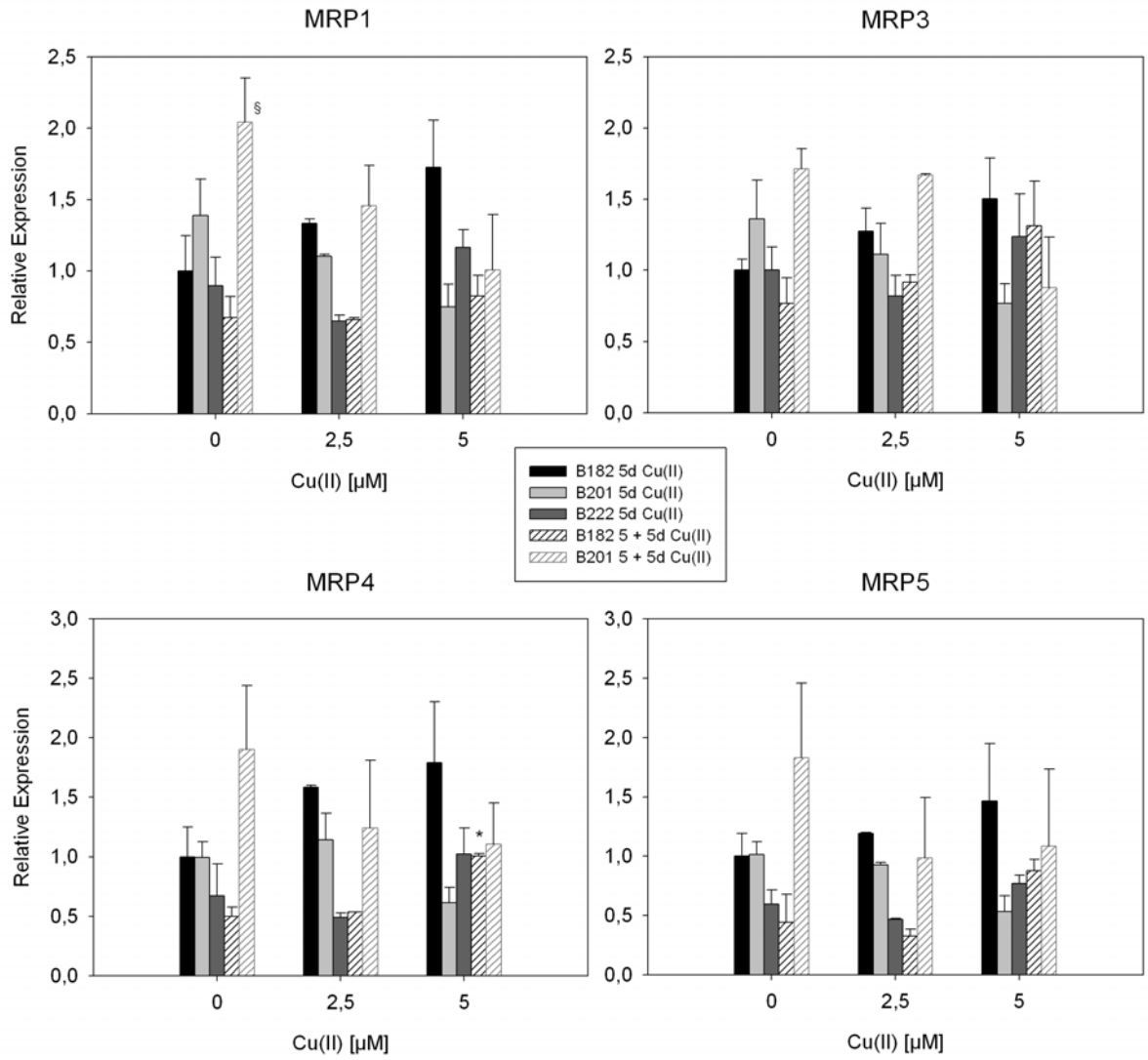



**Abb. 35 Zusammenfassung der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B182, B201 und B222) nach der ersten und zweiten Inkubation mit Cu(II) über 5 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S rRNA. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelten Kulturen von B182 nach der ersten Inkubation mit Cu(II) (5 d). Erste Woche: N=3; n=4; zweite Woche: N=2; n=4;

§ $p \leq 0{,}05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B182 nach der zweiten Inkubation mit Cu(II) (5+5 d);

**- Zellmorphologie von normalen Bronchialzellen unter Cu(II) im Langzeitversuch**

Die Kulturen von B182 wurden nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Cu(II) im Langzeitexperiment phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Die Kontrollen zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten, sie wiesen die epitheltypische polygonale Form auf, sowie intakte Membranen und Zellkerne (vgl. Abb. 36, S.75). Wohingegen die mit Cu(II) inkubierten Zellen in beiden Dosisgruppen (2,5 und 5 µM) morphologische Auffälligkeiten zeigten. Die Kulturen enthielten einen hohen Anteil an Zellen, die statt der typischen polygonalen Form rund waren. Weiterhin zeigten die Zellen nach der Behandlung mit Cu(II) Anzeichen von Apoptose: Man erkennt Ausstülpungen der Plasma- und der Kernmembranen, durch sog. „blebbing“ abgeschnürte Vesikel (Kerr et al., 1972). Die Induktion der Apoptose hätte jedoch noch durch biochemische Methoden wie etwa eine Bestimmung der Aktivität der Kaspasen 3 und 7, integraler Enzyme des Apoptosesignalweges, bestätigt werden müssen. In den mit 5 µM Cu(II) behandelten Kulturen waren des Weiteren geschrumpfte Zellen in fortgeschrittener Apoptose sichtbar, sowie zytoplasmatische Vesikel innerhalb der Zellen.

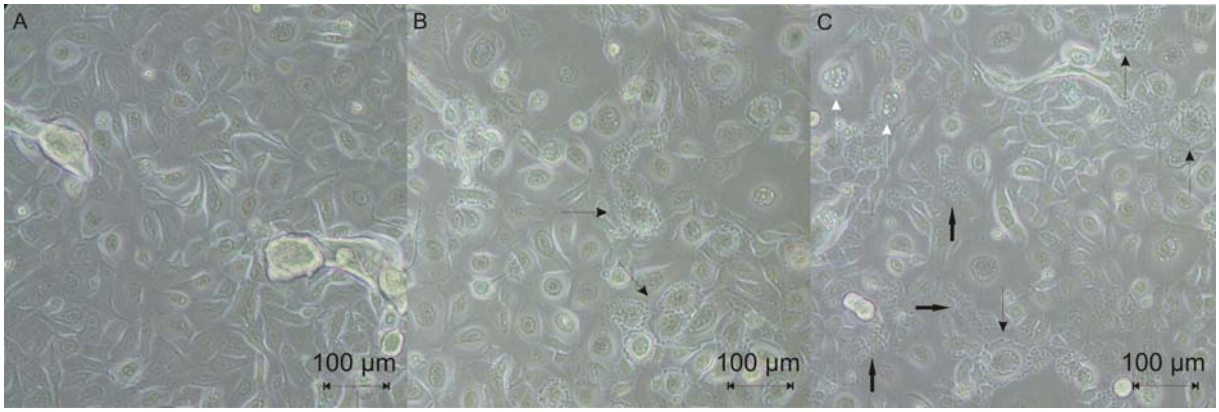



**Abb. 36 Die Kulturen von B182 nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Cu(II).**

Der Effekt von Cu(II) auf die Morphologie von NHBE-Zellen. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Kulturen. (A) Kontrolle; (B) 2,5 µM Cu(II); (C) 5 µM Cu(II). Die dünnen schwarzen Pfeile zeigen durch „blebbing“ abgeschnürte Vesikel (apoptotische Körperchen), die dicken schwarzen Pfeile geschrumpfte Zellen in fortgeschrittener Apoptose, die weißen Pfeile zeigen zytoplasmatische Vesikel.

## 3.4 Die Wirkung von Hg(II) auf humane Lungenzellkulturen

### 3.4.1 Wirkung von Hg(II) auf H322 Lungentumorzellen

**- Zytotoxizität von Hg(II)**

Die Zytotoxizität von Hg(II) wurde an humanen Lungenzellkulturen mit dem MTT-Assay untersucht. Diese Experimente dienten der Etablierung der Konzentrationen für die nachfolgenden Experimente zur Untersuchung der Wirkung von Hg(II) auf die mRNA-Menge von MRP1 bis 5 und UMAT in der humanen Lungentumorzelllinie H322. Weiterhin wurden Kulturen gleichzeitig mit Hg(II) und MK571, einem Inhibitor von MRP1 bis 5 (Gekeler et al., 1995; Rius et al., 2003; Haimeur et al., 2004) versetzt, um mittels MTT-Test einen möglichen Beitrag dieser Transportproteine zum Schutz der Zellen vor Hg(II) erkennen zu können. Für die Behandlung der Kulturen wurde eine steril filtrierte Lösung von $HgCl_2$ in bidest. Wasser verwendet.

Nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h war in Kulturen von H322 bei einer Konzentration von 60 µM Hg(II) die Vitalität bezogen auf unbehandelte Kontrollen signifikant auf 67 % reduziert (vgl. Abb. 37, S.76).

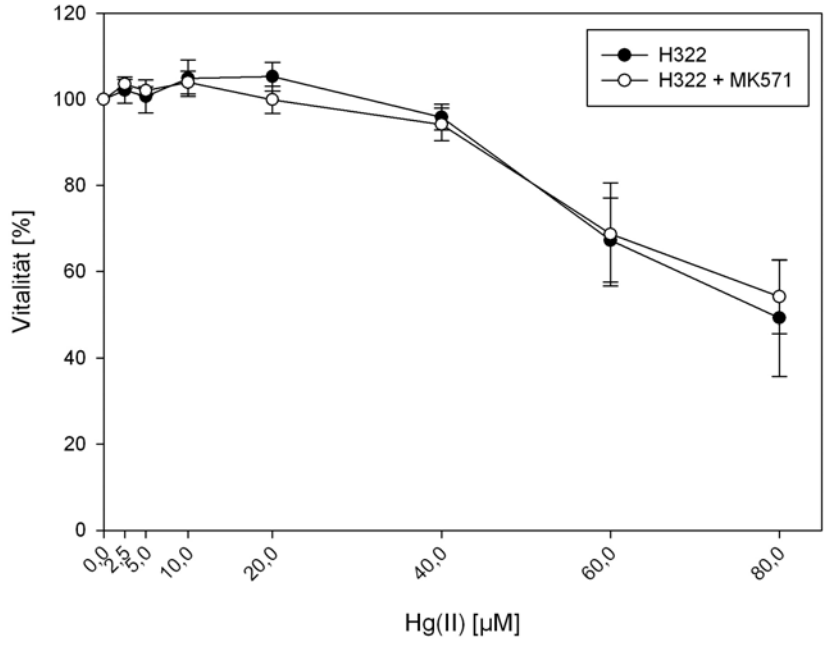



**Abb. 37 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h.**

Vergleich der Experimente mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (20 mg/l) über 3 h. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert ± SEM bezogen auf in Abwesenheit von Hg(II) kultivierte H322 Zellen. N=2, n=3;

Bei den H322 Zellen ohne Vorbehandlung mit MK571 ist bei Konzentrationen von 60 µM Hg(II) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten H322 signifikant auf 67 % reduziert ($p \leq 0,05$). Bei den H322 Zellen mit Vorbehandlung mit MK571 ist ebenfalls bei 60 µM Hg(II) die Vitalität im Vergleich zu Zellen ohne Hg(II) mit Vorbehandlung mit MK571 signifikant auf 69 % reduziert ($p \leq 0,05$).

Kulturen, denen drei Stunden vor der Behandlung mit Hg(II) MK571 zugesetzt wurde, zeigten bei 60 µM Hg(II) eine signifikante Reduktion ihrer Vitalität auf 69 %. Die Verlaufskurven der Vitalität in den Experimenten mit und ohne MK571 unterscheiden sich nicht signifikant, wenngleich in beiden Experimenten signifikante Zytotoxizität erkennbar ist. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Transportproteine MRP1 bis 5 unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die Toleranz von H322 gegenüber Hg(II) haben.

**- Hg(II)-Einfluss auf MRP- und UMAT mRNA**

Nach 24-stündiger Inkubation von H322 Zellen mit Hg(II) (5 und 30 µM) wurde die mRNA-Menge der Transporter MRP1, 3, 4, 5 und UMAT in den Kulturen semi-quantitativ mittels *Real-time* RT-PCR bestimmt. Da die mRNA der GAPDH in diesem Experiment konstant exprimiert war, wurde sie als Referenzgen verwendet (vgl. Tab. 24 (Anh.), S.162). In den mit 5 µM Hg(II) behandelten Zellen war MRP1 im Mittel auf das 0,6-fache reprimiert, in den Kulturen aus der höheren Dosisgruppe (30 µM) war kein Effekt erkennbar (vgl. Abb. 38, S.77 und Tab. 24 (Anh.), S.162). Alle weiteren untersuchten Transporter waren im vorliegenden Experiment nicht signifikant moduliert.

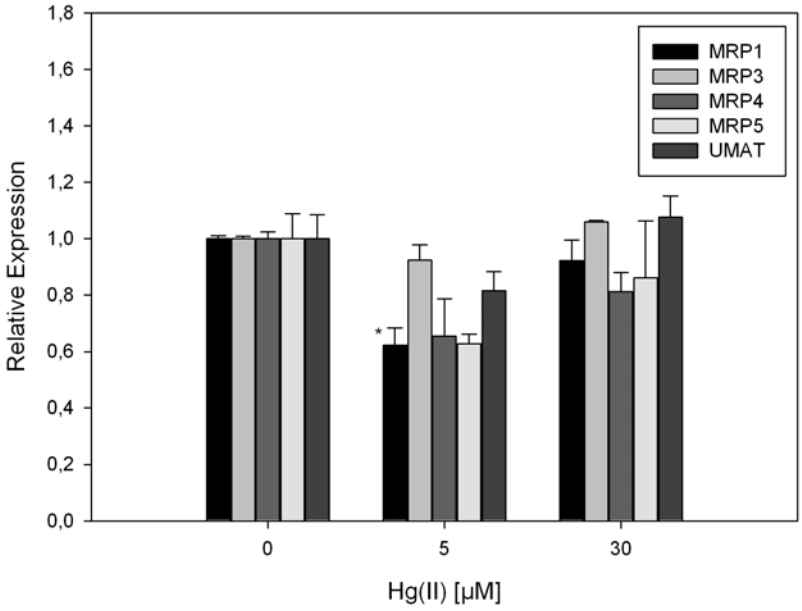



**Abb. 38 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf unbehandelte H322. n=4

* $p \leq 0{,}05$ Signifikanz zu unbehandelten H322

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer fortgesetzten Exposition gegenüber niedrigen Konzentrationen von Hg(II) auf H322 Zellen, wurden Kulturen über 72 h und über sieben Tage mit 2,5 und 5 µM Hg(II) behandelt. Anschließend wurde die Expression von MRP1 bis 5 und UMAT auf mRNA-Ebene semi-quantitativ mittels *Real-time* RT-PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde in beiden Experimenten GAPDH verwendet, das es unter diesen Bedingungen konstant exprimiert war (vgl. Tab. 25 (Anh.), S.163 und Tab. 26 (Anh.), S.163). Nach 72-stündiger Inkubation mit Hg(II) war keines der untersuchten Transportproteine signifikant moduliert (vgl. Abb. 39, S.78 und Tab. 25 (Anh.), S.163).

Eine verlängerte Inkubation mit Hg(II) über insgesamt sieben Tage hatte weiterhin keine signifikanten Effekte auf die mRNA-Mengen der untersuchten Transporter in H322 Zellen (vgl. Abb. 40, S.79 und Tab. 26 (Anh.), S.163). Lediglich UMAT war erkennbar, jedoch nicht signifikant auf das 0,7-fache reprimiert.

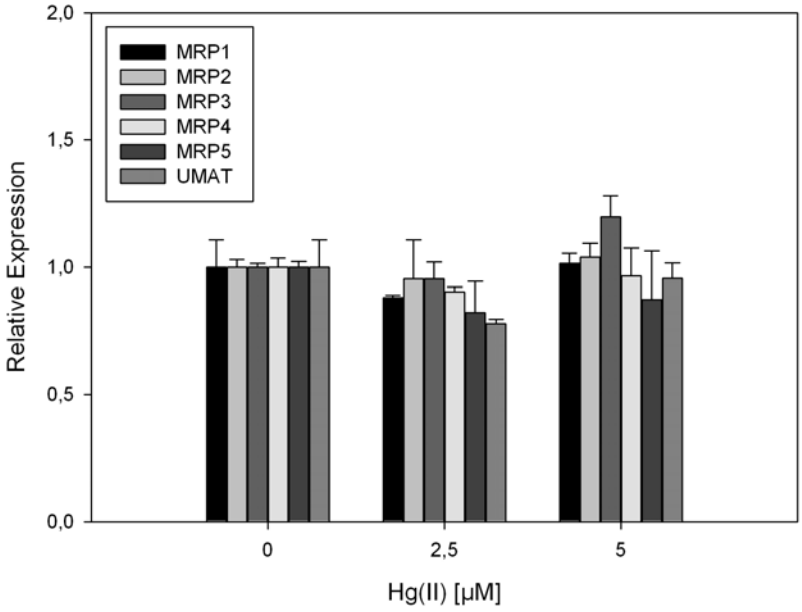



**Abb. 39 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter und UMAT in H322 Zellen nach Inkubation mit Hg(II) über 72 h.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf unbehandelte H322. n=4

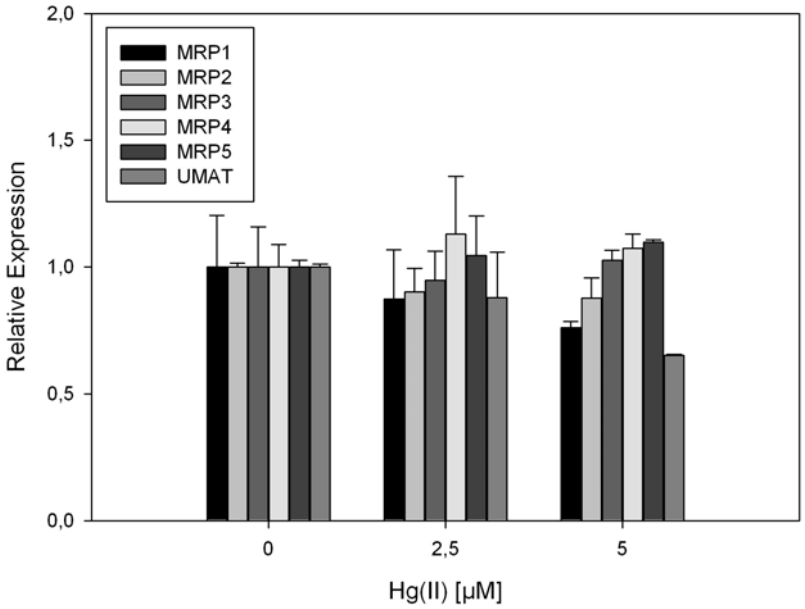



**Abb. 40 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit Hg(II) über 7 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf unbehandelte H322. n=4

### 3.4.2 Die Wirkung von Hg(II) auf normale humane Bronchialepithelzellen

**- Zytotoxizität von Hg(II)**

Die Sensibilität primärer NHBE-Zellen gegenüber Hg(II) wurde mittels MTT-Assay untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation von NHBE-Zellen mit einer Verdünnungsreihe von $HgCl_2$ in bidest. Wasser wurde die Vitalität der Kulturen unter Verwendung des MTT-Assay bestimmt. Zur Ermittlung der Vitalität dienten ohne Hg(II) kultivierte Zellen als Bezug. Wie u.a. bereits bei den Untersuchungen der Wirkungen von Arsenit und Cu(II) auf die Vitalität von NHBE-Zellen beschrieben, wurden auch bei den Experimenten mit Hg(II) an diesen Zellen Kulturen mitgeführt, die drei Stunden vor der Behandlung mit Hg(II) mit MK571 (5 mg/l) versetzt wurden (vgl. 3.2.2 und 3.3.2).

Die Untersuchungen zum Effekt von Hg(II) auf die Vitalität von NHBE-Zellen wurden mit Material von zwei Patienten (B244 und B246) durchgeführt. Für die Auswertung wurde sowohl aus den Experimenten ohne als auch aus denen mit MK571 jeweils die mittlere Vitalität aus den Versuchen mit den Kulturen von beiden Patienten errechnet. Die mittlere Vitalität betrug nach 24-stündiger Inkubation mit 20 µM Hg(II) 77 %. Unter zusätzlicher Behandlung mit MK571 führten bereits 5 µM Hg(II) zu einer Reduktion der mittleren Vitalität auf 83 %, bei 20 µM Hg(II) entsprach sie 45 % (vgl. Abb. 41, S.80). Vergleicht man die mittlere Vitalität der Experimente mit und ohne MK571 erkennt man, dass die Kulturen in Gegenwart von MK571 im Bereich zwischen 5 und 40 µM Hg(II) signifikant erhöhte Sensibilität gegenüber Hg(II) zeigen. Aufgrund dieses Befundes lässt sich eine

mögliche Beteiligung von einem oder mehreren der Transporter MRP1 bis 5 an der Detoxifizierung von Hg(II) unter den Bedingungen des vorliegenden Experimentes postulieren.

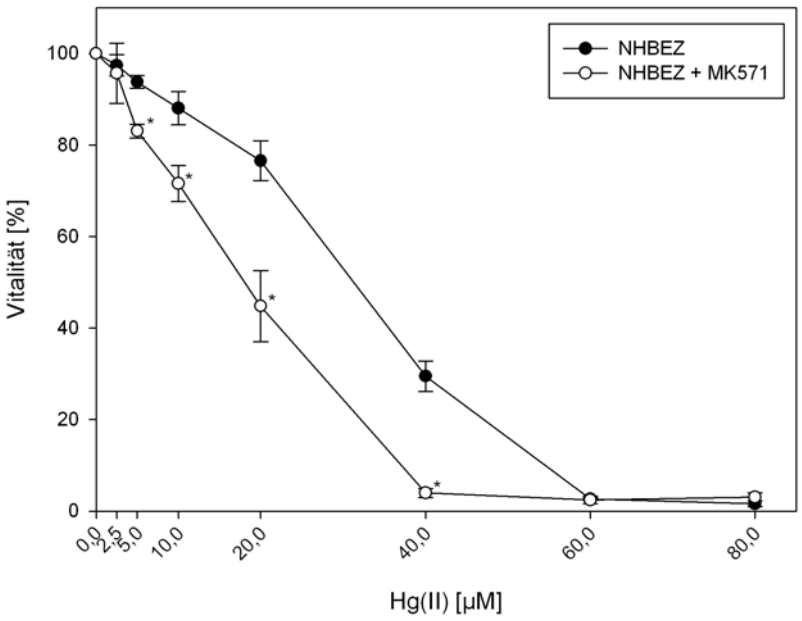



**Abb. 41 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patienten B244 und B246) nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h.**

Vergleich der Experimente mit und ohne Vorbehandlung mit MK571 (5 mg/l) über 3 h. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten (Patienten B244 und B246) bezogen auf in Abwesenheit von Hg(II) kultivierte Zellen. N=2, n=3;

In den Kulturen ohne Vorbehandlung mit MK571 ist bei Konzentrationen über 20 µM Hg(II) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant auf 77 % reduziert ($p \leq 0,01$). Bei den Kulturen mit Vorbehandlung mit MK571 ist bei Konzentrationen über 5 µM Hg(II) die Vitalität signifikant auf 83 % reduziert, im Vergleich zu Zellen mit Vorbehandlung mit MK571, ohne Hg(II) ($p \leq 0,01$).

* $p \leq 0,01$ Signifikanz zu Kulturen ohne Vorbehandlung mit MK571 und mit Hg(II) in der jeweils entsprechenden Konzentration.

**- MRP-mRNA-Expression unter Hg(II)-Einfluss**

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Hg(II) auf die Expression von MRP1 bis 5 und UMAT in Primärkulturen von NHBE-Zellen, wurde die Expression dieser ABC-Transporter mittels *Real-time* RT-PCR nach unterschiedlich langen Behandlungsintervallen semi-quantitativ bestimmt.
In den Kulturen der drei Patienten B146, B162 und B242 hatte eine 24-stündige Behandlung mit Hg(II) keine Auswirkungen auf die mRNA-Menge der jeweils untersuchten Transporter MRP1, 3, 4, 5 und UMAT (vgl. Abb. 42, S.82; Tab. 27 (Anh.), S.164). Als Referenzgen für die semi-quantitative Bestimmung wurde GAPDH verwendet. Die Ergebnisse zeigen jedoch in einigen Fällen signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Kulturen der verschiedenen Patienten. Die Expression von MRP1 in den Kontrollen von B146 war ungefähr dreifach höher als in den Kontrollen von B242. Zwischen den mit 2,5 µM Hg(II) behandelten Kulturen von B146 und B242 verhielt es sich genauso. Die Kulturen von B162 wiesen verglichen mit B146 ebenfalls eine geringere MRP1-Menge auf, dieser Unterschied war zwischen den mit 2,5 µM behandelten Kulturen signifikant. In den Proben von B242 war eine Expression von MRP2 mit der verwendeten Methode nicht nachweisbar. Die mRNA-Mengen von MRP3 wiesen die deutlichsten Unterschiede zwischen den Kulturen der einzelnen Patienten auf. Auch hier zeigte B146 die höchste Expression, die MRP3-Menge lag in den Kulturen von B162 in allen Dosisgruppen etwa beim 0,02-fachen derer von B146. Die Kontrollen und die mit 2,5 µM Hg(II) inkubierten Zellen von B242 zeigten ungefähr ein Drittel der MRP3-Menge von B146, die mit 5 µM Hg(II) behandelten etwa die Hälfte. MRP4 wurde nur im Experiment an B242 untersucht, die Exposition gegenüber Hg(II) hatte keinen Einfluss auf die Transkription dieses Gens. Im Unterschied zu MRP1 und 3 zeigten bei MRP5 die Kulturen von B162 die höchste Transkriptmenge, sie war in allen Kulturen signifikant höher als in denen von B242 – in den Kontrollen betrug sie das Vierfache, bei 2,5 µM Hg(II) das 2,6-fache und bei 5 µM das 2,8-fache der Expression der Kulturen von B242 in der jeweiligen Dosisgruppe. Im Vergleich zu den Kontrollen von B146 betrug die MRP5-Menge in B242 nur das 0,4-fache. Die Kulturen von B146 und B162 wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede in der Menge der MRP5-mRNA auf. Die Expression von UMAT wurde in B162 und B242 untersucht. Der Transporter war jedoch nur in B162 nachweisbar, die Inkubation mit Hg(II) modulierte seine Transkriptmenge nicht.

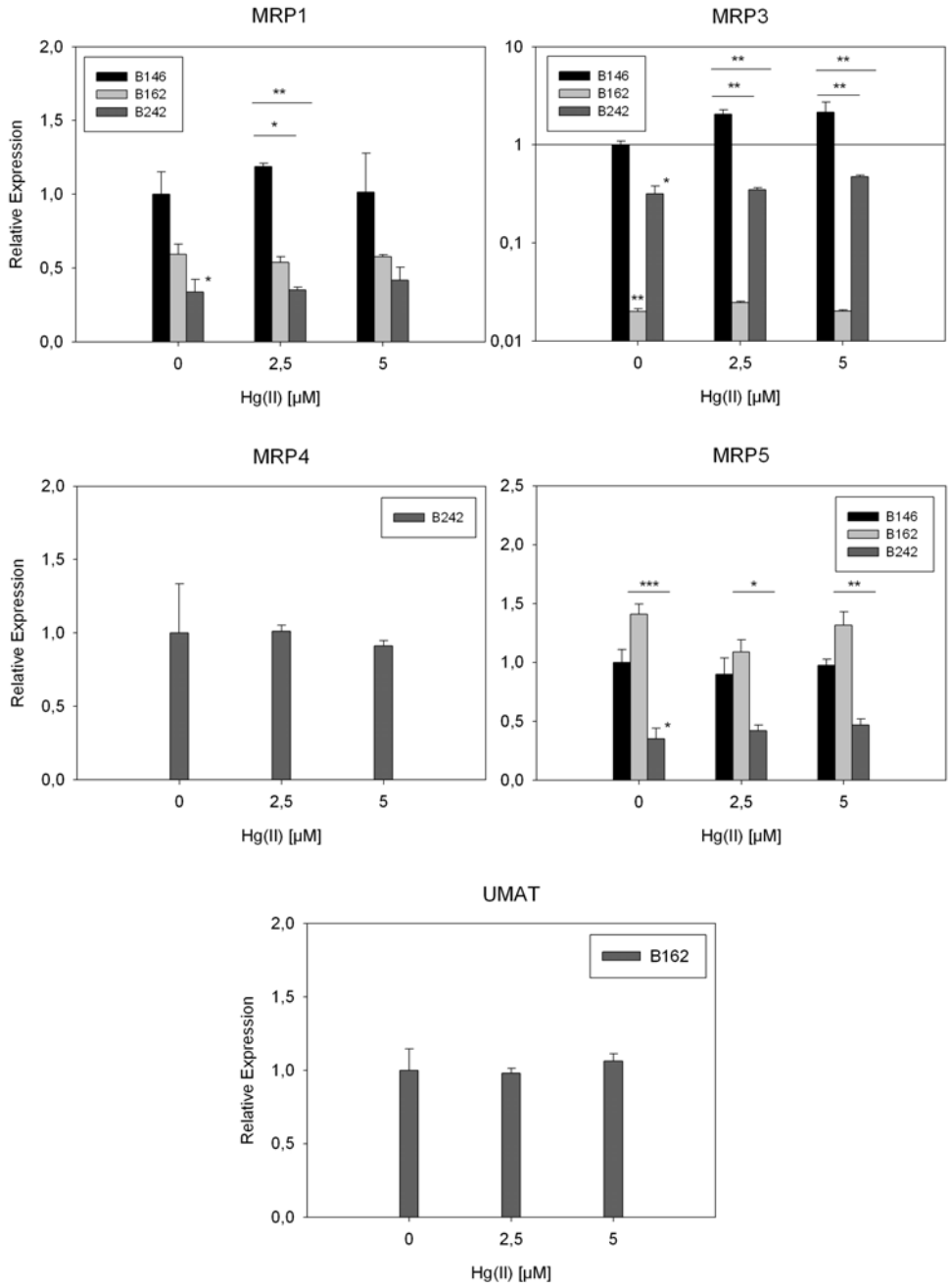



**Abb. 42 Die relative Expression der mRNA der ABC-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B146, B162 und B242) nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kulturen von B146. Die Expression von MRP4 in B162 wurde auf unbehandelte Kulturen von B162 bezogen. N=3; n=4

* $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B146; ** $p \leq 0,01$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B146; * $p \leq 0,05$ Signifikanz zu Kulturen aus derselben Dosisgruppe; ** $p \leq 0,01$ Signifikanz zu Kulturen aus derselben Dosisgruppe; *** $p \leq 0,001$ Signifikanz zu Kulturen aus derselben Dosisgruppe.

Die Auswirkungen einer Langzeitbehandlung mit verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen Hg(II) auf die Expression der MRP-Transporter 1 bis 5 wurde an Primärkulturen von NHBE-Zellen in Experimenten untersucht, deren Ablauf dem der bereits für Arsenit und Cu(II) beschriebenen entsprach (vgl. 3.2.2 und 3.3.2). Dabei wurden die Zellen kultiviert und mit Hg(II) (1; 2,5 und 5 µM) behandelt, wie unter 2.1.7 beschrieben. Jeweils nach Abschluss einer fünftägigen Behandlung mit Hg(II) wurde in jeder Dosisgruppe in jeweils zwei Schalen die mRNA-Menge bestimmter ABC-Transporter mittels *Real-time* RT-PCR untersucht (vgl. Abb. 43, S.83). Die Langzeitexperimente wurden bis zum Abschluss der sechsten Behandlung mit Hg(II) geführt. Die verwendeten Primärkulturen waren, wie bei den Experimenten mit Arsenit und Cu(II), aus dem Gewebe der Patienten B182, B201 und B222.

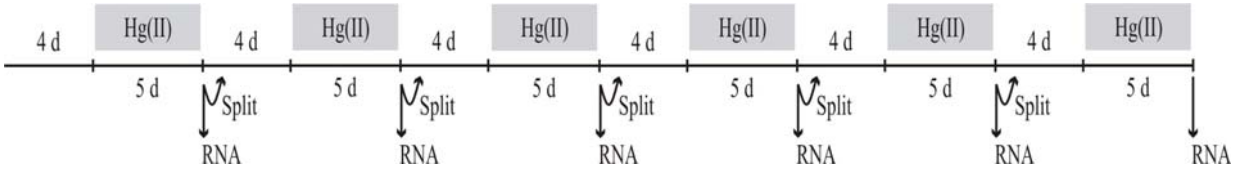



**Abb. 43 Schematischer Ablauf der Langzeitversuche mit Hg(II) an normalen humanen Bronchialepithelzellen.**

Die Zellen wurden jeweils über fünf Tage mit Hg(II) (1; 2,5 µM und 5 µM) behandelt (vgl. 2.1.7).

Für die Experimente mit Hg(II) fungierten jeweils dieselben Kulturen als Kontrollen wie für die mit Cu(II), da immer beide simultan durchgeführt wurden und das $HgCl_2$ für die Behandlung ebenfalls in bidest. Wasser gelöst wurde. Gegenstand dieses Abschnitts ist die Untersuchung der Wirkung von Hg(II) über die Dauer der ersten beiden fünftägigen Behandlungen. Für die relative Quantifizierung der zu bestimmenden Transporter wurden zwei Referenzgene untersucht: GAPDH und 18S rRNA (vgl. Tab. 28 (Anh.), S.165). Als Referenzgen für die Quantifizierung nach der ersten fünftägigen Inkubation mit Hg(II) wurde für die Experimente mit den Kulturen aus dem Material aller drei Patienten 18S rRNA gewählt, da dieses Gen mit Ausnahme der mit 5 µM Hg(II) behandelten Kulturen von B182 in allen Proben konstant exprimiert wurde und geringere Schwankungen als GAPDH aufwies. Aufgrund einer möglichen Repression beider Referenzgene in der 5 µM Hg(II)-Dosisgruppe von B182 kann keine verlässliche Aussage über die Effekte in dieser Gruppe getroffen werden. Für die Analyse der Genexpression nach der zweiten Behandlung mit Hg(II) wurde für die Experimente an B182 GAPDH als Referenzgen gewählt, da die 18S rRNA hier möglicherweise reprimiert war. In B201 dagegen war die Menge der 18S rRNA konstanter als die der GAPDH und nicht durch die Behandlung moduliert (vgl. Tab. 28 (Anh.), S.165). MRP2 und UMAT waren mit der verwendeten Methode ein keiner der Proben nachweisbar, weder nach dem ersten noch nach dem zweiten Behandlungszyklus mit Hg(II). Zur klareren Erkennbarkeit möglicher interindividueller Expressionsunterschiede wurde die mRNA-Menge der einzelnen Transporter jeweils relativ zur Menge in den unbehandelten Kulturen von B182 angegeben. Wie bereits unter 3.3.2 ausgeführt,

zeigen die Transkriptmengen von MRP1, 3, 4 und 5 in den Kontrollen der Experimente mit B182, B201 und B222 untereinander nach den ersten neun Tagen in Kultur keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 35, S.74 und Tab. 22 (Anh.), S.161). Die erste fünftägige Exposition gegenüber Hg(II) hatte keine Auswirkungen auf die MRP1-Menge in den Kulturen eines der drei Patienten (vgl. Abb. 44, S.85 und Tab. 29 (Anh.), S.166). Die Transkription von MRP3 war in den mit 2,5 und 5 µM inkubierten Zellen von B182 im Mittel entsprechend 1,8- und 2,1-fach induziert, wobei die Ergebnisse der höheren Dosisgruppe durch eine mögliche Repression der 18S rRNA in diesen Kulturen zusätzlich erhöht sein könnten. Die MRP4-Menge wurde in B201 und B222 nicht moduliert, über mögliche Wirkungen in den mit 2,5 und 5µM behandelten Kulturen von B182 können aufgrund der Streuung der Werte keine Aussagen gemacht werden. Die Expression von MRP5 war in den Kulturen aus dem Material aller drei Patienten von der Belastung mit Hg(II) über fünf Tage unbeeinflusst, auch die Kontrollen der Experimente wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede in der MRP5-Menge auf.

Die zweite fünftägige Behandlung mit Hg(II) hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die mRNA-Menge von MRP1 in den Kulturen von B182. In den mit 2,5 und 5 µM Hg(II) behandelten Proben von B201 ist jedoch eine nicht signifikante Repression dieses Transporters erkennbar (vgl. Abb. 45, S.86 und Tab. 30 (Anh.), S.167). Eine mögliche Induktion von MRP3 in B182 kann aufgrund der Streuung der Daten aus den unbehandelten Kulturen und den beiden unteren Dosisgruppen nicht abschließend bewertet werden. Im Experiment mit B201 war kein Effekt auf die MRP3-Menge erkennbar. Die MRP4-Menge blieb in B182 konstant, wohingegen vor allem in den mit 1 und 2,5 µM Hg(II) inkubierten Proben von B201 eine nicht signifikante Repression dieses Transporters erkennbar ist, deren Interpretation jedoch durch die Streuung der Werte der Kontrollen von B201 erschwert wird. Über die Auswirkungen der zweiten fünftägigen Behandlung mit Hg(II) auf die Transkriptmenge von MRP5 in B182 und B201 können aufgrund der großen Standardfehler der Daten der Kontrollen und der mit 5 µM Hg(II) behandelten Kulturen von B182 keine Aussagen gemacht werden.

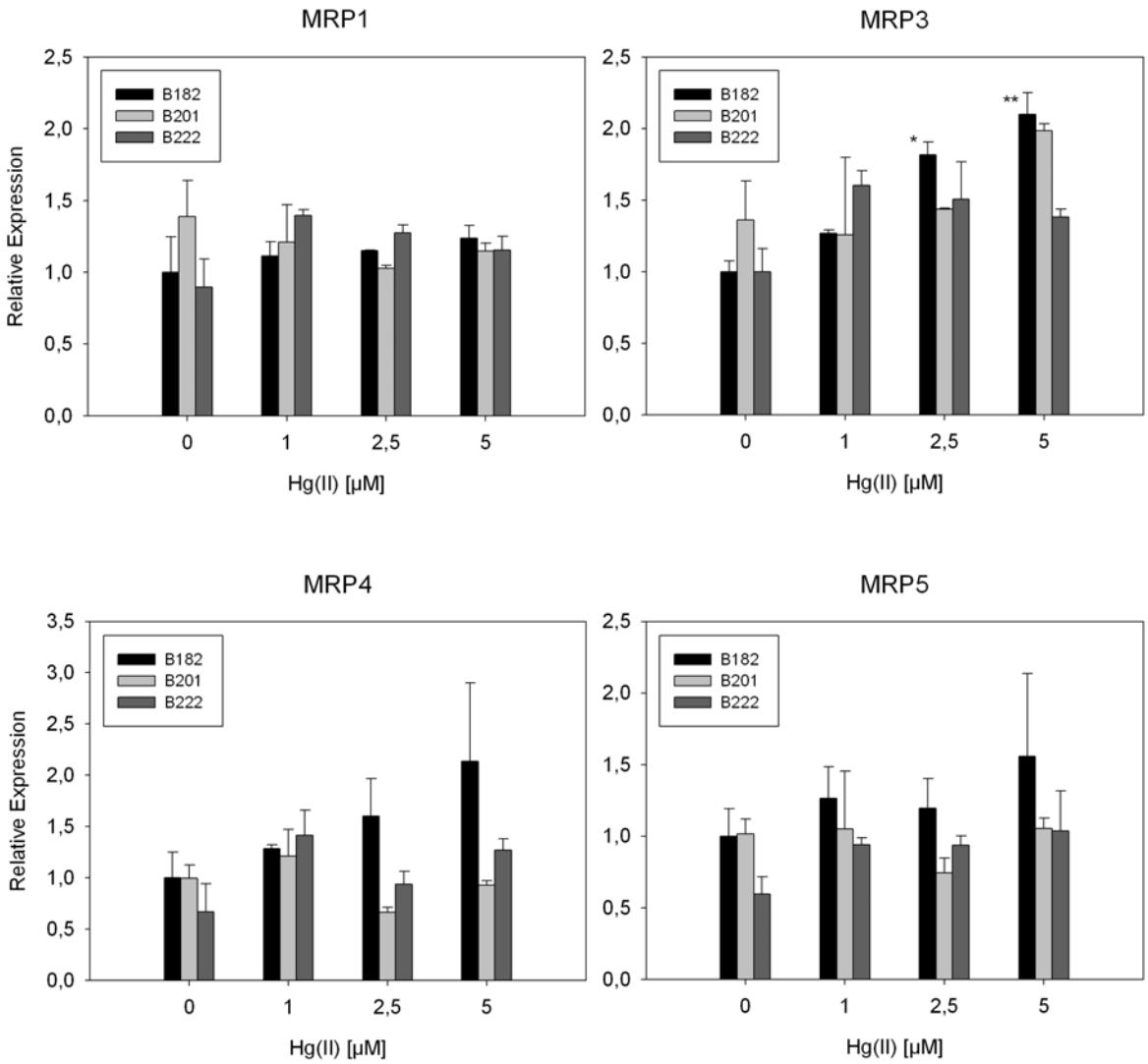



**Abb. 44 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B182, B201 und B222) nach Inkubation mit Hg(II) über 5 d.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S rRNA. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kulturen von B182. N=3; n=4; * $p \leq 0,05$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B182; ** $p \leq 0,01$ Signifikanz zu unbehandelten Kulturen von B182

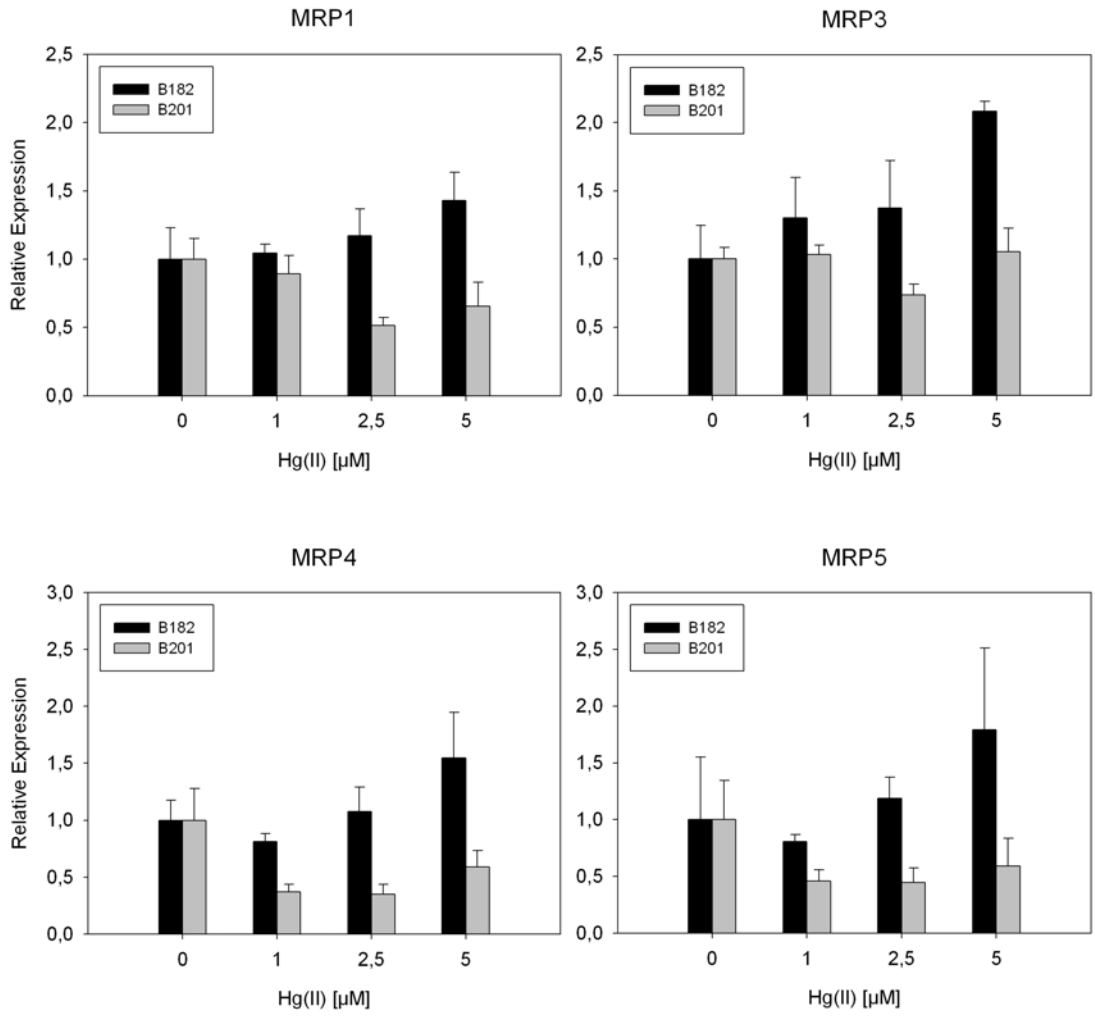



**Abb. 45 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach der zweiten Inkubation mit Hg(II) über 5 d.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgene: B182: GAPDH; B201: 18S rRNA. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelten Kulturen des jeweiligen Patienten nach der zweiten fünftägigen Behandlung mit Hg(II). N=2; n=4;

Beim Vergleich der Expressionen der untersuchten MRP-Transporter in den Kulturen von B201 nach der ersten und der zweiten fünftägigen Inkubation mit Hg(II) waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar (vgl. Abb. 46, S.87 und Tab. 31 (Anh.), S.168). Eine Interpretation der Unterschiede zwischen den Transkriptmengen sowohl von MRP4 als auch von MRP5 in den Kontrollen nach der ersten und der zweiten Belastung mit Hg(II) ist aus den oben angeführten Gründen nicht möglich.

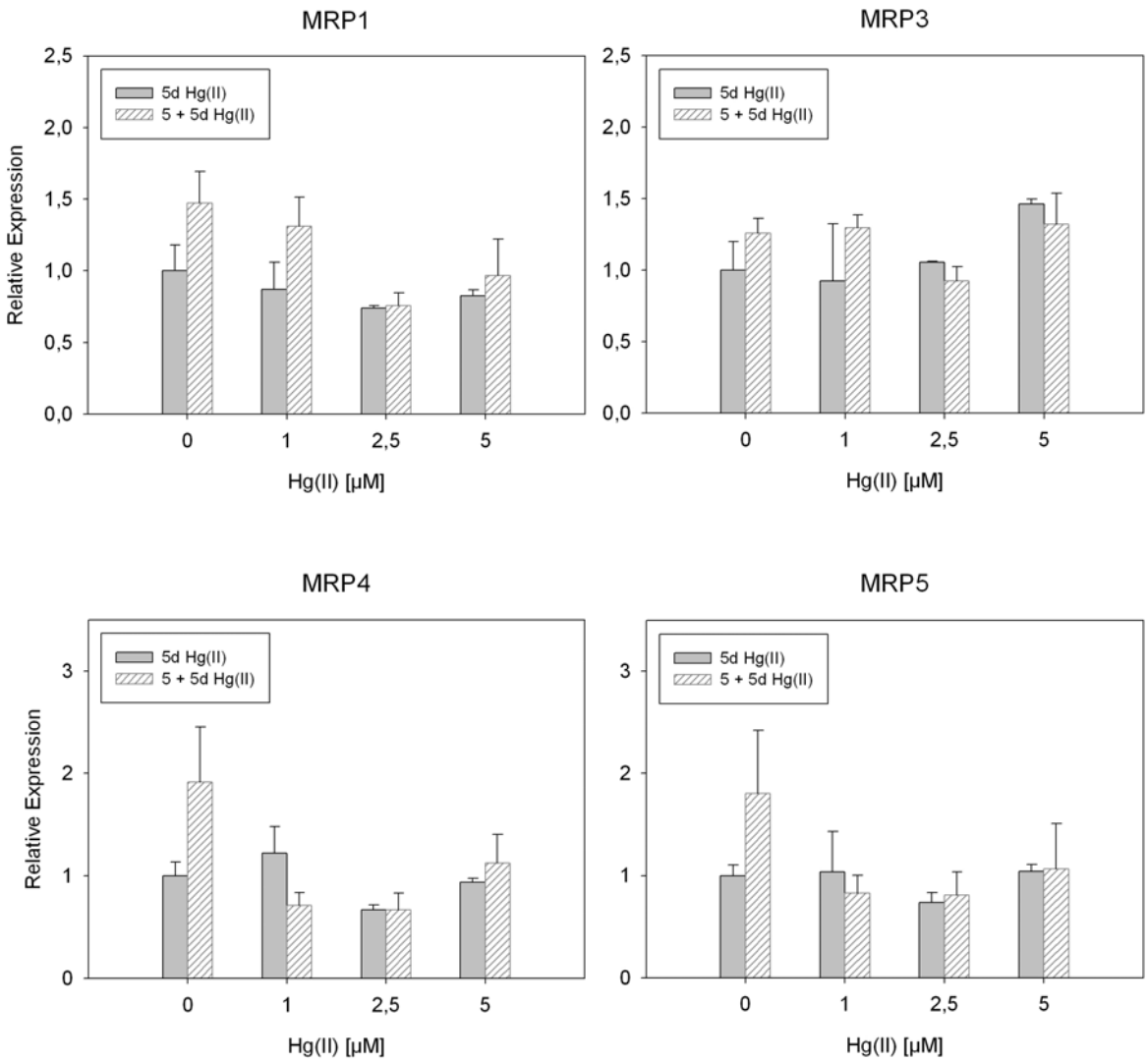



**Abb. 46 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B201) nach der ersten und der zweiten fünftägigen Inkubation mit Hg(II).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S rRNA. Relative Expression + SEM, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kulturen von B201 nach der ersten Woche. N=2; n=4

**- Zellmorphologie im Langzeitversuch unter Hg(II)**

Nach Abschluss der sechsten fünftägigen Inkubation mit Hg(II) im Rahmen des Langzeitversuchs wurden die Kulturen von B182 phasenkontrastmikroskopisch untersucht und dokumentiert (vgl. Abb. 47; S.88). Wie bereits unter 3.3.2 beschrieben, waren die Kontrollen morphologisch unauffällig. Die Form der Zellen war epitheltypisch polygonal, Membranen und Zellkerne waren intakt. Die mit 1 und 2,5 µM Hg(II) behandelten Kulturen waren ebenfalls ohne morphologische Auffälligkeiten, ihre Konfluenz entsprach in etwa den Kontrollen. Die Kulturen der höchsten Dosisgruppe (5 µM) wiesen einen erhöhten Anteil an Zellen mit atypischer leicht abgerundeter Morphologie auf. Sie waren jedoch von vergleichbarer Größe und besaßen intakte Membranen und Zellkerne. In einigen Zellen waren zytoplasmatische Vesikel erkennbar.

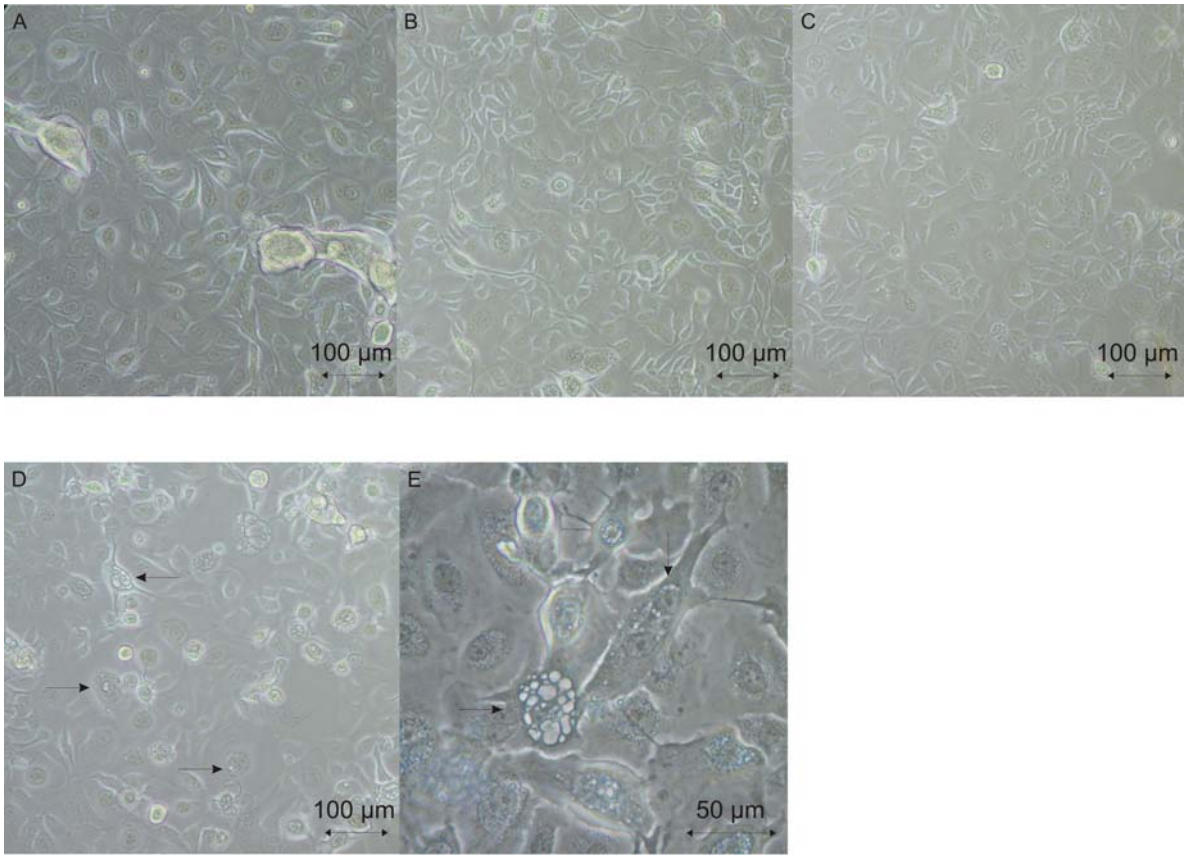



**Abb. 47 Die Kulturen von B182 nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Hg(II).**

Der Effekt von Hg(II) auf die Morphologie von NHBE-Zellen. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Kulturen. (A) Kontrolle; (B) 1 µM Hg(II); (C) 2,5 µM Hg(II); (D) 5 µM Hg(II); (E) 5 µM Hg(II) Die schwarzen Pfeile zeigen zytoplasmatische Vesikel.

## 3.5 Die Wirkung von Cd(II), Co(II) und Pb(II) auf Bronchialepithelzellen

### - Zytotoxizität von Cd(II), Co(II) und Pb(II) im MTT-Assay

Die zytotoxische Wirkung von Cd(II), Co(II) und Pb(II) auf Primärkulturen von NHBE-Zellen wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. Für die Bestimmung der Vitalität wurden unbehandelte Zellen desselben Patienten als Bezug verwendet. Aus sterilen Stammlösungen von $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ und $PbCl_2$ in bidest. Wasser wurden jeweils einzeln Verdünnungsreihen erstellt. Anschließend wurden die Kulturen mit den einzelnen Metallen oder allen drei Metallen in Kombination beimpft. Die Experimente dienten zum einen der Absicherung der Konzentrationen für die nachfolgenden Inkubationen von NHBE-Zellen mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) zur Analyse der RNA mittels Microarrays. Zum anderen sollte untersucht werden, ob es zwischen der zytotoxischen Wirkung der Metalle, einzeln und in Kombination, Unterschiede gibt. Vorausgehend ist anzumerken, dass die Metallkonzentrationen in diesem Abschnitt abweichend von den vorangegangenen Abschnitten in µg/l oder mg/l angegeben werden, da sich jeweils die niedrigsten eingesetzten Konzentrationen auf Grenzwerte aus dem Humanbiomonitoring beziehen. Dreitägige Behandlung mit 2,0 mg/l Cd(II) führte bei den untersuchten NHBE-Zellen zu einer Reduktion der Vitalität um 25 % (vgl. Abb. 48, S.90) (Glahn et al., 2008). Im selben Umfang wurde die Vitalität der NHBE-Zellen auch bei Inkubation mit 3,5 mg/l Co(II) über die gleiche Zeitspanne reduziert. Wurden NHBE-Zellen über drei Tage mit 6,2 mg/l Pb(II) belastet, sank die Vitalität um 10 %. Wie erwartet, zeigten die für die Microarray-Experimente vorgesehenen Konzentrationen von 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) weder einzeln noch in Kombination toxische Effekte. Bei kombinierter Exposition gegenüber 0,28 mg/l Cd(II), 0,29 mg/l Co(II) und 3,10 mg/l Pb(II) war eine Reduktion der Vitalität um 29 % erkennbar.

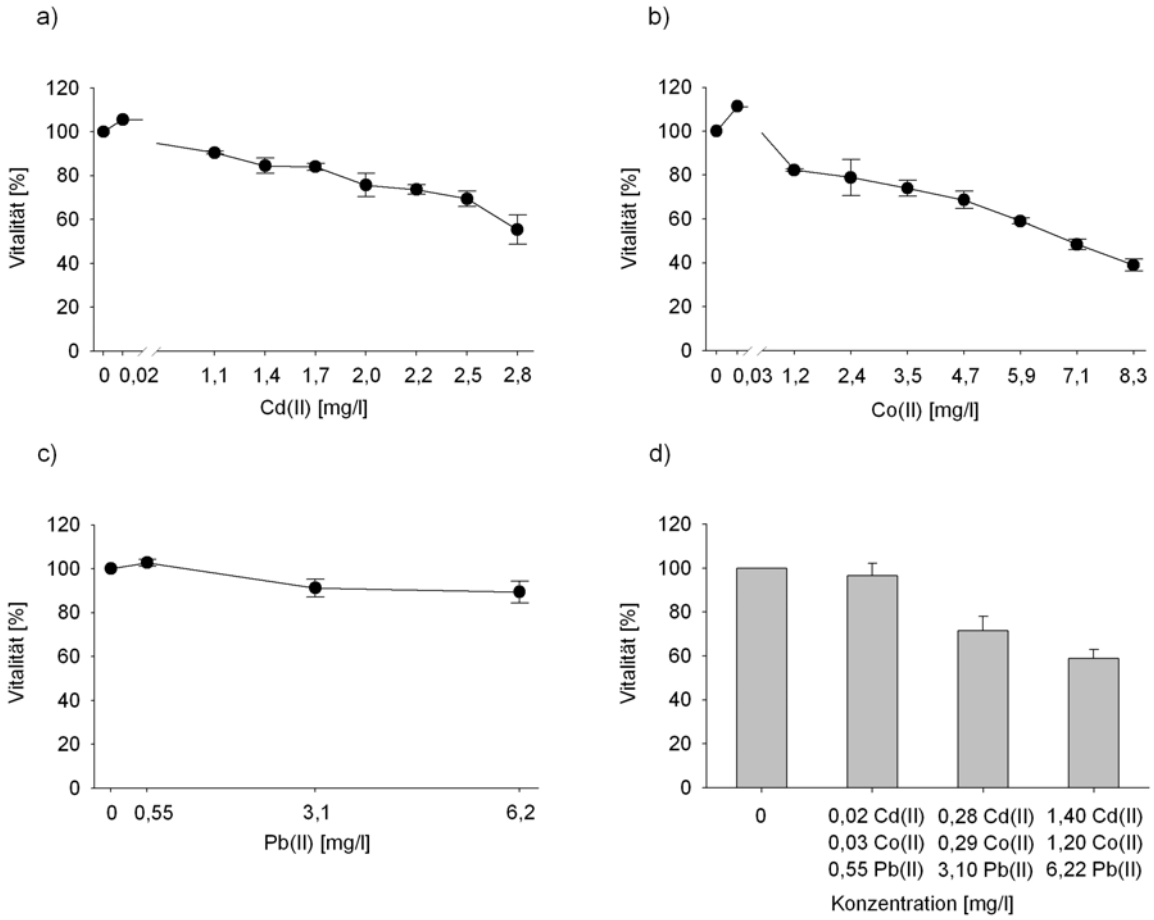



**Abb. 48 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) über drei Tage.**

Die Kulturen wurden über drei Tage mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) einzeln und in Kombination inkubiert. Angegeben ist jeweils die Vitalität als Mittelwert aus der angegebenen Anzahl an Experimenten ± SEM, bezogen auf ohne Metallzugabe kultivierte Zellen.

a) Inkubation mit Cd(II); n=5; Patienten: B243, B244, B245, B246, B248

b) Inkubation mit Co(II); n=4; Patienten: B243, B244, B245, B248

c) Inkubation mit Pb(II); n=2; Patienten: B248, B252

d) Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II); n=2; Patienten: B248, B252

Bei den NHBE-Zellen war ab 2,0 mg/l Cd(II) die Vitalität im Vergleich zu unbehandelten Kulturen signifikant um 25 % reduziert ($p \leq 0,05$). Inkubation mit 3,5 mg/l Co(II) führte ebenfalls zu einer Reduktion der Vitalität von 25 %. Dreitägige Belastung mit 3,5 mg/l Pb(II) reduzierte die Vitalität um 10 %. Kombinierte Exposition gegenüber 0,28 mg/l Cd(II), 0,29 mg/l Co(II) und 3,11 mg/l Pb(II) führte zu einer Reduktion der Vitalität um 29 %.

**- Wirkungen von Cd(II), Co(II) und Pb(II) auf die Genexpression in Bronchialepithelzellen**

Zur Beantwortung der Frage, ob bereits für in-vitro Experimente verhältnismäßig niedrige Konzentrationen an Cd(II), Co(II) und Pb(II) Effekte auf die RNA-Expressionsmuster in Primärkulturen von NHBE-Zellen haben können, wurden Konzentrationen in Höhe von im Jahre 2003 gültigen Grenzwerten für das Humanbiomonitoring bei der Behandlung eingesetzt. Hierfür wurden NHBE-Zellen von vier verschiedenen Patienten (B214, B215, B216 und B218) über 72 h mit den genannten Metallen in den folgenden Konzentrationen jeweils einzeln und in Kombination behandelt: Cd(II) 15 µg/l, Co(II) 25 µg/l und Pb(II) 550 µg/l. Diese Werte entsprachen den im Jahre 2003 gültigen Grenzwerten für das Humanbiomonitoring von exponierten Arbeitern: 15 µg/l Cd(II), EKA-Wert für Cd(II) im Vollblut, im Jahr 2007 ersetzt durch den BLW 7 µg/l Vollblut; 25 µg/l Co(II), EKA-Wert für Co(II) im Vollblut, abhängig von der Arbeitsstelle und 550 µg/l Pb(II) im Vollblut, dem bis 31. Dezember 2005 gültigen BAT-Wert für männliche Arbeiter an speziellen Arbeitsplätzen mit hoher Exposition, welcher mittlerweile durch den BLW von 400 µg/l Vollblut für männliche Arbeiter ersetzt wurde (DFG, 2003; DFG, 2007). Um Einflüsse der Nährstoffversorgung auf die Genexpression der Zellen auszuschließen, wurde das Kulturmedium täglich gewechselt.

Behandlung der Zellen mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination, führte in den Kulturen aller vier Patienten zu deutlichen Veränderungen in den Genexpressionsmustern, wie aus der Darstellung mittels Hauptkomponentenanalyse ersichtlich ist (Abb. 49, S.92 und Abb. 52 (Anh.), S.170; Glahn et al., 2008). In die Hauptkomponentenanalyse wurden 590 Probepaar-Sets einbezogen, die in mindestens einem der vier Experimente um mindestens das Zweifache moduliert waren. Die durch die einzelnen Hauptkomponenten erklärte Varianz ist in Abb. 53 (Anh.), (S.171) ersichtlich. Die ersten drei Hauptkomponenten erklären 75,7 % der Varianz.

Die Kulturen der einzelnen Patienten zeigen klare inter-individuelle Unterschiede bei den Effekten der Kombinationsbehandlung auf die Genexpressionsmuster, wie an den verschiedenen Richtungen erkennbar ist, in die die Proben in einem durch die ersten drei Hauptkomponenten definierten Raum versetzt sind. In den mit allen drei Schwermetallen inkubierten Kulturen sind, verglichen mit den Kontrollen, je nach Patient zwischen 60 und 191 Gene mindestens um das Zweifache induziert. In denselben Proben sind zwischen 8 und 92 Gene mindestens auf die Hälfte reprimiert. In Tab. 32 (Anh.), (S.172) sind die Gene verzeichnet, deren Expression in mindestens zwei der vier Kulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) nach Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage um mindestens das Zweifache verändert war.

Unter den auffälligsten Genen mit erhöhter Transkription waren Enzyme des Fremdstoffmetabolismus wie die Dihydrodiol-Dehydrogenasen 1 und 2, Enzyme des Glutathionhaushalts (Glutathion-Peroxidase 2, Glutamatcystein-Ligase (γ-Glutamylcystein-Synthetase)), das Transmembranprotein Tetraspanin 7, sowie Enzyme der Steroidbiosynthese und des Fettsäurestoffwechsels (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), Squalen-Epoxidase, Acyl-Coenzym-A-Synthetase long-chain family member 4). Unter den reprimierten Genen waren die zellzyklusassoziierten Gene Cyklin A1 und GAS1 (Growth Arrest-Specific 1), sowie der Interleukin

13 Rezeptor Alpha 2 (IL13RA2) aus der JAK-STAT Signalkaskade und WNT4 aus dem WNT Signalweg.

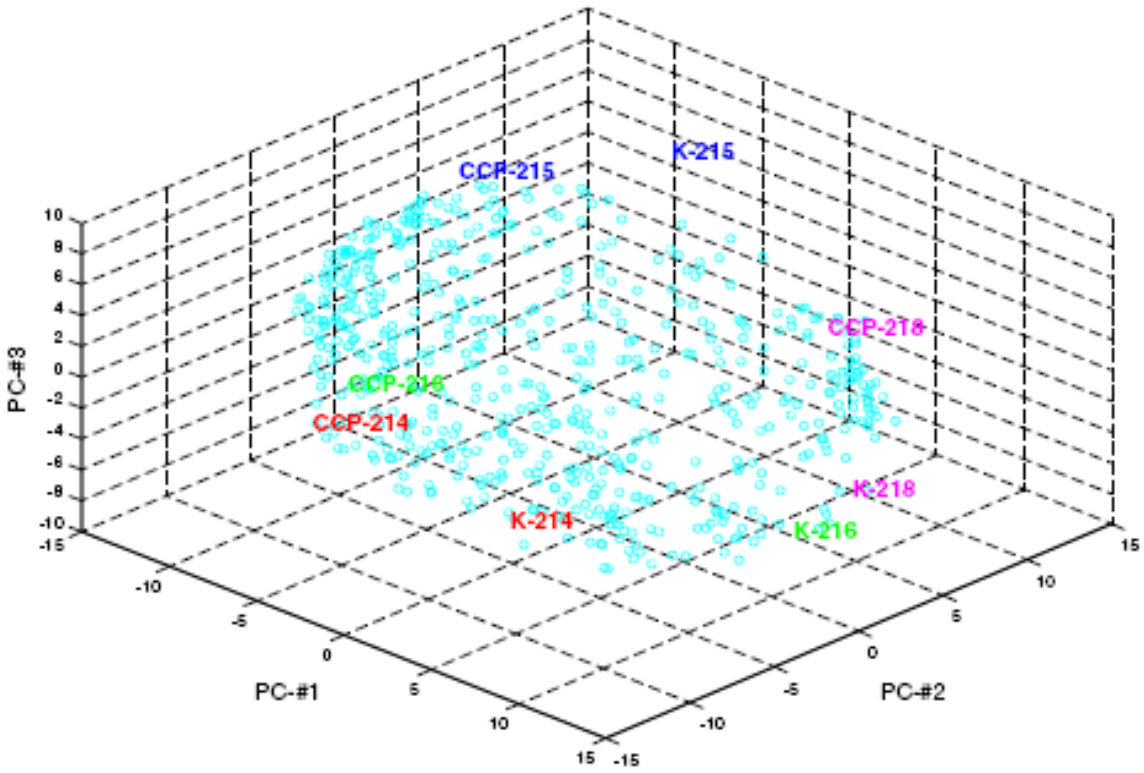



**Abb. 49 Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage.**

NHBE-Zellen wurden über drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination inkubiert, diese Proben sind mit „CCP“ gekennzeichnet. Die unbehandelten Kontrollen sind mit „K“ bezeichnet. Die Hauptkomponentenanalyse basierte auf 590 Probenpaar-Sets, die in mindestens einem der vier Experimente um mindestens das Zweifache moduliert waren.

Durch Analyse mit dem Softwarepaket GOstats konnten die durch kombinierte Exposition gegenüber Cd(II), Co(II) und Pb(II) modulierten Gene bestimmten biologischen Prozessen, sog. KEGG-Pathways, sowie GO Kategorien zugeordnet werden. So zeigte sich in den Proben aller vier Patienten eine Überrepräsentation von Genen des Glutathionhaushalts. Induziert war neben Genen aus dem Cysteinstoffwechsel auch die γ-Glutamylcystein-Synthetase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glutathionbiosynthese (vgl. Tab. 33 (Anh.), S.175; Tab. 8, S.93 und Abb. 50, S.93).
Auffällig ist weiterhin die verminderte Transkription von an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Genen in den behandelten Kulturen von allen vier Patienten. Dies betrifft besonders Gene, die den Verlauf der Mitose steuern (vgl. Tab. 33 (Anh.), S.175). In diesem Zusammenhang ist auf die erkennbare Deregulierung von Genen des Pyrimidin- und Purinmetabolismus hinzuweisen (vgl. Abb. 54 (Anh.), S.179; Tab. 34 (Anh.), S.180 und Abb. 55 (Anh.), S.181; Tab. 35 (Anh.), S.180).

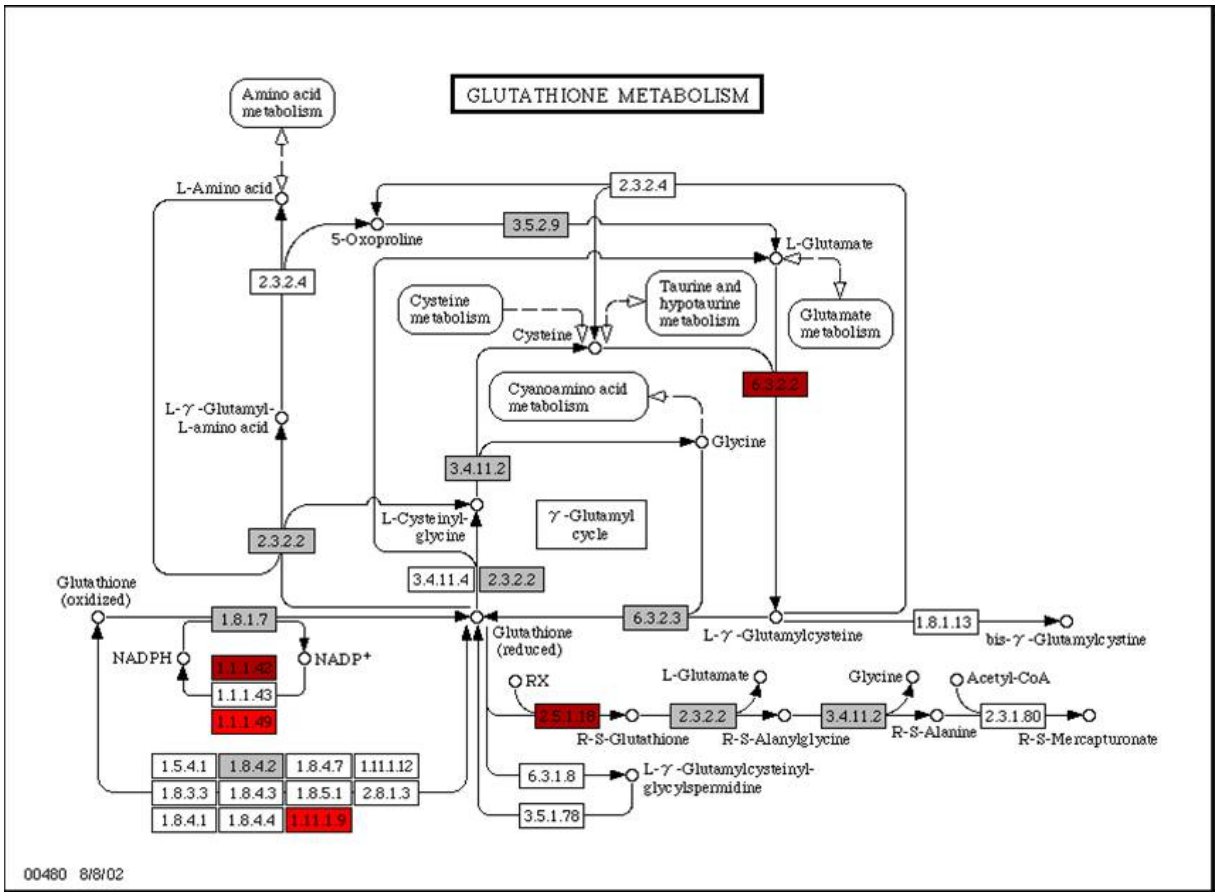



**Abb. 50 Schematischen Darstellung der Gene des Glutathionhaushalts, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren, mittels KEGG Pathway.**

NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) wurden über drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination behandelt. Dunkelrot markierte Gene sind in den behandelten Kulturen von zwei der vier Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Hellrot markierte Gene sind mindestens in den Kulturen von drei Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Grau unterlegte Gene sind spezifisch für den Menschen.

**Tab. 8 Gene des Glutathionhaushalts, die nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren.**

Zur Erläuterung der Farben vgl. Legende zu Abb. 50, S.93.

| EC-Nummer: | Symbol: | Name: |
|---|---|---|
| 1.1.1.49 | G6PD | Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase |
| 1.11.1.9 | GPX2 | Glutathion-Peroxidase |
| 6.3.2.2 | GCLC | Glutamatcystein-Ligase, katalythische Untereinheit |
| 1.1.1.42 | IDH1, IDH2, icd | Isocitrat-Dehydrogenase |
| 2.5.1.18 | GST | Glutathion-S-Transferase |

Des Weiteren waren Gene aus biologischen Prozessen wie der zellulären Antwort auf oxidativen Stress, sowie anti-apoptotisch wirksame Gene induziert (vgl. Tab. 33 (Anh.), S.175). Die Transkription von Genen des Cholesterin-, Steroid- und Lipidstoffwechsels war ebenfalls erhöht (vgl. Tab. 33 (Anh.), S.175; Tab. 36 (Anh.), S.180 und Abb. 56 (Anh.), S.182). Enzyme des Fremdstoffmetabolismus wie Oxidoreduktasen, darunter 3-α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase und trans-1,2-Dihydrobenzol-1,2-diol-Dehydrogenase wurden ebenfalls verstärkt exprimiert (vgl. Tab. 33 (Anh.), S.175). Dies steht im Einklang mit der beobachteten Überrepräsentation von Genen des endoplasmatischen Retikulums, in dem auch die Oxidoreduktasen aus der Familie der Cytochrom-P450-Isoenzyme lokalisiert sind. Die induzierten Cytochrom-P450-Enzyme sind in Abb. 57 (Anh.), (S.184) und Tab. 37 (Anh.), (S.184) zusammengefasst.

Zur Untersuchung der Mechanismen, die der Regulation der veränderten Gene in den mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination behandelten Zellen zugrunde liegen, wurde eine Promotoranalyse zur Ermittlung von Transkriptionsfaktoren durchgeführt, deren Bindungsstellen in den Promotorregionen der veränderten Gene überrepräsentiert waren. Dies geschah unter Verwendung des Programms PRIMA (Elkon et al., 2003). Es konnten zwölf Transkriptionsfaktoren bestimmt werden, deren Bindungsstellen in den Promotorregionen der in den behandelten Kulturen induzierten oder reprimierten Gene im Vergleich zu den Promotoren des Genexpressionsmusters der unbehandelten Kulturen in mindestens zwei der vier Patienten überrepräsentiert waren (vgl. Tab. 38 (Anh.), S.185). Unter diesen Transkriptionsfaktoren sind einige, die an der Stressantwort und dem Überleben der Zelle beteiligt sind, wie Oct-1, HIC1, YY1, TGIF, CREB, ATF4 und SRF, wohingegen Elk-1 sowie die verminderte Aktivität von GABP wachstumshemmend wirken. Es ist jedoch festzustellen, dass die Kulturen aus dem Gewebe von verschiedenen Patienten unterschiedliche Reaktionen auf die Exposition gegenüber den untersuchten Schwermetallen zeigten. Beispielsweise sind Elk-1, GABP, ATF und YY1 in den Experimenten mit B216 und B218 in den Promotorregionen der reprimierten Gene überrepräsentiert, wohingegen sie im Experiment mit B215 in denen der induzierten Gene überrepräsentiert sind.

Innerhalb der Experimente, in denen die Primärkulturen der NHBE-Zellen der Patienten B214, B215 und B218 mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination behandelt wurden, wurden auch Kulturen mitgeführt, die nur mit jeweils einem der drei Metalle behandelt wurden. Für die Inkubationen wurden die gleichen Konzentrationen wie in den Kombinationsexperimenten gewählt: 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II). Auch die Behandlung mit den einzelnen Schwermetallen führte zu Veränderungen in den Genexpressionsmustern der Zellen, wie in der Hauptkomponentenanalyse erkennbar ist (vgl. Abb. 51, S.95 und Abb. 58 (Anh.), S.187). In die Hauptkomponentenanalyse wurden 1531 Probenpaar-Sets einbezogen, die sich in einem von 66 möglichen paarweisen Vergleichen um mindestens das Vierfache unterschieden. Die durch die einzelnen Hauptkomponenten erklärte Varianz ist in Abb. 59 (Anh.), (S.188) dargestellt. Die ersten drei Hauptkomponenten erklären 86,1 % der Varianz.

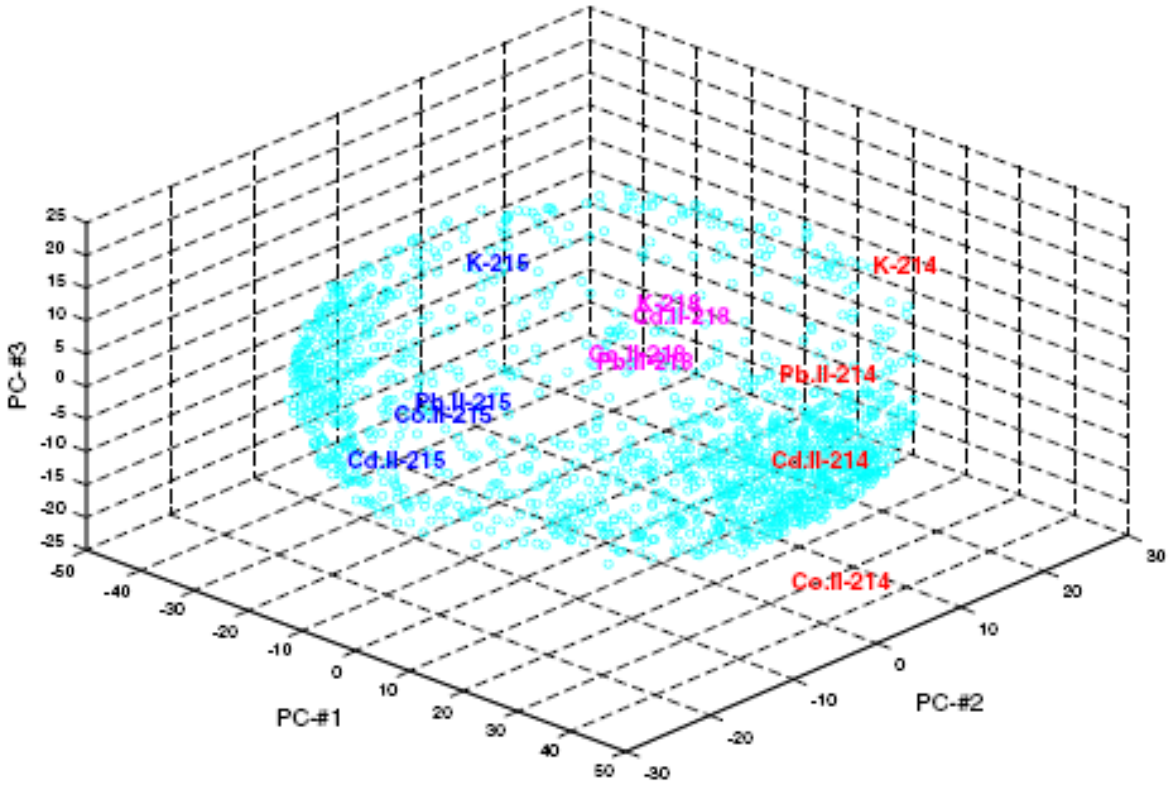



**Abb. 51 Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, und B218) nach Inkubation entweder mit Cd(II), Co(II) oder Pb(II) über drei Tage.**

NHBE-Zellen wurden entweder mit 15 µg/l Cd(II) „Cd II“, 25 µg/l Co(II) „Co II“ oder 550 µg/l Pb(II) „Pb II“ inkubiert. Die unbehandelten Kontrollen sind mit „K“ bezeichnet. Die Hauptkomponentenanalyse basierte auf 1531 Probenpaar-Sets, die sich in mindestens einem von 66 möglichen paarweisen Vergleichen um mindestens das Vierfache unterschieden.

Im weiteren Verlauf der Analyse der Expressionsmuster wurde versucht, Gene zu ermitteln, deren Deregulation jeweils für eines der drei Schwermetalle spezifisch war. Es war möglich, Indikatorgene für die Behandlung mit Pb(II) zu finden, die durch eine Inkubation mit Cd(II) oder Co(II) in den eingesetzten Konzentrationen nicht moduliert wurden (vgl. Tab. 39 (Anh.), S.189). Hier sind die Dihydrodiol-Dehydrogenase 1, Tetraspanin 7 und die Glutamatcystein-Ligase hervorzuheben. Weiterhin konnte ein Gen ermittelt werden das in allen drei untersuchten Kulturen (B214, B215 und B218) als Indikator für eine Belastung mit Cd(II) verwendet werden kann: SMC3 (vgl. Tab. 40 (Anh.), S.190). In zwei der drei Kulturen (B215 und B218) war ZNF83 als zweites Indikatorgen induziert. Es konnten jedoch keine Gene ermittelt werden, die durch den Kontakt mit Co(II), nicht jedoch durch Cd(II) oder Pb(II), moduliert wurden.

Darüber hinaus war es möglich, einige Gene zu identifizieren, die nur nach kombinierter Exposition gegenüber allen drei Schwermetallen moduliert waren (vgl. Tab. 41 (Anh.), S.190). Unter anderem die Induktion der Tymidylat-Synthetase aus dem Pyrimidinmetabolismus in den Kulturen von B216 und B218. Wohingegen das zellzyklusassoziierte Gen Cyklin A1 sowie der Interleukin 13 Rezeptor Alpha 2 (IL13RA2) aus der JAK-STAT Signalkaskade in diesen Kulturen reprimiert waren.

# 4 Diskussion

## 4.1 Zellkultur als Modellsystem

Der Respirationstrakt stellt aufgrund seiner physiologischen Funktion auch einen wichtigen Aufnahmepfad für unterschiedliche luftgetragene Fremdstoffe dar. Die Lunge besitzt verschiedene Schutzmechanismen gegen Xenobiotika. Dazu zählen u.a. *Mukoziliäre Clearance*, Enzyme des Phase-I- und -II-Stoffwechsels, Thiolpeptide und -proteine, sowie Transportproteine zur Eliminierung von Substanzen aus den Zellen. Zu den Transportproteinen zählen auch die *Multidrug Resistance-Associated Proteine* (MRP). Für MRP1 bis 8 ist bekannt, dass sie ein breites Spektrum unterschiedlicher Substanzen transportieren und obwohl Überschneidungen zwischen den Substratspektren existieren, gibt es keine zwei MRP-Isoformen, die identische Substratspektren aufweisen. Die physiologischen Funktionen der meisten MRP sind noch nicht vollkommen aufgeklärt (Deeley et al., 2006). Nachdem jedoch bereits für einige Isoformen ein Transport von Metallkomplexen beschrieben wurde (Dijkstra et al., 1996; Leslie et al., 2004; Liu et al., 2003), wurde in der vorliegenden Arbeit der Beitrag dieser Transporter zur Eliminierung bestimmter Metallionen und, damit verbunden, ihre Bedeutung für Risiken durch toxische Metalle untersucht.

Obwohl Inhalation nicht den Hauptweg der täglichen Belastung des Menschen mit Schwermetallen darstellt, ist jeder Mensch über diesen Pfad chronisch gegenüber geringen Mengen davon exponiert. In Städten resultiert eine Hintergrundbelastung mit Schwermetallen beispielsweise aus dem Einsatz fossiler Brennstoffe und dem Reifenabrieb. Daneben kommt es beim Rauchen oder an Arbeitsplätzen in der Pigment- oder Batterieherstellung, dem Recycling von Elektrogeräten sowie in der Metallverarbeitung zu einer erhöhten inhalativen Exposition gegenüber Schwermetallen (Cyrys, et al., 2003; Hengstler et al., 2003a). Metalle können in lebenden Organismen zwar Redox-Reaktionen eingehen und teilweise auch methyliert werden, im Unterschied zu organischen Verbindungen ist jedoch ein Abbau nicht möglich, was zu einer Anreicherung im Organismus führen kann.

Kulturen von humanen Lungenzellen wurden bereits für die Untersuchung der pulmonalen Effekte unterschiedlicher Substanzen eingesetzt. Tumorzelllinien stellen hierbei ein verbreitetes Modellsytem dar, da sie wegen ihres kontinuierlichen Wachstums leicht verfügbar sind. Dieser aus der Immortalisierung der Zellen resultierende Vorteil ist jedoch damit verbunden, dass sich die Zellen in bestimmten Eigenschaften deutlich von denen in einem normalen Organismus unterscheiden. So ist beispielsweise in der Tumorzelllinie H322 die Zellzykluskontrolle durch eine endogene Mutation im p53-Gen gestört (Wiebel et al., 1986). In der humanen Lungentumorzelllinie A549 sind zwar noch die wichtigsten Vertreter der Cytochrom P-450 Isoenzyme nachweisbar, ihre Aktivitäten liegen jedoch deutlich unter denen in der menschlichen Lunge (Castell et al., 2005). Primärkulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen bieten hier eine Alternative: Sie bilden zum einen die *in-vivo*-Verhältnisse besser ab (z.B. in Bezug auf die Induzierbarkeit von CYP2E1 (Runge et al, 2001)). Zum anderen werden in Primärkulturen die inter-individuellen Unterschiede, insbesondere bei der Grundexpression von MRP-Transportern (vgl. hierzu auch Lehmann et al., 2001 und 2005) und in der allgemeinen Reaktion auf den Kontakt mit bestimmten Schwermetallen (vgl. 4.5) besser erfasst. Das

in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren zur Kultivierung der normalen humanen Bronchialepithelzellen stellt eine Modifizierung des von Lechner und La Veck beschriebenen Protokolls dar (Lechner und La Veck, 1985). Das zur Anzucht der Kulturen eingesetzte Gewebe war tumorfrei und laut histopathologischer Untersuchung gesund; die Kulturen bestanden zu 95 % aus epithelialen Zellen (immunhistochemisch nachgewiesen (Lehmann et al., 2001; Torky et al., 2005)). Auch die Expression der MRP-Transporter 1 bis 5 wurde in diesem Modellsystem bereits immunhistochemisch nachgewiesen (Torky et al., 2005). Primärkulturen von NHBE-Zellen ließen sich bis zu 18 Wochen kultivieren (Lehmann et al., 2001). Aufbauend auf diese Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit die Langzeiteffekte verschiedener Metallionen mit diesem Modellsystem untersucht. Zur näheren Charakterisierung des Modells wurde zunächst die Expression von MRP1 bis 5 in unbehandelten Kulturen über einen Zeitraum von bis zu 36 Tagen ermittelt.

Die getrennt geführten Kulturen aus den Geweben von zwei Patienten (B182 und B201) zeigten nach 18 Tagen zwar - verglichen mit den jeweiligen Kulturen nach 9 Tagen - keine signifikanten Änderungen der mRNA-Menge von MRP1, 3 und 4 (vgl. Abb. 8, S.45), dennoch sind bereits nach dieser Zeit signifikante inter-individuelle Unterschiede zwischen den Donoren detektierbar. Die Expressionen dieser Transporter in den NHBE-Zellen beider Patienten entwickelten sich gegenläufig: Während es bei B201 zu einer Induktion vor allem von MRP4, aber auch von MRP1 kommt, verringert sich die Expression von MRP1 und 3 in B182. Die Mengen von MRP5 in B182 und B201 nach 18 Tagen sowie die in B201 nach 36 Tagen können aufgrund der Streuung der Ergebnisse, die möglicherweise durch die geringe absolute Expression dieses Gens verursacht wird, nicht abschließend bewertet werden. Im weiteren Verlauf der Kultur kommt es nach 36 Tagen in B201 zu einer signifikanten Repression von MRP1 und 3. MRP2 und UMAT waren gar nicht nachweisbar. Für die Entwicklung der mRNA-Menge von MRP1 in NHBE-Zellen innerhalb der ersten beiden Generationen in Kultur sind bereits inter-individuelle Unterschiede beschrieben worden. Die Bandbreite der Reaktionen reicht von einer Repression auf 77 % bis zu einer Induktion auf 300 % (Lehmann et al., 2005). In den Kulturen einiger Patienten steigt die MRP1-Menge nach 18 Wochen auf das 4- bis 11-fache (Lehmann et al., 2001). Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten MRP-Isoformen weist MRP1 in der menschlichen Lunge die höchste absolute Expression auf, es kommt vor allem in Bronchialepithel- und AII-Zellen vor (Deeley et al., 2006). Die MRP5-Menge ist deutlich geringer, jedoch noch höher als die von MRP3 und 4 (Kool et al., 1997). Zu MRP2 gab es unterschiedliche Befunde; nach Kool et al. 1997 ist der Transporter auf mRNA-Ebene nicht nachweisbar, Deeley und Mitarbeiter beschrieben jedoch eine MRP2-Expression in der Lunge (Deeley et al., 2006). Dieser Widerspruch ist möglicherweise durch große inter-individuelle Unterschiede in der Expression von MRP2 zu erklären, wie sie auch für die Expression von MRP3 in der Leber beschrieben wurden (Lang et al., 2004). In den verwendeten Primärkulturen von NHBE-Zellen waren die in der humanen Lunge relevanten MRP-Transporter über einen Zeitraum von bis zu 36 Tagen in Kultur nachweisbar, sie stellen damit ein geeignetes Modellsystem zur Darstellung der Effekte einer Langzeitexposition gegenüber Metallionen auf die Expression dieser Transporter dar.

Die Expression von MRP1 in NHBE-Zellen konnte mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie auch auf Proteinebene gezeigt werden (Abb. 9, S.46 und Abb. 10, S.47). Hierbei wurden die Ergebnisse von Torky et al. bestätigt (2005). Torky et al. verglichen unter anderem die Lokalisierung von MRP1 in klassischen, also von Medium bedeckten (sog. Submerskulturen) mit der in *dry-wet*-Kulturen, die auf Membranen kultiviert wurden und so nur an ihrer Unterseite mit dem Medium in Kontakt standen. Unter *dry-wet*-Bedingungen wurde MRP1 polarisiert, d.h. nur an der basolateralen Seite exprimiert, wohingegen die Expression unter klassischen Bedingungen nicht polarisiert erfolgte. Aufgrund dieser polarisierten Expression von MRP1 in *dry-wet*-Kulturen von NHBE-Zellen auf Membranen, könnten diese Kulturen als Modellsystem zur Beaufschlagung mit luftgetragenen Substanzen in Form von Gasen oder Aerosolen fungieren (Aufderheide et al., 2002). Daneben wurden Zellkulturen auf Membranen auch zur Untersuchung des Transports von Substanzen über biologische Barrieren, wie sie auch das Bronchialepithel darstellt, genutzt (Forbes und Erhardt, 2005). Hierbei wurden allerdings Submerskulturen von Zellen auf Membranen eingesetzt. Auch NHBE-Zellen können unter solchen Bedingungen kultiviert werden. Hierbei behielten sie ihre epitheltypische polygonale Form (Abb. 11, S.48). Um in einem solchen Modellsystem den Transport beispielsweise eines Metallkomplexes über Kompartimentgrenzen hinweg bestimmen zu können, müssen die zu untersuchenden Transportproteine jedoch eine polarisierte Expression aufweisen. Leider war ein Einsatz von Submerskulturen von NHBE-Zellen auf Membranen für Transportexperimente nicht möglich, da die Expression von MRP1 in derartigen Kulturen nur nicht-polarisiert erfolgte (Abb. 10, S.47). In den meisten polarisierten Zellen des Organismus, wie beispielsweise vielen epithelialen oder endothelialen Zellen, wird MRP1 basolateral exprimiert (Deeley et al., 2006). Eine Ausnahme hierzu stellt die apikale Lokalisation in mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns dar (Nies et al., 2004). Wie diese zellspezifische Orientierung der Expression gesteuert wird, ist bisher nicht bekannt (Bakos und Homolya, 2007; Deeley et al., 2006). Intrazelluläre Expression von MRP1 wurde bisher unter anderem in Zellen der Nasenschleimhaut (Wioland et al., 2000) sowie in einigen Zellkulturen, wie den Lungentumorzelllinien H69AR und GLC4-Adr (Almquist et al., 1995; Cole et al., 1992) beschrieben. Die intrazelluläre Funktion von MRP1 ist noch nicht aufgeklärt. Nachdem jedoch ein Transport fluoreszierender Substrate durch MRP1 in perinukleäre Lysosomen und trans-Golgi-Vesikel demonstriert wurde (Rajagopal und Simon, 2003; Van Luyn et al., 1998), ist zu vermuten, dass MRP1 am Transport von Substraten in diese intrazellulären Kompartimente beteiligt ist. Da gezeigt wurde, dass der Transporter bei steigendem Bilirubinspiegel in Astrozyten vom Golgi-Apparat in die Plasmamembran transloziert, kann intrazelluläres MRP1 auch eine Speicherform darstellen (Gennuso et al., 2004).

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente zur Untersuchung der Wirkungen verschiedener Metalle auf humane Lungenzellen, wurden jedoch ausschließlich unter klassischen Bedingungen gehaltene Kulturen verwendet, da dieses System bereits für Langzeitkulturen optimiert ist. Dies ist für *dry-wet*-Kulturen bisher noch nicht der Fall. Weiterführende Arbeiten sollten jedoch die Etablierung von Langzeitkulturen humaner Lungenzellen unter *dry-wet*-Bedingungen zum Ziel haben, da an diesem Modellsystem die Effekte einer chronischen Exposition gegenüber toxischen Aerosolen

untersucht werden können. Kurzzeitexperimente mit Tabakrauch oder Dieselabgasen an *dry-wet*-Kulturen wurden bereits beschrieben (Ritter et al., 2003; Seagrave et al., 2007).

## 4.2 Bewertung von Arsenit

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Beitrag von MRP-Transportern zur Resistenz von humanen Lungenzellen gegenüber Arsenit untersucht. Eine Induktion von MRP-Transportern durch Arsenit wäre zum einen insofern klinisch relevant, als Arsenit sowohl bei inhalativer als auch bei oraler Exposition kanzerogen wirkt (u.a. in der Lunge) (GESTIS, 2004; IARC, 2004a). Die erhöhte Expression von MRP-Transportern jedoch ist ein möglicher Mechanismus für die Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika, welche eines der Haupthindernisse bei der Therapie von Krebs darstellt. Zum anderen wird Arsenit jedoch auch erfolgreich zur Behandlung der refraktären akuten promyelozytischen Leukämie eingesetzt (Bachleitner-Hofmann et al., 2002; Cohen et al., 2001). Darüber hinaus wird eine Anwendung verschiedener arsenhaltiger Verbindungen bei der Therapie weiterer Formen der Leukämie sowie anderer maligner Erkrankungen untersucht (Ralph, 2008). Eine Induktion von MRP-Transportern durch Arsenit würde die Erfolgsaussichten einer solchen Anwendung reduzieren, wenngleich die klinische Relevanz der MRP-Transporter in diesem Zusammenhang nach wie vor umstritten ist (O´Connor, 2007; Deeley et al, 2006; Filipits et al., 2007).

### Arsenit-Toxizität

Die relative Vitalität von H322-Kulturen war bei 10 µM Arsenit bereits signifikant auf 91 % reduziert, bei 25 µM auf 79 % (Abb. 12, S.49). Nach fünftägiger Belastung mit Arsenit führten bereits 5 µM Arsenit zu einer Reduktion der relativen Vitalität um 22 %, ein $IC_{50}$-Wert wurde nicht ermittelt (Abb. 13, S.50). CHO Zellen, die für 24 h mit Arsenit behandelt wurden, zeigten im Trypanblau-Test bei 10 µM noch keine Reduktion der Vitalität, bei 100 µM Arsenit jedoch waren keine lebenden Zellen mehr erkennbar (Dopp et al., 2005). Ling et al. ermittelten die $IC_{50}$-Werte im MTT-Test nach 72-stündiger Inkubation mit Arsenit an unterschiedlichen Zelllinien, unter anderem auch an den nicht-kleinzelligen Lungentumorzellen H661 (6,40 µM), H520 (12,67 µM), H322 (13,33 µM) und H460 (14,60 µM) in RPMI-1640-Medium mit 10 % FKS (Ling et al., 2002).

Zur Untersuchung des Beitrags von MRP-Transportern zum Schutz von Zellen vor einer Substanz kann man in Koinkubationsexperimenten den Einfluss von Inhibitoren der MRP-Transporter auf unterschiedliche Effekte - wie Zytotoxizität oder DNA-Schädigung - der Substanz in Zellkulturen untersuchen. Aufgrund der breiten Substratspezifitäten der MRP-Transporter und der großen Überschneidungen zwischen ihren Substratspektren ist es erklärlich, dass die meisten gebräuchlichen MRP-Inhibitoren mehrere Isoformen dieser Transporter hemmen. Obwohl immer mehr Substanzen beschrieben werden, die an MRP-Proteine binden, ohne von ihnen transportiert zu werden, wirken viele Substrate schlicht als kompetitive Inhibitoren, oft ist es auch nicht bekannt ob der Inhibitor transportiert wird oder nicht (Deeley et al., 2006). Experimentell wurden MRP-Inhibitoren dazu verwendet die Beiträge von MRP-Transportern zur Resistenz von Zellen gegenüber einer Vielzahl von

Wirkstoffen, sowie dem Transport von Endo- und Xenobiotika zu untersuchen. Einer der am längsten bekannten Inhibitoren ist das als $LTD_4$-Antagonist entwickelte MK571, welches MRP1 bis 5 inhibiert (Gekeler et al., 1995, Haimeur et al., 2004; Rius et al., 2003). Einige Substanzen sind noch unspezifischer. Beispielsweise hemmt Probenecid eine Vielzahl von Transportern für organische Anionen (Bakos et al., 2000). Für einige nichtsteroidale Antiphlogistika wie Indometacin wurde ebenfalls gezeigt, dass sie MRP1 unabhängig von Ihrer Wirkung auf Cyclooxygenasen hemmen (Draper et al., 1997, Duffy et al., 1998). Indometacin wird schnell glucuronidiert, möglicherweise hemmt dieses Konjugat den Transport anderer Substrate kompetitiv (Borst und Oude-Elferink, 2002). Die spezifischsten bekannten Inibitoren für MRP1 sind momentan die trizyklischen Isoxazole LY465803 und LY475776. Sie besitzen $EC_{50}$-Konzentrationen zwischen 10 und 80 nM und wirken deutlich schwächer auf andere Transporter wie MDR1, BCRP, MRP2 und MRP3 (Norman et al., 2002, Norman et al., 2005; Quian et al., 2002; Shepard et al., 2003). Da jedoch, wie im Folgenden dargestellt, die Beiträge der verschiedenen MRP-Isoformen zur Detoxifizierung von Metallen noch unzureichend untersucht sind, wurde in der vorliegenden Arbeit mit MK571 ein MRP-Inhibitor mit breitem Wirkspektrum gewählt, um mögliche Beteiligungen von MRP1 bis 5 simultan zu erfassen.

MK571 erhöht die Empfindlichkeit von H322 Zellen sowohl bei ein- als auch bei fünftägiger Behandlung mit Arsenit signifikant (Abb. 12, S.49 und Abb. 13, S.50), was die Ergebnisse an der mit Antimon selektierten MRP1-überexprimierenden humanen Lungentumorzelllinie GLC4/Sb30 bestätigt. Deren gesteigerte Toleranz gegenüber Arsenit wurde durch MK571 ebenfalls wieder aufgehoben (Vernhet et al., 2001a). Auch die NHBE-Zellen wiesen nach Vorbehandlung mit MK571 eine verminderte Toleranz gegenüber Arsenit auf (Abb. 18, S.56 und Abb. 19, S.57), demnach scheint auch in diesen Zellen mindestens ein MRP-Transporter zur Resistenz gegenüber Arsenit beizutragen. Styblo et al. verglichen die Empfindlichkeiten verschiedener humaner Zellkulturen gegenüber einer 24-stündigen Behandlung mit Arsenit mittels MTT-Assay. Dabei ermittelten sie für Primärkulturen von NHBE-Zellen eine Vitalität von 30 % (4 µM As(III)), bzw. 20 % (10 µM As(III)) (Styblo et al., 2000). Diese Werte liegen deutlich unter den Ergebnissen dieser Arbeit (Abb. 18, S.56 und Abb. 19, S.57). Möglicherweise sind diese Unterschiede auf unterschiedliche Kulturmedien zurückzuführen, da Styblo et al. das serumfreie Medium BEGM von Clonetics verwendeten. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Styblo et al. war bei niedrigen Dosen Arsenit (1 µM) eine auf 120 % erhöhte Proliferation erkennbar. Dieser Effekt trat bei den anderen untersuchten Zelltypen (Primärkulturen von humanen und Rattenhepatozyten, normalen humanen epidermalen Keratinozyten, humanen Urothelzellen) nicht auf (Styblo et al., 2000). Der von Styblo et al. vertretenen Schlussfolgerung, wonach NHBE-Zellen deutlich empfindlicher auf Arsenit reagieren als die anderen untersuchten Zelltypen, kann jedoch nicht gefolgt werden. Vergleicht man die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten relativen Vitalitäten bei 10 µM As(III) von NHBE-Zellen (88 % - 118 %) mit den relativen Vitalitäten der anderen untersuchten Zelltypen der Studie von Styblo et al. bei gleicher Arsenit-Konzentration, ist keine höhere Empfindlichkeit von NHBE-Zellen erkennbar (Primärkulturen von humanen Hepatozyten (80 %), Rattenhepatozyten (60 %), normalen humanen epidermalen Keratinozyten (90 %), humanen Urothelzellen (90 %)).

**MRP Expression unter Arsenit**

Neben anderen Faktoren können Resistenzunterschiede gegenüber Arsenit zwischen verschiedenen Zelltypen auch durch Transportprozesse oder unterschiedliche Expression von MRP-Transportern bedingt sein. Bereits zwei Jahre nach der Erstbeschreibung von MRP1 durch Cole et al.(1992) konnte von der selben Arbeitsgruppe an MRP1-transfizierten HeLa-Zellen gezeigt werden, dass diese eine im Vergleich zu den Ausgangszellen deutlich erhöhte Resistenz unter anderem gegenüber Arsenit, Arsenat, sowie gegen drei- und fünfwertige Antimonsalze aufwiesen (Cole et al., 1992; Cole et al., 1994). Die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Cisplatin und Cadmiumchlorid war jedoch unbeeinflusst. Nach einer Arsenit-Behandlung von MRP1-transfizierten Lungentumorzellen SW-1573/S1 war ein deutlich erhöhter Transport von Glutathion in das Kulturmedium nachweisbar (Scott et al 1995). Mittels NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass As als $As(GS)_3$-Komplex transportiert wird (Zaman et al., 1995).

Leslie et al. zeigten die Beteiligung der membranassoziierten Glutathion-S-Transferase P1-1 (GSTP1-1) an der Bildung dieses Komplexes (Leslie et al., 2004). Arsenit wird durch MRP1 und 2 ausschließlich in Form dieses Komplexes transportiert, wie an Membranvesikeln aus transfizierten HeLa Zellen demonstriert werden konnte. Arsenat und Cd(II) wurden von MRP1 nicht transportiert (Leslie et al., 2004). Dieser Befund ist auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie an TRL1215-Rattenleberepithelzellen, deren erworbene Resistenz gegenüber Arsenit mit verminderter intrazellulärer Akkumulation von Arsenit, erhöhter Expression von Mrp1, 2 und MDR1 sowie der Glutathion-S-Transferase P1-1 einher ging und unter anderem durch Etacrynsäure, einen Inhibitor von Glutathion-S-Transferasen der π-Familie, aufgehoben werden konnte (Liu et al., 2001). Sowohl BSO (Inhibitor der γ-Glutamylcystein-Synthetase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der GSH-Biosynthese) als auch MK571 hoben die Resistenz der Zellen in diesem Experiment ebenfalls wieder auf.

Auch die Ergebnisse der Experimente an MRP1-knock-out-Zellen bestätigen einen Beitrag von MRP1 zur zellulären Resistenz gegenüber Arsenit. Ein Knock-out von MRP1 erhöhte die Empfindlichkeit von Mäusezellkulturen (3T3 Fibroblasten und embryonale Stammzellen) gegenüber Arsenit deutlich (Allen et al., 2000; Lorico et al., 1996), führte in 3T3 Fibroblasten aber nicht zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Cd(II) oder Cisplatin (Rappa et al., 1997). Die Überexpression von MRP1 in Kulturen der humanen Fibrosarkomzelllinie HT-1080 erhöhte deren Resistenz gegenüber Arsenit deutlich, was bei simultaner Überexpression von γ-Glutamylcystein-Synthetase noch stärker ausgeprägt war, als bei einzelner Überexpression eines der beiden Gene (Lorico et al., 2002).

Ishikawa et al. erhielten durch zehnmonatige Kultur von Zellen der humanen Leukämiezelllinie HL-60 in Gegenwart steigender Konzentrationen von Cisplatin die cisplatinresistente Sublinie HL-60/R-CP. Diese Zellen wiesen ungefähr eine Verzehnfachung der Resistenz gegenüber Cisplatin auf und zeigten eine Überexpression von MRP1 sowie eine deutliche Erhöhung (siebenfach) der intrazellulären GSH-Menge (Ishikawa et al., 1994). Wurden Zellen vom Typ HL-60/R-CP für einen Monat ohne Cisplatin kultiviert, sanken sowohl Expression als auch Transportaktivität von MRP1 deutlich. Eine 48-stündige Behandlung mit 20 μM Arsenit im Anschluss an die einmonatige Behandlungspause führte in den

Kulturen zur Induktion von MRP1 und zu einer Erhöhung des intrazellulären GSH auf das Vierfache (Ishikawa et al., 1996). Im Trypanblau-Test zeigten die Zellen ungefähr eine verdreifachte Resistenz gegenüber Arsenit (Ishikawa et al., 1996).

Die Behandlung von Hepatozytenkulturen mit Arsenit für 48 h führte in den höchsten nicht zytotoxischen Konzentrationen sowohl bei Rattenhepatozyten (8 µM As(III)), als auch bei humanen Hepatozyten (4 µM As(III)) zu einer Induktion von MRP2 (Vernhet et al., 2001b). In den Rattenhepatozyten war die Expression von MRP1 und 3 unverändert, in den humanen Kulturen wurden MRP1 und 3 nicht untersucht. Eine Repression von MRP-Transportern durch Arsenit, wie sie in der vorliegenden Arbeit nach 24-stündiger Inkubation von H322-Zellen mit Arsenit für MRP1, 2 und 4 auftrat, wurde bis dato noch nicht beschrieben (Abb. 14, S.51). In zwei cisplatinresistenten humanen Tumorzelllinien hepatischen und epidermalen Ursprungs wurde eine reduzierte Expression von MRP1 und 2 beschrieben (Shen et al., 00). Bemerkenswerterweise war die Toleranz dieser Zellen gegenüber Arsenit ebenfalls erhöht. Die Autoren konnten zeigen, dass diese Resistenz von einer reduzierten, energieabhängigen Aufnahme der beiden Substanzen herrührt. Dennoch konnte in verschiedenen humanen Tumorzelllinien ein Beitrag von MRP2 zur Resistenz gegen Cisplatin demonstriert werden. Taniguchi et al. zeigten in drei cisplatinresistenten humanen Tumorzelllinien eine vier- bis sechsfache Überexpression von MRP2 (Taniguchi et al., 1996). Eine MRP2 überexprimierende humane Melanomzelllinie wies neben erhöhter Resistenz gegen Cisplatin eine reduzierte intrazelluläre Akkumulation desselben sowie eine verminderte Anzahl von DNA-Addukten auf (Liedert et al., 2003).

Durch Kultur in Gegenwart steigender Konzentrationen an Arsenit bis zu 50 µM über einen Zeitraum von zwölf Wochen, lassen sich aus der humanen Hepatomzelllinie HepG2 resistente Klone (HepG2 K1) isolieren (Gebel et al., 2002). Die Toleranz dieser Zellen war, gemessen am $IC_{50}$-Wert bei der Vitalitätsbestimmung im Neutralrot-Assay, ungefähr verdoppelt (65 µM HepG2 vs. 115 µM HepG2 K1). Die Expression der ABC-Transporter MRP1, 2, 3 und UMAT war jedoch unverändert, ebenso das Muster der metabolisch gebildeten methylierten Arsenspezies und der intrazelluläre Glutathiongehalt (Gebel et al., 2002). Behandlung der Rattenleberepithelzellline TRL1215 für 24 Wochen mit 125, 250 oder 500 nM As(III) führt ebenfalls zu erhöhter Resistenz dieser Zellen gegenüber Arsenit. Diese ist jedoch auf die Induktion von MRP1 und 2, P-gp, sowie GSTP1-1 zurückzuführen, da die Inhibitoren MK571 für MRP-Transporter, sowie PSC833 für P-gp und Etacrynsäure für GSTP1-1, die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Arsenit wieder herstellen (Liu et al., 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit war bei sechsmal für fünf Tage mit 1 µM Arsenit behandelten NHBE-Zellen von B222 eine erhöhte Toleranz der Zellen gegenüber Arsenit erkennbar (Abb. 27, S.66).

Anorganische Arsenverbindungen werden nach der Aufnahme im Körper des Menschen und vieler anderer Säuger in Leber und weiteren Organen durch eine Abfolge von oxidativen Methylierungsreaktionen und Reduktionen zu drei- und fünfwertigen Mono- und Dimethylarsenverbindungen metabolisiert (Aposhian und Aposhian, 2006). In geringem Umfang

werden methylierte Arsenspezies auch bei der Behandlung von normalen humanen Bronchialepithelzellkulturen mit Arsenit gebildet (Styblo et al., 2000).

Früher wurde die Methylierung anorganischer Arsenspezies als Entgiftungsreaktion angesehen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass einige der methylierten dreiwertigen Arsenverbindungen eine vergleichbare oder sogar höhere Gentoxizität als Arsenit aufweisen (Schwerdtle et al., 2003; Styblo et al., 2000). Die genaue Reihenfolge der Reaktionen und die beteiligten Enzyme sind noch nicht abschließend erforscht. Das Muster der methylierten Arsenmetaboliten im Urin variiert zwischen einzelnen Individuen stark, da einige der am Metabolismus beteiligten Enzyme Polymorphismen aufweisen (Aposhian und Aposhian, 2006).

Kojima et al. kultivierten TRL1215-Rattenleberepithelzellen für 20 Wochen in Gegenwart fünfwertiger organischer Arsenverbindungen (Monomethylarsonsäure (MMAs(V)), Dimethylarsonsäure (DMAs(V)) bzw. Trimethylarsenoxid (TMAs(V)O)) (Kojima et al., 2006). Alle untersuchten organischen Arsenverbindungen führten zu einer Induktion von GST-μ, GST-π, Mrp1, 2 und 3, sowie P-gp, aber zu einer Repression von GST-α, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Die Expression weiterer Mrp-Isoformen wurde nicht untersucht. Die chronisch mit MMAs(V), DMAs(V) oder TMAs(V)O inkubierten Kulturen akkumulierten darüber hinaus bei Behandlung mit Arsenit, Arsenat oder DMAs(V) diese Verbindungen in signifikant reduziertem Umfang. Auf einen Beitrag von Transportproteinen zur erhöhten Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen die untersuchten organischen Arsenverbindungen deutet auch die Verringerung ihrer Toleranz durch Probenecid, einen relativ unspezifischen Inhibitor für Transporter organischer Anionen (Borst und Oude Elferink, 2002; Deeley et al., 2006), sowie durch Verapamil hin. Dieses hemmt zwar P-gp, inhibiert MRP-Transporter jedoch - anders als von Kojima et al. angegeben - nicht in nennenswertem Umfang (Borst und Oude Elferink, 2002; Lehmann et al., 2001; Stehfest et al., 2005). Verapamil kann die Toxizität von Arsenverbindungen jedoch steigern, weil es ohne selbst transportiert zu werden, den Transport von GSH aus den Zellen durch MRP1 und 2 auf etwa das Zehnfache erhöht (Deeley et al., 2006). Glutathion jedoch benötigen die Zellen unter anderem zur Konjugation der Arsenverbindungen und zum Schutz vor den durch diese Substanzen verursachten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Für eine Beteiligung von MRP-Transportern an der Resistenz der Kulturen spricht, dass ihre Empfindlichkeit gegenüber Arsenit, Arsenat und DMAs(V) in Gegenwart von Taurocholat oder Glycocholat steigt. Beide Cholate sind Substrate von MRP3, 4, 7 und 8 (Ballatori et al., 2005; Chen et al., 2003; Choudhuri und Klaassen, 2006; Rius et al., 2003) und können daher den Transport von Arsenverbindungen kompetitiv hemmen, sie werden von MRP1 und 2 nur in Form ihrer Konjugate mit Sulfat (Akita et al., 2001) und von MRP5 nicht transportiert (Kruh et al., 2007).

Eine herausgehobene Rolle von MRP3 beim Schutz der Zellen vor der Toxizität der untersuchten Arsenverbindungen - wie von Kojima et al. aus den Experimenten mit den Cholaten abgeleitet - ist jedoch nicht haltbar, da es sich bei diesen Substanzen nicht um spezifische Inhibitoren ausschließlich für MRP3 und P-gp handelt. Gegen eine Beteiligung von P-gp an der Resistenz gegenüber Arsenverbindungen spricht, dass Mausfibroblastenzelllinien in denen die Transporter Mdr1a und Mdr1b (Mausäquivalent des humanen Transporters MDR1 (P-gp)), keine erhöhte Empfindlichkeit

gegenüber Arsenit zeigen (Allen et al., 2000). Hinzu kommt, dass humane Zellen, in denen MDR1 in Abwesenheit MRP1 und 2 überexprimiert ist, keine erhöhte Toleranz gegen Arsenit aufweisen (Salerno et al., 2002).

Für eine Beteiligung von MRP-Transportern am Schutz von Lungenzellen vor Arsenit spricht auch die nach fünftägiger Behandlung von NHBE-Zellen mit Arsenit nachgewiesene Induktion von MRP3, 4 und 5 (Abb. 21, S.60). Ein Beitrag anderer MRP-Isoformen als MRP1 und 2 zum Schutz vor den toxischen Effekten von Arsenverbindungen wird auch als eine Möglichkeit zur Erklärung der Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus Zellkulturen und Tierexperimenten gesehen (Leslie et al., 2005). Während ein Knock-out von MRP1 bei Zellkulturen die Empfindlichkeit gegenüber Arsenit erhöht (Allen et al., 2000; Rappa et al., 1997) sind Mrp1(-/-)-Mäuse nicht empfindlicher gegenüber Arsenit als Wildtyptiere und sie zeigen auch keine Unterschiede in der Gewebeverteilung von Arsen und der Gesamtkonzentration an Arsen im Urin (Kala et al., 2004; Lorico et al., 1997; Lorico et al., 2002). Dies wird auf einen Transport von Arsenmetaboliten wie $As(GS)_3$ oder Methylarsendiglutathion in den Urin durch andere MRP-Isoformen infolge überlappender Substratspezifitäten zurückgeführt.

Arsenit beeinflusst Transkriptionsfaktoren, die mit der Regulation der Expression von MRP-Transportern in Verbindung gebracht werden: Es aktiviert AP-1 (*Activator Protein-1*) über den MAPK-Signalweg (Drobna et al., 2003; Huang et al., 2001) und Nrf2 (*Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2*), einen *Basic-Leucine Zipper* Transkriptionsfaktor, der ARE (*Antioxidant Responsive Element*) und EpRE (*Elektrophile Responsive Element*) aktiviert (Kumagai und Sumi, 2007; Wang et al., 2008). Darüber hinaus wirkt Arsenit auf den redoxempfindlichen Transkriptionsfaktor Sp1 (*Specificity Protein 1*), ein ubiquitär exprimiertes Protein mit drei Zinkfingerdomänen, dessen Aktivität sowohl durch posttranslationale Modifikationen als auch durch Interaktion mit anderen Proteinen (darunter Tumorsuppressor- und Oncogene) gesteuert wird (Lantz und Hays, 2006; Wierstra, 2008; Zhu und Center, 1996). Die Wirkung von Arsenit auf diese Transkriptionsfaktoren könnte zum einen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgen und zum anderen durch die Reaktion elektrophiler Metaboliten wie Monomethylarsinsäure mit den reaktiven Thiolgruppen von Keap1 (*Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*), welches Nrf2 im Grundzustand durch Komplexierung inaktiviert (Itoh et al., 1999). Weiterhin erhöhen Arsenit und Monomethylarsensäure die Konzentration von Nrf2 indem sie seine Ubiquitinylierung und damit seinen Abbau hemmen (Wang et al., 2008). Eine Beteiligung von Nrf2 an der Regulation konnte für MRP1 in murinen Zellen und für MRP2 sowohl in murinen als auch in humanen Zellen gezeigt werden (Hayashi et al., 2003; Vollrath et al., 2006). Die Nrf2-aktivierenden Substanzen Butylhydroxyanisol (BHA), Oltipraz und Ethoxyquin konnten in Mäusen Mrp2-6 in der Leber induzieren (Maher et al., 2005). Dass Nrf2 an der Regulation der Expression der γ-GCS sowie von Glutathion-S-Transferasen der Familien α, μ und π beteiligt ist, unterstreicht seine Wichtigkeit für die zelluläre Antwort auf Arsenverbindungen (Chanas et al., 2002; Hayashi et al., 2003; Maher et al., 2005). Sowohl γ-GCS als auch GSTA1 werden in Hepatozytenkulturen von Nrf2(-/-)-Mäusen deutlich geringer exprimiert. Die Deletion von Nrf2 erhöht

die Zytotoxizität von Arsenit signifikant, wie durch einen Vergleich von Hepatozytenkulturen von Nrf2 (-/-)-knock-out- und Wildtypmäusen gezeigt (Kumagai und Sumi, 2007).

Arsenit führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und steigert die Expression von TGF-β in der humanen Leukämiezelllinie HL-60 (Chen et al., 2003). Eine Induktion von TGF-β durch einsetzende Seneszenz nach einer Versuchsdauer von 18 Tagen zum einen und Behandlung mit Arsenit zum anderen, könnte die Aktivierung von Nrf2 und weiterer redoxempfindlicher Transkriptionsfaktoren durch Arsenit überwiegen, die ansonsten zu einer gesteigerten Expression von MRPs führen würde. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die verringerte mRNA-Menge von MRP1, 3, 4 und 5 in den Kulturen von B201 nach der zweiten fünftägigen Behandlung mit Arsenit (Abb. 22, S.61).

Wie bereits oben ausgeführt, wurde eine Repression von MRP-Transportern durch Arsenit bis dato noch nicht beschrieben. In der Literatur gibt es eine positive Korrelation zwischen dem Alter der Gewebespender und der Synthese von TGF-β in Primärkulturen von humanen peritonealen Mesothelzellen, welche die Autoren auf eine altersbedingte Anhäufung seneszenter Zellen im Peritoneum älterer Donoren zurückführen (Ksiazek et al., 2007). Ein vergleichbarer Mechanismus könnte erklären, warum die Kulturen von B182 nach der zweiten Behandlung mit Arsenit keine Repression der MRP-Transporter in vergleichbarem Umfang wie bei B201 aufweisen. Das Gewebe für diese Kulturen stammte von einer zwanzig Jahre jüngeren Patientin (57 Jahre vs. 77 Jahre) (Tab. 9 (Anh.), S.155) und die Kulturen bildeten daher möglicherweise geringere Mengen an TGF-β.

Aber auch in diesen Kulturen könnte es bis zum 18. Tag des Langzeitexperiments mit Arsenit zu einer Induktion von TGF-β gekommen sein, was den deutlichen Rückgang der mRNA-Mengen von MRP1 und besonders von MRP3 sowohl in den Kontrollen als auch in den behandelten Kulturen erklären würde, der beim Vergleich der MRP-Expressionen nach der ersten und der zweiten Behandlung mit Arsenit in den Kulturen von B182 erkennbar ist (Abb. 23, S.62). Ob TGF-β tatsächlich einen derartig umfangreichen Einfluss vor allem auch auf die Expression anderer Isoformen als MRP1 hat, wurde bisher jedoch experimentell noch nicht untersucht. Generell gibt es bis jetzt noch keine gesicherten Befunde über die Transkriptionsfaktoren, die an der Steuerung der Expression von MRP4 und 5 beim Menschen beteiligt sind (Toyoda et al., 2008). Daher lässt sich auch keine mechanistische Begründung für die gleichbleibende Expression von MRP4 und 5 in den Kontrollen von B182 angeben, auch nicht für das Fehlen der Induktion von MRP4 und 5 durch die erste Arsenitbehandlung nach der zweiten fünftägigen Inkubation. Das Substratspektrum von MRP4 und 5 jedoch umfasst auch Substanzen, die von MRP1 bis 3 nicht transportiert werden, wie Nucleosid- und Nucleotid-Analoga, sowie zyklische Nucleotide. Daher liegt eine Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren an ihrer Regulation nahe. Ob die Kulturen tatsächlich in die Seneszenz eingetreten sind, hätte mittels einer auf der Seneszenz-assoziierten β-Galactosidaseaktivität basierenden Färbung nach Dimri et al. untersucht werden können (Dimri et al., 1995).

Bemerkenswerterweise waren nach der dritten fünftägigen Inkubation mit Arsenit in den Kulturen von B201 keine signifikanten Effekte mehr auf die mRNA-Mengen von MRP1, 4 und 5 nachweisbar, MRP3 war jedoch noch immer reprimiert (Abb. 24, S.63). Eine Reduktion der Menge an MRP2 und 3

in der Leber wurde bei Mäusen nach Verabreichung des Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), sowie im Rahmen der endotoxinvermittelten Cholestase durch Lipopolysaccharide (LPS) beschrieben (Hartmann et al., 2002).

Die vierte fünftägige Behandlung der Kulturen von B201 mit Arsenit hatte weiterhin keine signifikante Wirkung auf die Expression von MRP1, 4 und 5. Sie induzierte jedoch MRP3 signifikant (Abb. 25, S.64). Wie bereits erwähnt, führte eine Inkubation von TRL1215 Zellen mit organischen Arsenverbindungen in millimolaren Konzentrationen für 20 Wochen ebenfalls zu einer Induktion von MRP3, neben MRP1 und 2 (Kojima et al., 2006). In derselben Zelllinie ließen sich auch durch 24-wöchige Behandlung mit Arsenit (bis 500 nM) MRP1 und 2 induzieren, MRP3 wurde in diesem Experiment nicht untersucht (Liu et al., 2001). In HepG2-Zellen jedoch war nach 12 Wochen in Gegenwart steigender Konzentrationen von Arsenit (bis 50 µM) die Expression von MRP1, 2 und 3 unverändert (Gebel et al., 2002). Auf einen Beitrag von MRP3 zur Detoxifizierung von Metallen deuten auch die Steigerung der Expression von MRP2, 3 und 5 durch Cisplatin in HepG2-Zellen (Schrenk et al., 2001) und möglicherweise auch die erhöhte Menge an MRP3 in Primärkulturen von humanen Lungenzellen, die nach kombinierter Chemotherapie mit Cisplatin, Ifosfamid und Vindesin gewonnen wurden (Kawai et al., 2002). MRP3 lässt sich in der Leber von Mäusen unter anderem durch Behandlung mit TCDD, Phenobarbital, Spironolacton, sowie durch Diethylhexylphthalat induzieren (Maher et al., 2005).

Zur weiteren Aufklärung der Wirkung von Arsenit auf die Expression von MRP-Transportern in Primärkulturen von NHBE-Zellen wäre die Wiederholung der Langzeitexperimente mit dem Material weiterer Patienten interessant. Durch Gruppierung des Materials nach dem Alter der Spender könnten dabei auch mögliche Unterschiede im Zeitpunkt des Auftritts der Seneszenz und deren Auswirkungen auf die Effekte der Arsenitbehandlung erfasst werden. Darüber hinaus könnten in diesen Experimenten weitere Resistenzmechanismen, wie eine Induktion der Glutathionbiosynthese und von Glutathion-S-Transferasen, oder eine Verminderung der Apoptoserate untersucht werden.

Nach Abschluss der sechsten fünftägigen Inkubation mit Arsenit, war in den Kulturen von B182 kein Einfluss auf die Proliferation der Zellen erkennbar, Kerne und Membranen der Zellen waren intakt und sie wiesen die epitheltypische polygonale Form auf. Dennoch waren in den mit 1 µM und 2,5 µM behandelten Zellen morphologische Auffälligkeiten erkennbar: Die Zellgrenzen waren schwächer erkennbar und man sah zytoplasmatische Vesikel (Abb. 26, S.65). Sowohl in den mit 5 µM Cu(II), als auch in den mit 5 µM Hg(II) belasteten NHBE-Zellen aus den Langzeitexperimenten waren nach Abschluss der sechsten Metallbehandlung solche zytoplasmatischen Vesikel erkennbar (Abb. 36, S.75; Abb. 47, S.88). Vergleichbare zytoplasmatische Vesikel treten nach Belastung mit Hg(II) auch in MDCK-Zellen auf, die ebenfalls epithelialer Natur sind (Aleo et al., 2002 und 2005). Darüber hinaus wurde bereits in Zellen von Mensch und Ratte Hg in Vesikeln nachgewiesen (vgl. 4.5) (Danscher und Møller-Madsen, 1985; Shirabe, 1979). In Hepatozytenkulturen konnte der Transport fluoreszierender MRP-Substrate in solche Vesikel gezeigt werden, was auf eine mögliche Funktion dieser Strukturen als Depots oder sekretorische Vesikel hindeuten könnte (Nies et al., 1998; Roelofsen et al., 1997). Weder in den Langzeitstudien mit Arsenit an HepG2, oder an TRL1215-Zellen, noch bei chronischer

Exposition von TRL1215 gegenüber organischen Arsenverbindungen, wurden morphologische Auffälligkeiten beschrieben (Gebel et al., 2002; Kojima et al., 2006; Liu et al., 2001).

Bei einer Wiederholung der Langzeitexperimente mit Arsenit an NHBE-Zellen sollten die zytoplasmatischen Vesikel näher untersucht werden. Zum einen könnte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie sowohl die Expression von MRP-Transportern in den Membranen der Vesikel als auch der Transport fluoreszierender MRP-Substrate in die Vesikel untersucht werden. Zum anderen könnte das Vorhandensein von Arsen in den Vesikeln beispielsweise mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (*energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDX) untersucht werden.

Zur weiteren Untersuchung eines möglichen Anteils von MRP-Transportern am Schutz von humanen Lungenzellen vor Arsenit, wurde seine Wirkung auf die Aktivität dieser Proteine in H322-Zellen bestimmt. Die Aktivität wurde über fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des Farbstoffs 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein (CDF) in den Zellen gemessen. CDF ist ein Substrat für MRP1 bis 5 (Courtois et al., 1999; Pratt et al., 2006; Rychlik et al., 2000; Zamek-Gliszczynski et al., 2003). Kultur von H322-Zellen in Gegenwart von Arsenit (2,5 und 5µM) für einen, drei und fünf Tage, führte unabhängig von Arsenitkonzentration und Behandlungsdauer zu einer signifikanten Steigerung des Efflux von CDF um 20 % (Abb. 15, S.53; Tab. 12 (Anh.), S.157). Dies könnte auf die Induktion eines oder mehrerer MRPs zurückzuführen sein. Zumindest die erhöhte Transportaktivität nach 24 h steht im Widerspruch zur signifikanten Repression der mRNA von MRP1, 2 und 4 durch 5 µM Arsenit in dieser Zelllinie (Abb. 14, S.51). Möglicherweise hat die Verminderung der mRNA-Menge jedoch keine Reduzierung des Proteingehalts zur Folge. Im Gegensatz dazu war die Transportaktivität bereits bei 2,5 µM Arsenit signifikant erhöht, ohne dass ein signifikanter Effekt auf die mRNA-Menge zu beobachten war. In Primärkulturen von Maushepatozyten erhöhte 24-stündige Behandlung mit Arsenit (5 µM) die Menge an MRP1-Protein (Kumagai und Sumi, 2007). In der humanen Leukämiezelllinie HL-60/R-CP ist die Aktivität von MRP1 nach 48-stündiger Behandlung mit Arsenit (20µM) auf das 5,4-fache erhöht, hier wurde auch mittels Northern-Blot eine Steigerung der MRP1-mRNA nachgewiesen (Ishikawa et al, 1996).

Der verstärkte Efflux von CDF nach fünftägiger Behandlung der H322 Zellen mit Arsenit schließlich ist in Übereinstimmung mit der Induktion von MRP3, 4 und 5 in Primärkulturen von NHBE-Zellen nach Inkubation mit Arsenit ebenfalls für fünf Tage (Abb. 21, S.60). Die unabhängig von Arsenitkonzentration und Inkubationszeit auftretende signifikante Reduktion der Transportaktivität durch gleichzeitige Behandlung mit MK571 zeigt, dass der Efflux von CDF durch MRP-Transporter vermittelt wird. Da zumindest für MRP1 und 2 ein Transport sowohl des $As(GS)_3$-Komplexes (Leslie et al., 2004) als auch von CDF beschrieben wurde, wäre auch eine Verminderung des Efflux von CDF durch kompetitive Inhibition durch den Arsenit-Komplex denkbar gewesen. Diese tritt möglicherweise nicht auf, da die Gesamttransportaktivität aller exprimierten MRP-Isoformen aufgrund überlappender Substratspezifitäten für beide Substanzen ausreicht.

**Gentoxizität von Arsenit**

Auf zellulärer Ebene verursachen anorganische Arsenverbindungen oxidativen Stress, induzieren Chromosomenschäden und inhibieren DNA-Reparaturmechanismen. Darüber hinaus führen sie zu veränderten Methylierungsmustern an der DNA, erhöhter Zellproliferation und Suppression von p53 (Schoen et al., 2004). Dennoch ist der genaue Mechanismus der Kanzerogenität des Arsen nach wie vor ungeklärt (Beyersmann und Hartwig, 2008; Schoen et al., 2004). In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu einer möglichen gentoxischen Wirkung von Arsenit an der humanen Lungentumorzelllinie H322 mit dem Comet-Assay durchgeführt (3.2.1). Nach Inkubation mit 2,5 und 5 µM für 24h war keine signifikante Schädigung der DNA erkennbar (Abb. 16, S.54).
In der humanen Lungenfibroblastenzelllinie MRC-5 ist nach Inkubation mit Arsenit in gleicher Menge für zwei Stunden im Comet-Assay jedoch eine signifikante Gentoxizität erkennbar (Mouron et al., 2006). Auch in Primärkulturen von humanen Fibroblasten kommt es nach sechsstündiger Belastung mit 5 µM Arsenit zu einer signifikanten Schädigung der DNA (Yih und Lee, 2000). Möglicherweise waren entstandene DNA-Schäden nach 24-stündiger Inkubation bereits wieder repariert. Für eine effektive Reparatur jedoch ist eine Eliminierung des gentoxischen Agens Arsenit notwendig. Diese könnte durch MRP-Transporter erfolgen. Daher könnten Empfindlichkeitsunterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen auch durch Unterschiede in der Expression von MRP-Transportern oder dem intrazellulären Glutathiongehalt, oder der Ausstattung mit antioxidativ wirksamen Enzymen liegen. MRP-Transporter könnten sich in diesem Zusammenhang auch deshalb für die Zellen als besonders hilfreich erweisen, als Konzentrationen über 2,5 µM die Nucleotid-Excisionsreparatur (NER) inhibieren (Hartwig et al., 1997). Bei 10 µM Arsenit kommt es darüber hinaus zu einer Hemmung der Aktivität von Enzymen der Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) - Familie, die ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Walter et al., 2007).
Eine Mitwirkung von MRP-Transportern am Schutz der untersuchten H322-Kulturen ist, wie bereits im MTT-Assay (vgl. 3.2.1), auch aus den Ergebnissen des Comet-Assay an H322 mit Arsenit und MK571 erkennbar. In Gegenwart des Inhibitors von MRP1 bis 5 war nach 24h, sowohl bei Auswertung der Schweiflänge als auch des Schweifmoments, eine signifikante Schädigung der DNA nachweisbar (Abb. 16, S.54). Studien an verschiedenen Zelltypen zeigen teils erhebliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Arsenit: Während 10 µM Arsenit nach einer Stunde in Primärkulturen von humanen Hepatozyten nicht zu DNA-Schäden führten (Dopp et al., 2008), zeigte nach derselben Zeit bereits 0,2 µM Arsenit in den humanen Urothelkarzinomzelllinien BFTC905 und NTUB1 gentoxische Effekte (Wang et al. 2007). Nach einer Behandlungsdauer von 2,5 Stunden waren in Experimenten an humanen Lymphozyten sogar schon bei 0,01 µM Arsenit signifikante Schäden an der DNA mittels Comet-Assay nachweisbar (Schaumlöffel und Gebel, 1998).
Fünf Tage in Gegenwart von Arsenit (2,5 µM und 5 µM) führen auch bei den in dieser Arbeit untersuchten H322-Zellen zu DNA-Schäden (Abb. 17, S.55). Die DNA-schädigende Wirkung des Arsenits wird durch gleichzeitige Behandlung mit MK571 abermals verstärkt. Die Ergebnisse aus den Experimenten mit 5 µM Arsenit sind jedoch möglicherweise nicht nur auf die Gentoxizität des Arsenit zurückzuführen, sondern auch auf eine Induktion der Apoptose durch Arsenit (Florea et al., 2005), in

deren Verlauf es ebenfalls zu einer Fragmentierung der DNA kommt. Daher sollten die in Gentoxizitätstests eingesetzten Konzentrationen nach Gebel nicht zu einer Reduktion der zellulären Vitalität um mehr als 50 % führen (Gebel, 2001).

## 4.3 Bewertung von Kupfer

In Studien wurde eine erhöhte inhalative Belastung mit Cu mit dem verstärkten Auftreten von Atemwegserkrankungen in Verbindung gebracht (Kennedy et al., 1998; Pagan et al., 2003). Nach Inkubation von NHBE-Zellen mit wässrigen Extrakten der ultra-feinen Partikelfraktionen aus der Luft sechs verschiedener amerikanischer Städte, konnte eine Korrelation zwischen dem Kupfergehalt der ultra-feinen Partikel und der Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) in den Kulturen gezeigt werden (Duvall et al., 2008). Eine mögliche adaptive Antwort der Lunge auf eine erhöhte Belastung mit Cu könnte in der gesteigerten Expression von Transportern zur Elimination von Cu liegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Mitwirkung von MRP-Transportern am Schutz von Lungenzellen vor Cu(II) untersucht.

### Cu(II) Toxizität

Behandlung der humanen Lungentumorzelllinie H322 mit 50 µM Cu(II) für einen Tag reduzierte die Vitalität der Kulturen signifikant um 21 %. Vorbehandlung der Zellen mit MK571 hat keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Cu(II); diese Kulturen wiesen nach Inkubation mit 50 µM Cu(II) eine um 24 % verminderte Vitalität auf (Abb. 28, S.67). Primärkulturen von NHBE-Zellen sind gegenüber Cu(II) sensibler als H322 Zellen, bei 24-stündiger Behandlung führen hier bereits 25 µM Cu(II) zu einer Reduktion der Vitalität um 15 %, bei 50 µM Cu(II) ist sie bereits um 34 % reduziert (Abb. 32, S.71). Auch in NHBE-Zellen hat MK571 keine Auswirkungen auf die Toleranz der Kulturen gegenüber Cu(II): Bei 25 µM und 50 µM Cu(II) waren die Vitalitäten der vorbehandelten Kulturen entsprechend um 18 % und 36 % reduziert. Sowohl in den Experimenten an H322 als auch an NHBE-Zellen war demnach kein Beitrag der Transporter MRP1 bis 5 zum Schutz der Zellen erkennbar. Dies deckt sich mit den Befunden von Vernhet und Mitarbeitern an der humanen kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie GLC4/Sb30 (Vernhet et al., 2000). Achtmonatige Kultur in Gegenwart von Sb(III) steigerte die MRP1-Expression dieser Zellen deutlich, sowie deren Resistenz gegenüber Antimon, Arsenit, Arsenat und Hg(II). Die Toxizität von Cu(II) in diesen Kulturen war jedoch nicht signifikant verändert, die $IC_{50}$ betrug bei viertägiger Behandlung 286 ± 32,8 µM, die in der Ursprungszelllinie GLC4 175 ± 51,0 µM. Auch in dieser Studie hatte eine Behandlung mit MK571 keine Auswirkungen auf die Widerstandfähigkeit der Zellen gegenüber Cu(II). Die humane Zelllinie A549 ist epithelähnlich und stammt von einem Alveolarkarzinom, sie ist mit einer $IC_{50}$ von 400 µM Cu(II) bei 24-stündiger Behandlung (Riley et al., 2005) toleranter gegenüber Cu(II) als H322 ($IC_{50}$: 200 µM, vgl. Abb. 28, S.67), aber weniger tolerant als NHBE-Zellen ($IC_{50}$: >400 µM, vgl. Abb. 32). Kulturen der fötalen humanen Lungenfibroblastenlinie HFL1 schließlich haben im 24h-Experiment eine $IC_{50}$ von 614 µM Cu(II) (Yang et al., 2002). In der humanen Hepatomzelllinie HepG2 liegt die

$IC_{50}$ bei 340 µM Cu(II) (Sheline und Choi, 2004), die Hamsterovarienzelllinie CHO-K1 ist mit einer $IC_{50}$ von 78 µM deutlich empfindlicher (Garcia-Fernandez et al., 2002). Wird die Einwirkzeit auf drei Tage verlängert, reagieren H322 Zellen deutlich empfindlicher, als bei 24-stündiger Behandlung. Jetzt führen bereits 5 µM Cu(II) zu einer Reduktion der Vitalität auf 80 %, der Verlauf der Toxizitätskurve ist jedoch noch immer relativ flach, so dass die metabolische Aktivität der Zellen bei 25 µM Cu(II) noch immer 67 % beträgt (vgl. Abb. 29, S.68). Auch humane Brustepithelzellen reagieren bei längerem Kontakt mit Cu(II) empfindlicher, jedoch ist der Effekt nicht so deutlich: In der Zelllinie MDA-MB231 vermindern 99 µM Cu(II) die Vitalität nach eintägiger Inkubation auf 78 %, nach dreitägiger Behandlung mit dieser Konzentration beträgt sie 66 % (Schmidt et al., 2004). HFL1-Zellen erweisen sich als noch resistenter gegen Cu(II), nach 72-stündiger Inkubation beträgt die $IC_{50}$ noch 583 µM (Yang et al., 2002).

### MRP-Transporter unter Cu(II)

Unterschiedliche Toleranzen verschiedener Zellen gegenüber Cu(II) können zum einen in der Ausstattung mit kupferbindenden Molekülen wie Metallothioneinen oder Glutathion begründet liegen, die darüber hinaus auch reaktive Sauerstoffspezies abfangen (Freedman et al., 1989; Hultberg et al., 1999; Jiang et al, 2002; Urani et al., 2003). Zum anderen können sie auch auf eine unterschiedliche Expression an der Kuferhomöostase beteiligter Transportproteine, den P-Typ ATPasen ATP7A und ATP7B, zurückzuführen sein (Camakaris et al., 1995; Lockhart und Mercer, 2001). Studien an GY-Ratten, die kein funktionsfähiges MRP2 besitzen, weisen auch auf einen Beitrag dieses Transporters zur Elimination von Cu(II) hin (Dijkstra et al., 1996; Houwen et al., 1990). Die schnelle Phase in der Eliminationskinetik von Kupfer wird durch den Transport von Cu(II)-Komplexen mit jeweils zwei Molekülen Glutathion durch MRP2 getragen, wohingegen die langsame Phase auf den Transport von Cu(I) durch eine P-Typ ATPase zurückzuführen ist (Dijkstra et al., 1996; Houwen et al., 1990). Diese P-Typ ATPase ist der Transporter ATP7B welcher den physiologisch wichtigsten Eliminationsweg für Kupfer über die Leber in die Galle darstellt (La Fontaine und Mercer, 2007; Wijmenga und Klomp, 2004).

MRP1 trägt vermutlich kaum zur Detoxifizierung von Cu(II) in Lungenzellkulturen bei (Vernhet et al., 2000). Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen aus den Vitalitätstests an mit MK571 vorbehandelten Lungenzellkulturen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Dennoch könnte Cu(II) durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Induktion von MRP-Transportern führen (vgl. 4.2). Vierundzwanzigstündige Inkubation mit 15 und 25 µM Cu(II) beeinflusste jedoch weder in H322 noch in NHBE-Zellen die Expression der untersuchten MRP-Transporter, in H322 war auch die mRNA-Menge des ABC-Halbtransporters UMAT unverändert (vgl. Abb. 30, S.69 und Abb. 33, S.72). Behandlung der Doxorubicin-resistenten, Ehrlichs Aszites Karzinomzelllinie EAC/Dox, welche MRP1 überexprimiert, mit 9,9 nM Cu(II)-N-(2-Hydroxy-acetophenon)-glycinat (CuNG), einem Cu(II)-Chelatkomplex, für 24 h, reduziert die Proteinmenge von MRP1 in diesen Kulturen auf 30 % und macht die Zellen wieder empfindlich gegenüber

Doxorubicin (Majumder et al., 2006). Es ist jedoch davon auszugehen, dass Cu(II) in Form dieses Komplexes deutlich besser in die Zellen gelangt. Ein solcher Effekt tritt auch auf bei gleichzeitiger Applikation von Cu(II) und Bis(diethylthiocarbamoyl)-disulfid (Disulfiram), welches ebenfalls Komplexe mit Cu(II) bildet. Werden Primärkulturen von Gliazellen simultan mit 300 nM Disulfiram und Cu(II) inkubiert, sinkt die $IC_{50}$ bei 24-stündiger Inkubation von 135 µM auf 5 µM (Sheline und Choi, 2004).

Die verlängerte Einwirkung von Cu(II) für sieben Tage auf H322 Zellen änderte die Expression von MRP1 bis 5, sowie die von UMAT nicht (vgl. Abb. 31, S.70). UMAT wird mit dem Transport von Metallkomplexen in Verbindung gebracht, da die Sequenz dieses Transporters 44 % Übereinstimmung mit der Sequenz des *Fisson Yeast Heavy Metal Tolerance Protein* (hmt1) aufweist (Hirsch-Ernst et al., 1998), einem Transporter, der zur erhöhten Schwermetalltoleranz der Hefe Schizosaccharomyces pombe beiträgt (Ortiz et al., 1992). Interessanterweise war die Cu(II)-Toleranz von LoVo Zellen, einer humanen Kolonkarzinomzelllinie die UMAT nicht exprimiert, nach Transformation mit dem homologen Transporter der Ratte rAbcb6, signifikant erhöht (Jalil et al., 2008). Die Widerstandfähigkeit der transformierten Zellen gegenüber Co(II) oder Zn(II) war jedoch unverändert. Die Autoren postulieren anhand dieser Ergebnisse eine spezifische Beteiligung von ABCB6 an der intrazellulären Kupferverteilung durch den Transport von Kupfer-Komplexen mit Peptiden oder Aminosäuren in Endosomen oder Lysosomen. Dadurch könnte UMAT auch an der Ausscheidung von Kupfer über die Leber in die Galle mittels sekretorischer Lysosomen beteiligt sein, was einen Hauptweg der Entgiftung von Kupfer darzustellen scheint (Gross et al., 1989; Jalil et al., 2008).

In den Primärkulturen von NHBE-Zellen aus dem Langzeitversuch mit Cu(II) war UMAT zu keinem Zeitpunkt nachweisbar (vgl. 3.3.2). Die erste fünftägige Behandlung mit Cu(II) (2,5 und 5 µM) führte in den Kulturen von B182, B201 und B222 nicht zu signifikanten Veränderungen in der Expression von MRP1, 3, 4 und 5 (vgl. Abb. 35, S.74). Der Nachweis einer Induktion von MRP1 und 4 in den Proben von B182 wird jedoch durch die Streuung der Ergebnisse erschwert. Auch die Kontrollen der verschiedenen Patienten wiesen untereinander keine signifikanten Expressionsunterschiede auf. Nach der zweiten fünftägigen Behandlung mit Cu(II) und 18 Tagen in Kultur, sind Unterschiede zwischen den Kulturen von verschiedenen Patienten erkennbar (vgl. Abb. 35, S.74). In den Kontrollen von B201 kommt es nach 18 Tagen in Kultur zu einer nichtsignifikanten Induktion von MRP1, womit die Expression etwa das Dreifache der Kontrollen von B182 zu diesem Zeitpunkt beträgt. Die Behandlung mit Cu(II) führt jedoch in den Kulturen von B201 möglicherweise zu einer Repression von MRP1. Demgegenüber unterscheiden sich die Expressionen in den Kontrollen von B182 nach neun und achtzehn Tagen kaum, und die zweite Behandlung mit Cu(II) hat keine Auswirkungen auf MRP1 in diesen Kulturen. Lehmann und Coautoren finden teilweise deutliche inter-individuelle Unterschiede in der Menge an MRP1-mRNA in Primärkulturen von NHBE-Zellen verschiedener Patienten - bis zum 7,7-fachen in der ersten Generation (Lehmann et al., 2005). Werden NHBE-Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert, so ist nach 18 Wochen in den Kulturen einiger Patienten eine deutliche Induktion von MRP1 auf das 4- bis 11-fache erkennbar (Lehmann et al., 2001).

Vergleicht man die Expression von MRP3 in den Kontrollen der ersten und zweiten Behandlung mit Cu(II), so ist weder bei B182 noch bei B201 eine signifikante Veränderung erkennbar. Der Unterschied zwischen den mRNA-Mengen von MRP3 in den Kontrollen der beiden Patienten ist nach 18 Tagen in Kultur größer als nach neun Tagen, die Expression von MRP3 ist in B201 deutlich, jedoch nicht signifikant höher als in B182. Die zweite Inkubation mit Cu(II) hat in B182 auch keinen Effekt auf die Menge von MRP3, eine mögliche Repression dieses Transporters in den mit 5 µM Cu(II) behandelten Kulturen von B201 kann aufgrund der Streuung nicht bewertet werden.

In B182 führt die zweite fünftägige Behandlung mit Cu(II) zu einer signifikanten Steigerung der Menge von MRP4 auf das Doppelte, womit die Expression wieder das Niveau der Kontrollen von B182 nach neun Tagen erreicht. In B201 ist keine Wirkung auf die mRNA-Menge von MRP4 erkennbar. Bisher gibt es keine Befunde über einen Transport von Metallen durch MRP4, eine mögliche Beteiligung von MRP4 an der renalen Elimination von Arsenmetaboliten wurde jedoch aufgrund der Glutathionabhängigkeit des Transports einiger Substrate von MRP4 sowie der Lokalisation dieses Protein in den proximalen Tubuli der Niere postuliert (Leslie et al, 2005). Für die Komplexierung von Cu(II) durch Glutathion wird postuliert, dass es anfangs zur Bildung eines Komplexes aus einem Cu(II)-Ion und zwei Molekülen Glutathion kommt, im weiteren Verlauf entsteht ein Cu(I)-GSH-Komplex (Kachur et al, 1998). Die Expression von MRP4 in den Kontrollen von B182 nach der zweiten Behandlung mit Cu(II) ist im Vergleich zu den Kontrollen der ersten Inkubation zwar reduziert, jedoch nicht signifikant. Ebenso ist ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter, Unterschied zur Kontrolle von B201 der zweiten Behandlung mit Cu(II) erkennbar, die Beurteilung wird jedoch durch die Streuung erschwert.

Nachdem im Verlauf des Langzeitexperiments an NHBE-Zellen inter-individuelle Unterschiede in der Wirkung von Cu(II) auf das MRP-Expressionsspektrum auftraten, wäre die Durchführung weiterer Langzeitexperimente, auch mit längerer Expositionszeit, zur weiteren Aufklärung des Beitrags von MRP-Transportern interessant. In diesen Experimenten sollten jedoch auch andere Resistenzmechanismen wie eine gesteigerte Biosynthese von Glutathion und Metallothioneinen sowie die Expression der Cu-Transporter ATP7A und ATP7B untersucht werden.

Am Ende des Langzeitexperiments mit Cu(II) an B182 nach der sechsten Behandlung mit Cu(II) für fünf Tage, waren unter dem Phasenkontrastmikroskop in den unbehandelten Kulturen keine morphologischen Auffälligkeiten erkennbar. Sowohl die mit 2,5 µM als auch die mit 5µM Cu(II) inkubierten Zellen zeigten jedoch statt der epitheltypischen polygonalen Form abgerundete Zellen mit durch *blebbing* abgeschnürten Vesikeln als Anzeichen von Apoptose (Kerr et al., 1972) (vgl. Abb. 36, S.75). Bisher wurde eine Induktion der Apoptose vor allem bei höheren Konzentrationen von Cu(II) oder Applikation von Cu(II)-Komplexen mit organischen Liganden beschrieben. In der Magenkarzinomzelllinie SCM-1 kommt es nach 48-stündiger Einwirkung von 300 µM Cu(II) zur Induktion von Apoptose (Hsu et al., 2008). Behandlung von corticalen Astrozyten der Ratte mit 10 µM Cu(II) für 24h, führt nur in Anwesenheit des Komplexbildners Pyrrolidindithiocarbamat (1 µM) zur Apoptose (Chen et al., 2000). Eine Konzentration von 250 µM des Cu(II)-Komplexes mit Nitrilotriacetat löst nach 24 h Apoptose in HL-60 Zellen aus (Ma et al., 1998; Kawai et al., 2002).

Kupferionen binden an das anti-apoptotisch wirksame Protein *X-Linked Inhibitor of Apoptosis* (XIAP). Die in den mit 5 µM Cu(II) belasteten Kulturen sichtbaren zytoplasmatischen Vesikel sind auch in MDCK-Zellen nach Einwirkung von Hg(II) beschrieben worden (Aleo et al., 2002 und 2005) und sind auch in den Kulturen aus den Langzeitexperimenten mit Arsenit und Hg(II) erkennbar (vgl. Abb. 26, S.65 und Abb. 47, S.88). Diese Vesikel könnten der intrazellulären Speicherung von Metallkomplexen dienen, oder als sekretorische Vesikel fungieren (vgl. 4.2 und 4.4).
Im Rahmen einer Wiederholung der Langzeitexperimente mit Cu(II) an NHBE-Zellen sollten die zytoplasmatischen Vesikel näher untersucht werden. Wie bereits unter 4.2 beschrieben, könnten mittels konfokaler Laserscanmikroskopie der Transport fluoreszierender MRP-Substrate in die Vesikel und die Expression von MRP-Transportern, sowie im Falle von Cu auch ATP7A und ATP7B, in den Membranen der Vesikel untersucht werden. Zusätzlich könnte der Cu-Gehalt in den Vesikeln mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie bestimmt werden. Darüber hinaus sollte eine Induktion der Apoptose etwa durch Bestimmung der Aktivität der Kaspasen 3 und 7 bestätigt werden.

## 4.4 Bewertung von Quecksilber

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Hg(II) auf humane Lungenzellkulturen untersucht. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob MRP-Transporter am Schutz von Lungenzellen vor Hg(II) beteiligt sind. Neben der Aufnahme von organischen Quecksilberverbindungen aus belastetem Fisch, ist die Freisetzung von Quecksilber aus quecksilberhaltigen Zahnfüllungen eine der Hauptexpositionsquellen für den Menschen. Neben der Abgabe in Partikelform setzen Amalgamfüllungen Quecksilberdampf frei, welcher eingeatmet wird. Die dadurch verursachte inhalative Belastung mit Hg ist deutlich höher als die mit der Umgebungsluft inhalierte Menge (WHO, 2003). Inhalierter Quecksilberdampf wird zu über 80% resorbiert und in den Erythrozyten, sowie in der Lunge und den meisten Geweben des Körpers zu Hg(II) oxidiert (Guzzi und La Porta, 08; Hursh et al., 1980; Clarkson, 1989). Nach Aufnahme von elementarem Quecksilber stellt Hg(II) die eigentliche toxische Wirkform dar (Torky und Foth, 2007).

### Hg(II) Toxizität

Das zentrale Nervensystem weist bei Inhalation von elementarem Quecksilber sowohl bei akuter als auch chronischer Exposition die höchste Empfindlichkeit auf. Bei akuten Vergiftungen treten zusätzlich Schäden an Lunge und Nieren auf (Kosnett, 2006c). Dies wird auch durch die Empfindlichkeiten der Zellkulturen aus diesen Organen abgebildet. Wird die humane Neuroblastomzelllinie SHSY5Y für 24h mit Hg(II) inkubiert, liegt die $IC_{50}$ im MTT-Assay bei 180 nM (Olivieri et al., 2000). Kulturen von Zellen aus den distalen Tubuli der Hundeniere (MDCK Zellen) weisen bei 24-stündiger Behandlung mit Hg(II) eine $IC_{50}$ von 34 µM auf (Aleo et al., 2002). Die humane Lungentumorzelllinie A549 ist mit einer $IC_{50}$ von 41 µM Hg(II) (Kehe et al., 2001) empfindlicher gegenüber Hg(II) als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten H322 Zellen, welche eine $IC_{50}$ von 80 µM Hg(II) aufweisen (vgl. Abb. 37, S.76). Primäre Lungenzellkulturen werden

bereits durch geringere Konzentrationen an Hg(II) geschädigt, wie aus der $IC_{50}$ von ungefähr 30 µM bei 24-stündiger Behandlung von NHBE-Zellen ersichtlich (vgl. Abb. 41, S.80). Dies wird durch Befunde an Primärkulturen von Alveolarepithelzellen der Ratte (L2 Zellen) bestätigt, diese weisen eine $IC_{50}$ von 25 µM auf. Kehe und Mitarbeiter führen die höhere Resistenz der A549 Zellen im Vergleich zu den L2 Zellen auf den zehnfach höheren intrazellulären Glutathiongehalt und die fünffach höhere Glutathion-Reduktaseaktivität in den A549 Zellen zurück (Kehe et al., 2001). Der Glutathiongehalt von H322 Zellen ist mit dem von A549 Zellen vergleichbar (Stehfest et al., 2005). Die verglichen mit den NHBE-Zellen höhere Toleranz der H322 Kulturen könnte daher auch durch einen höheren Glutathiongehalt bedingt sein. Glutathion reduziert die intrazelluläre Menge an freiem Hg(II) durch Bildung eines Komplexes an dem unter physiologischen Bedingungen zwei Moleküle GSH pro Hg(II)-Ion beteiligt sein sollen. Die Struktur dieses Komplexes ist jedoch noch Gegenstand der Forschung (Mah und Jalilehvand, 2008). Darüber hinaus wurde bereits 1998 postuliert, dass Hg(II)-Komplexe mit GSH ein Substrat für MRP-Transporter darstellen (Sugawara et al., 1998), daher könnten diese Transporter zur Resistenz von Zellen gegen Hg(II) beitragen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zur Untersuchung des Beitrags von MRP-Transportern zur Elimination von Hg(II) zeigten uneinheitliche Resultate: Während MK571 keinen Einfluss auf die Toleranz von H322 Kulturen gegenüber Hg(II) hat (vgl. Abb. 37, S.76), erhöht es die Empfindlichkeit von NHBE-Zellen signifikant (vgl. Abb. 41, S.80). Dies legt den Schluss nahe, dass MRP1 bis 5 nicht zu der im Vergleich zu den NHBE-Zellen erhöhten Toleranz der H322 beitragen. Genaugenommen scheinen durch MK571 inhibierbare MRP-Transporter, zumindest im untersuchten Dosisbereich, keinen Beitrag zur Detoxifizierung von Hg(II) in H322 zu leisten. Wohingegen einer oder mehrere dieser Transporter durchaus am Schutz von NHBE-Zellen vor Hg(II) beteiligt zu sein scheinen. In einer Studie mit Hg(II) an MDCK Zellen konnte unter anderem gezeigt werden, dass MK571 nicht nur die Empfindlichkeit der Kulturen gegenüber diesem Schwermetall bei Konzentrationen über 30 µM Hg(II) signifikant erhöht, darüber hinaus wurde auch eine verstärkte Akkumulation von Hg(II) in den Zellen nachgewiesen, was auf einen Beitrag von MRP-Transportern zur Detoxifizierung von Hg(II) hindeutet (Aleo et al., 2005). Weiterhin beschreiben Vernhet und Mitarbeiter eine dreifach erhöhte Resistenz der MRP1-überexprimierenden Lungentumorzelllinie GLC4/Sb30 gegenüber Hg(II), welche durch MK571 wieder aufgehoben wird (Vernhet et al., 2000). Neben Glutathion könnten Metallothioneine (MT) zur höheren Toleranz der H322 Kulturen gegenüber Hg(II) beitragen, sie werden sowohl von Hg(II) in MDCK Zellen induziert (Aleo et al., 2005), als auch in der Lunge von Ratten durch Inhalation von $Hg^0$ (Liu et al., 2003). Inhalation von Quecksilberdampf führt bei MT-knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren zu deutlich schwereren Lungenschäden, sowie zu einer erhöhten Mortalität (Yoshida et al., 1999). Metallothioneine sind jedoch wahrscheinlich keine Substrate für MRP-Transporter, da nach Induktion von Metallothioneinen in der Leber die Elimination von Quecksilber über die Galle reduziert ist (Klaassen, 1978). Dies würde auch erklären warum die Toleranz der H322 Zellen nicht durch MK571 verändert wird. Ein weiterer Grund für die im Vergleich zu den NHBE-Zellen erhöhte Toleranz der H322 könnte das Vorhandensein eines anderen Transportsystems zur Ausscheidung von Hg(II) in letzterer sein.

Inhalation von elementarem Quecksilber induziert in der Lunge von Ratten neben Mrp1 und 2 auch MDR1 (Liu et al., 2003), ein Beitrag von MDR1 zur Detoxifizierung von Hg(II) wurde jedoch bis dato noch nicht beschrieben. Darüber hinaus zeigten Liu und Mitarbeiter in derselben Studie auch eine gesteigerte Expression des Zinktransporters ZnT1 und des O*rganic Cation Transporters* OCT1, von beiden Proteinen ist jedoch ebenfalls bisher nicht bekannt, ob sie eine Rolle bei der Elimination von Hg(II) spielen. Vergleicht man die Ergebnisse der Vitalitätstests mit Arsenit und Hg(II), zeigt sich, dass in den beiden untersuchten Zelltypen MRP-Transporter vor allem für die Detoxifizierung von Arsenit relevant sind, wohingegen sie für die Toleranz gegenüber Hg(II) nur in NHBE-Zellen relevant sind und an der Homöostase von Cu(II) nach den vorliegenden Ergebnissen nicht beteiligt zu sein scheinen.

**MRP-Transporter unter Hg(II)**

Wie bereits die Ergebnisse der Vitalitätstests an H322 Zellen bei gleichzeitiger Einwirkung von Hg(II) und MK571, spricht auch die Expression der untersuchten MRP-Transporter auf RNA-Ebene nach 24-stündiger Behandlung mit Hg(II) nicht für eine Beteiligung dieser Proteine an der Elimination von Hg(II) in H322 Zellen. Vielmehr ist MRP1 bei 5 µM Hg(II) signifikant auf das 0,6-fache reprimiert, bei 30 µM Hg(II) ist die Expression jedoch wieder auf dem Niveau der Kontrollen (vgl. Abb. 38, S.77). Die Expression der weiteren untersuchten Transporter MRP3, 4, 5 und UMAT wurde durch die Belastung mit Hg(II) nicht signifikant verändert. Obwohl die Ergebnisse der Vitalitätstests an NHBE-Zellen bei Inkubation mit Hg(II) und MK571 als Hinweis auf eine Beteiligung von MRP-Transportern gewertet werden können, kommt es unter Behandlung mit Hg(II) für einen Tag nicht zu einer signifikanten Änderung der mRNA-Menge der untersuchten ABC-Transporter in den Kulturen aus dem Material der drei verschiedenen Patienten (vgl. Abb. 42, S.82). Zwischen den Kulturen sind jedoch teilweise signifikante Unterschiede in der Expression einzelner MRP-Isoformen erkennbar. Die Menge von MRP1 in den Kulturen von B146 entspricht ungefähr dem Dreifachen derjenigen in den Kulturen von B242, sie liegen damit genauso weit auseinander wie die Expressionen von MRP1 in den unbehandelten Kulturen von B182 und B201 nach 18 Tagen in Kultur. Zwischen Primärkulturen von NHBE-Zellen aus dem Material von verschiedenen Patienten sind Unterschiede bis zum 7,7-fachen beschrieben worden (Lehmann et al., 2005). Bei der mRNA-Menge von MRP3 sind die inter-individuellen Unterschiede zwischen den Kulturen am ausgeprägtesten: Die Zellen aus dem Experiment an B146 wiesen auch hier die höchsten Werte auf, in den Kulturen von B242 beträgt die Expression noch zwischen einem Drittel und der Hälfte davon, in B162 jedoch ist nur etwa ein Fünfzigstel der in B162 bestimmten MRP3-Menge nachweisbar. Zwischen den Kontrollen der zweiten fünftägigen Behandlung mit Cu(II) im Rahmen der Langzeitexperimente sind Unterschiede erkennbar, diese sind jedoch nicht signifikant. Oguri und Mitarbeiter beschreiben Unterschiede bis zum 28-fachen zwischen den mRNA-Mengen von MRP3 zwischen Biopsien von normalem Lungengewebe in einem Kollektiv von 40 Patienten (Oguri et al., 2001). Die Expression von MRP3 in der Leber unterscheidet sich zwischen einzelnen Individuen sogar um das bis zu 80-fache. Diese deutlichen Differenzen

könnten teilweise auf einen Einzelnukleotid-Polymorphismus in der Promotorregion von MRP3 zurückzuführen sein (Lang et al., 2004). MRP5 war in den Proben von B162 am höchsten exprimiert, die Proben weisen, verglichen mit B242, bis zur vierfachen Menge des Transporters auf. Die Kulturen von B146 unterscheiden sich in der Expression von MRP5 nicht signifikant von B162. Zwischen den unbehandelten Kulturen des Langzeitexperiments mit Cu(II) sind nach 18 Tagen in Kultur ebenfalls deutliche Unterschiede erkennbar, diese können jedoch nicht abschließend bewertet werden. In Kulturen, die aus nicht-kleinzelligen Lungentumoren von 13 verschiedenen Patienten etabliert wurden, variierte die mRNA-Menge von MRP5 ungefähr um das 2,3-fache (Young et al., 1999). UMAT wurde sowohl in den Kulturen von B162 und B242 als auch in den Proben der Langzeitexperimente an NHBE-Zellen untersucht, der Transporter war jedoch nur in B162 nachweisbar. Bisher wurde die Expression von UMAT in Primärkulturen von humanem Lungengewebe oder in Biopsien davon noch nicht beschrieben. In primären Fibroblastenkulturen aus Leber und Niere von drei Individuen war UMAT jeweils deutlich und ohne erkennbare inter-individuelle Unterschiede nachweisbar (Visapää et al., 2002).

Auch eine verlängerte Belastung mit Hg(II) führte in H322 Zellen weder nach 72 h noch nach sieben Tagen zu einer signifikanten Änderung von MRP1 bis 5 oder UMAT (vgl. Abb. 39, S.78 und Abb. 40, S.79). In MDCK Zellen führt bereits 24-stündige Behandlung mit 3, 10 oder 30 µM Hg(II) zu einer Induktion von MRP1 und 2, sowie der γ-Glutamylcystein-Synthetase und Metallothionein I und II sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (Aleo et al., 2005). Darüber hinaus steigt der Glutathiongehalt in diesen Zellen signifikant bis auf das Doppelte in der höchsten Dosisgruppe, welche auch eine um 50 % erhöhte Glutathion-S-Transferaseaktivität aufweist. Auch in der Leukämiezelllinie AML-2 steigt die mRNA-Menge von MRP1 nach Einwirkung von 40 µM Hg(II) für 24h auf das Doppelte (Kim et al., 2005). Die Proteinmenge von MRP1 beträgt nach dieser Zeit sogar das 3,3-fache, nach 48 h das Fünffache und nach 72 h entspricht sie dem 4,4-fachen der unbehandelten Kulturen. Andere MRP-Isoformen wurden nicht untersucht. Die Autoren untersuchten auch einen möglichen Effekt auf die Expression des Transporters ATP7B, seine Expression blieb jedoch konstant.

Wie der Mechanismus, über den Hg(II) zu einer Induktion von MRP-Transportern führt, auf zellulärer Ebene abläuft, ist bisher nicht bekannt. Der Anstieg der Expression von MRP1 in den AML-2 Zellen scheint jedoch zumindest teilweise über die Aktivierung der p38 MAP-Kinase vermittelt zu sein. Zum einen induzierte Hg(II) die Phosphorylierung von p38 nach 15, 30 und 120 Minuten, zum anderen reduzierte simultane Behandlung mit SB 203580, einem spezifischen Inhibitor der p38 MAPK, das Ausmaß der MRP1-Induktion durch 20 µM Hg(II) für 48 h signifikant vom 4-fachen auf das 2,5-fache. Über den MAPK-Signalweg wird der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert, der an der Regulation der Expression von MRP1 und 2 beteiligt ist (Drobna et al., 2003; Huang et al., 2001). Die Menge von MRP1 war, verglichen mit den Kontrollen, dennoch signifikant erhöht, was darauf hindeutet, dass die Induktion von MRP1 noch über andere Signalwege vermittelt wird. Han et al. beschreiben die Bildung von Hydroxylradikalen durch Hg(II) in Kulturen der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B (Han et al., 2007). Dies könnte auch zur Aktivierung der redoxempfindlichen Transkriptionsfaktoren

Sp1 und Nrf2 führen. Hg(II) besitzt eine starke Affinität zu Thiolgruppen, es könnte Nrf2 daher auch durch Bindung an die reaktiven Thiolgruppen von Keap1 aktivieren. Keap1 inaktiviert Nrf2 im Grundzustand durch Komplexierung. Dieser Komplex wird jedoch durch Modifikation von Keap1 aufgelöst (Itoh et al., 1999). Bisher ist bekannt, dass Nrf2 in humanen und murinen Zellen an der Regulation der Expression von MRP2 beteiligt ist (Vollrath, et al., 2006), darüber hinaus stimulieren Aktivatoren von Nrf2 in Mäusen die Expression von Mrp2-6 (Maher et al., 2005). In der Maus wurde weiterhin eine Mitwirkung von Nrf2 an der Regulation von MRP1 beschrieben (Hayashi et al., 2003).

Werden Primärkulturen von NHBE-Zellen für fünf Tage mit Hg(II) inkubiert, so zeigen die Kulturen aller drei Patienten (B182, B201 und B222) keinen Effekt auf die Mengen von MRP1, 4 und 5 (vgl. Abb. 44, S.85). In B201 und B222 war auch MRP3 nicht signifikant moduliert. In den mit 2,5 und 5 µM Hg(II) behandelten Kulturen von B182 hingegen kam es zu einer signifikanten Induktion von MRP3. Nach verlängerter Exposition gegenüber Hg(II) durch eine zweite fünftägige Inkubation mit Hg(II) unterscheiden sich die Effekte auf die Expression der untersuchten MRP-Transporter in den Kulturen der beiden Patienten (vgl. Abb. 45, S.86). Während in B201 MRP3 nicht moduliert ist, sind MRP1 und 4 erkennbar aber nicht signifikant reprimiert. In B182 hingegen ist keine Wirkung von Hg(II) auf MRP1 und 4 erkennbar, die MRP3-Menge hingegen zeigt einen nicht signifikanten Anstieg. Eine abschließende Beurteilung der Expression von MRP5 ist in beiden Experimenten aufgrund der Streuung der Kontrollen nicht möglich. MRP2 und UMAT waren in den Proben zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Die Ergebnisse an NHBE-Zellen weisen auf eine mögliche Beteiligung von MRP3 an der Detoxifizierung von Hg(II) in der Lunge hin, was bisher noch nicht beschrieben wurde. Werden Ratten über einen Zeitraum von zehn Tagen für jeweils zwei Stunden täglich inhalativ gegenüber elementarem Quecksilber (4 $mg/m^3$) exponiert, führt dies zu einer Induktion verschiedener Transportproteine in der Lunge; neben MRP1 und 2 waren MDR1 sowie OCT1 und ZnT1 induziert (Liu et al., 2003). Die drei letztgenannten Proteine wurden jedoch bisher, mit Ausnahme dieses Befundes, nicht mit dem Transport von Hg(II) in Verbindung gebracht. Weiterhin waren in den Lungen der Tiere Metallothionein I und die Glutathion-S-Transferase π deutlich induziert. Für einen Transport von Hg(II) durch MRP2 und mindestens einen weiteren Transporter sprechen auch die Befunde von Sugawara und Mitarbeitern: In EHB-Ratten, die kein funktionsfähiges MRP2 besitzen, beträgt die über die Galle eliminierte Menge an Hg(II) 45 min nach Injektion von $^{203}$Hg(II) nur 25% der von den Wildtyptieren eliminierten Menge. Die in die Leber aufgenommene Menge ist jedoch bei beiden Stämmen gleich (Sugawara et al., 1998). Nach diesen Befunden muss aber noch mindestens ein weiteres Transportsystem für Hg(II) vorhanden sein, denn die von den EHB-Tieren weiterhin biliär eliminierte Menge Hg(II) muss ebenfalls transportervermittelt ausgeschieden worden sein, da Hg(II) biologische Membranen nur in sehr geringem Maße passieren kann. Weiterhin wird auch eine Beteiligung von MRP2 an der Elimination von Glutathionkomplexen des Methylquecksilbers postuliert (Ballatori, 2002).

Auch im Verlauf der Langzeitexperimente mit Hg(II) an NHBE-Zellen traten bei der Wirkung von Hg(II) auf die Expression der MRP-Transporter patientenabhängige Unterschiede zwischen den Kulturen auf. Zur genaueren Beurteilung der Relevanz der MRP-Transporter für den Schutz der

Lungenzellen vor Hg(II) wäre daher die Wiederholung der Langzeitexperimente mit dem Material weiterer Patienten sinnvoll, um sowohl die Bandbreite der Modulation bestimmter MRP-Isoformen als auch die Unterschiede in den Expressionsmustern der unterschiedlichen Isoformen erfassen zu können. Im Rahmen dieser Experimente sollten auch andere Resistenzmechanismen untersucht werden, etwa die zellulären Gehalte von Glutathion und Metallothioneinen, sowie die Expression von Glutathion-S-Transferasen und anderer Transporter, wie MDR1, OCT1 und ZnT1.

Nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Hg(II) und 54 Tagen in Kultur zeigen sowohl die Kontrollen als auch die mit 1 und 2,5 µM Hg(II) inkubierten Kulturen von B182 unter dem Phasenkontrastmikroskop keine morphologischen Auffälligkeiten. In den mit 5 µM Hg(II) belasteten Proben hingegen sind Zellen mit atypischer, leicht abgerundeter Form jedoch mit vergleichbarer Größe sowie intakten Membranen und Zellkernen erkennbar. Darüber hinaus finden sich Zellen mit zytoplasmatischen Vesikeln (vgl. Abb. 47, S.88). MDCK Zellen, die ebenfalls epithelialer Natur sind, zeigen nach Kontakt mit Hg(II) ähnliche morphologische Veränderungen, jedoch schon nach deutlich kürzerer Zeit. Die Zellen verlieren ihre epitheltypische polygonale Form und man erkennt bereits nach 24 h mit 10 µM Hg(II), oder nach 48h mit 1 µM Hg(II), zytoplasmatische Vesikel (Aleo et al., 2002 und 2005). Mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) wurde Hg bereits in Vesikeln neuronaler Zellen aus Biopsien von Opfern der Minamata-Katastrohpe (Shirabe, 1979) und in Lysosomen in den proximalen Tubuluszellen von mit Hg behandelten Ratten nachgewiesen (Danscher und Møller-Madsen, 1985). Wie bereits unter 4.2 beschrieben, könnten diese Vesikel als intrazelluläre Depots oder sekretorische Vesikel fungieren. Eine Speicherung von Hg in Lysosomen in Form von Hg-Se-Kristallen wird postuliert (Danscher und Stoltenberg, 2006).

Um die Funktion der Vesikel in den NHBE-Zellen und einen möglichen Zusammenhang mit der Detoxifizierung von Hg durch MRP-Transporter aufzuklären, sollten sie bei einer Wiederholung der Langzeitexperimente näher untersucht werden: Mittels konfokaler Laserscanmikroskopie könnte sowohl der Transport fluoreszierender MRP-Substrate in die Vesikel, als auch die Expression von MRP-Transportern oder anderen Transportern wie MDR1, OCT1 und ZnT1, in den Membranen der Vesikel bestimmt werden. Der Gehalt von Hg in den Vesikeln und seine Speicherform, etwa gebunden an Schwefel oder Selen, könnte mittels EDX untersucht werden. Eine Überprüfung, ob es sich bei den beobachteten intrazellulären Vesikeln um Lysosomen handelt könnte beispielsweise mit *LysoTracker*-Farbstoffen und konfokaler Laserscanmikroskopie durchgeführt werden (Poot, 2001).

### 4.5 Cd(II), Co(II) und Pb(II) als Faktoren für zellulären Stress

Die Bewertung der Toxizität von Schwermetallen ist komplex, dies gilt insbesondere für die Beurteilung ihres kanzerogenen Potentials (Barbosa et al., 2006; Beyersmann et al., 2008; Horiguchi et al., 2006; Lee et al., 2006; Nampoothiri et al., 2007; Saravana Devi et al., 2008). Bei den Schwermetallen ist selbst die Kanzerogenität eines einzelnen Elements auf mehrere molekulare Mechanismen zurückzuführen.

In einer Biomonitoringstudie an 78 Arbeitern in Hessen konnte bei Individuen, die gleichzeitig gegenüber Cadmium, Kobalt und Blei exponiert waren ein erhöhtes Auftreten von DNA-Schäden gezeigt werden (Hengstler et al., 2003a, b). Dieser Befund war insofern überraschend, als die Arbeiter nur gegenüber relativ niedrigen Konzentrationen an Schwermetallen exponiert waren und die meisten von ihnen die in Deutschland im Jahre 2003 gültigen arbeitsmedizinischen Grenzwerte für die individuelle Belastung nicht überschritten. Dieser Befund war der Anstoß für ein Experiment zur Untersuchung möglicher Auswirkungen von Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Konzentrationen, wie sie bei exponierten Arbeitern auftreten, auf Genexpressionsmuster von Zellkulturen mittels Microarrays. Die Zellkulturen wurden daher mit Schwermetallkonzentrationen in Höhe der im Jahr 2003 gültigen Grenzwerte für das Humanbiomonitoring behandelt: 15 µg/l Cd(II) (EKA-Wert), 25 µg/l Co(II) (EKA-Wert) und 550 µg/l Pb(II) (BAT-Wert). Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die Schwermetallgehalte im Blut der exponierten Arbeiter in der Studie von Hengstler und Mitarbeitern (Hengstler et al., 2003a). Als Modellsystem wurden Primärkulturen von NHBE-Zellen gewählt, da sowohl die Exposition gegenüber Cadmium, als auch gegenüber Kobalt, mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko in Verbindung gebracht wird. Weiterhin ist die inhalative Exposition ein Hauptweg für die Belastung mit den genannten Schwermetallen am Arbeitsplatz.

In den mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination behandelten Kulturen wurden einige Gene identifiziert, die an der zellulären Antwort auf Stress beteiligt sind, etwa Enzyme des Glutathionhaushalts wie die γ-Glutamylcystein-Synthetase und die Glutathion-Peroxidase 2 (vgl. Abb. 50, S.93). Auch die überrepräsentierten Transkriptionsfaktoren Oct-1, HIC1, TGIF, CREB, ATF4, SRF und YY1 deuten auf eine Stressreaktion hin (vgl. Tab. 38 (Anh.), S.185). Oct-1 war nach der Kombinationsbehandlung in den Promotorregionen der veränderten Gene der Kulturen aller vier Patienten überrepräsentiert. Bei drei davon in den induzierten Genen, bei einem (B215) in den reprimierten Genen. Oct-1 ist ein Stresssensor und wird durch DNA-Schäden aktiviert (Schild-Poulter et. al, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Oct-1 defiziente Zellen überempfindlich sind gegenüber Gammastrahlung, Doxorubicin und Wasserstoffperoxyd (Tantin et al., 2005). Inaktivierung des Tumorsuppressorgens HIC1, einem transkriptionalen Repressor, hemmt die Funktion von p53 indem es das Stressprotein SIRT1 aktiviert, welches es Zellen ermöglicht die Apoptose zu umgehen (Chen at al., 2005; Pinte et al., 2004). HIC1 war bei zwei von vier Patienten (B214 und B216) in den Promotorregionen der reprimierten und bei einem (B218) in denen der induzierten Gene überrepräsentiert. Dies könnte bei B218 ein Warnsignal hinsichtlich potentiell präneoplastischer Veränderungen im Genexpressionsmuster sein, vor allem auch im Zusammenhang mit der Überrepräsentation von TGIF in den Promotoren der induzierten Gene dieser Kulturen. TGIF, welches in den erhöhten Genen bei B216 und B218 überrepräsentiert war, wird durch oxidativen Stress induziert, kann die Aktivierung des Promotors von p21 unterdrücken und dadurch einer Unterbrechung des Zellzyklus entgegenwirken (Liu und Huang, 2008; Schweikl et al., 2008;). Von CREB (cAMP R*esponse Element-Binding Protein*), einem Transkriptionsfaktor der in B216 und B218 reduzierten Gene, ist bekannt, dass er das Überleben von Zellen während oxidativem Stress steuert (Barlow et al, 2008). ATF4 hingegen wurde als ebenfalls durch oxidativen Stress induzierbarer, jedoch

pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor beschrieben (Lange et al., 2008), er ist in der Promotoranalyse der reprimierten Gene von B214 und B216 überrepräsentiert. SRF (*Serum Response Factor*), der aus den induzierten Transkripten in B214 und B215 ermittelt wurde, ist wie CREB und Elk-1 auch durch Arsenit oder Anisomycin induzierbar, was durch den MAP-Kinase-Signalweg vermittelt wird (Bébien et al., 2003). Bemerkenswert ist hierbei, dass Arsenit eine gemeinsame Aktivierung von SRF, CREB und Elk-1 bewirkt, Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination jedoch laut Promotoranalyse in keinem der vier Patienten zu einer simultanen Aktivierung dieser drei Transkriptionsfaktoren führten. Für den Transkriptionsfaktor YY1 (Ying Yang 1) wurde gezeigt, dass er die Aktivierung von p53 und damit die Induktion von p53-Zielgenen durch genotoxischen Stress verhindert (Grönroos et al., 2004). Er ist in B215 in den induzierten Transkripten überrepräsentiert, in B216 und B218 jedoch in den reprimierten. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung von NHBE-Zellen mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination zu einer verstärkten Transkription von Genen des Glutathionhaushalts führte, sowie zu einer koordinierten Reaktion von mindestens sieben stressassoziierten Transkriptionsfaktoren, was die beschriebenen komplexen Veränderungen der Genexpressionsmuster zur Folge hatte.

Die Beeinträchtigung des Ablaufs des Zellzyklus durch Schwermetalle ist hinreichend bekannt (Beyersmann et al., 2008). Auch im vorliegenden Experiment konnte eine verminderte Expression von an der Steuerung des Zellzyklus beteiligten Genen, wie etwa die Repression von Cyklin A1, gezeigt werden. Die Deregulation von zellzyklusassoziierten Genen steht im Zusammenhang mit einer veränderten Expression von Genen des Purin- und Pyrimidinmetabolismus wie der Adenosin-Kinase, Phosphodiesterase-7A und Thymidylat-Synthase (vgl. Abb. 54 (Anh.), S.179 und Abb. 55 (Anh.), S.181). Durch Promotoranalyse konnten zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die an der Steuerung des Ablaufs des Zellzyklus beteiligt sind: Elk-1, ein MAP-Kinase-abhängiger Transkriptionsfaktor (Spangenberg et al., 2006; Trost et al., 2005; Zhang et al., 2008), sowie der Ets-Transkriptionsfaktor GABP (Yang et al., 2007). Beide Transkriptionsfaktoren waren nach kombinierter Schwermetallexposition in B215 in den Promotoren der induzierten Gene überrepräsentiert, bei B216 und B218 jedoch in den Promotoren der reprimierten Gene.

Die kombinierte Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) erhöhte in den NHBE-Zellen die mRNA-Menge von Genen der Steroidbiosynthese wie der Squalen-Epoxidase und der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (vgl. Abb. 56 (Anh.), S.182). Die Promotoranalyse zeigte in den induzierten Genen von B214 und B216 eine Überrepräsentation von SRY, welcher eine Rolle bei der Geschlechtsdeterminierung spielt, wobei der Y-chromosomale Transkriptionsfaktor SRY die Entwicklung der Testes anstatt von Ovarien aus den frühen Gonaden initiiert. (Sekido und Lovell-Badge, 2008). Reproduktionstoxische Effekte von Schwermetallen, die durch eine Deregulierung der Steroidbiosynthese verursacht werden, sind gut dokumentiert (Gump et al., 2008; Telisman et al., 2007; Thompson und Bannigan, 2008). Ein Effekt auf die Steroidbiosynthese in Primärkulturen von NHBE-Zellen im vorliegenden Experiment ist insofern relevant, als die Lunge eine beachtliche Kapazität zur Metabolisierung von Steroiden besitzt (Kao et al., 1979).

Der Vergleich der Genexpressionsmuster nach Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination und nach Inkubation mit den einzelnen Metallen zeigt, dass die Induktion der Dihydrodiol-Dehydrogenasen 1 und 2 (AKR1C1 und AKR1C2) ein spezifischer Effekt des Pb(II) war und nach Co(II) und Pb(II) nicht auftrat. In humanen Ovarialkarzinomzelllinien führt die Überexpression der Dihydrodiol-Dehydrogenasen 1 und 2 zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin (Deng et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dreitägige Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Konzentrationen, wie sie im Blut exponierter Arbeiter vorkommen können, in Primärkulturen von NHBE-Zellen zu einer koordinierten Stressantwort in Form einer Induktion von Genen des Glutathionhaushalts sowie der Reaktion von mindestens sieben stressassoziierten Transkriptionsfaktoren führte, die auch Signale umfasste, die das Überleben von Zellen begünstigen. Darüber hinaus kam es zu einer Deregulierung der Zellproliferation, erhöhtem Steroidmetabolismus und der Induktion von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus. In diesem Experiment wurden diejenigen Gene identifiziert, die eine Reaktion von normalen humanen Bronchialepithelzellen auf die untersuchten Schwermetalle am empfindlichsten anzeigen.

Diese Signaturgene sollten im Rahmen der Wiederholung der Experimente mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) an NHBE-Zellen mittels *Real-time* RT-PCR verifiziert und auf einen möglichst kleinen Satz eingegrenzt werden. In weiterführenden Untersuchungen, sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*, könnten sie dann als Marker-Gene dazu verwendet werden, Schwellenwertdosen zu ermitteln, unterhalb welcher die beschriebenen unerwünschten Wirkungen nicht mehr auftreten. Dies ist insofern relevant, als es unter bestimmten Umständen möglich sein kann, für nicht-gentoxische Kanzerogene solche Schwellenwerte zu definieren (Bolt et al., 2004; Hengstler et al., 2003 a; b; Lilienblum et al., 2008).

# 5 Zusammenfassung

Wenngleich die Atemluft nicht die Hauptquelle für die Belastung des Menschen mit Metallen darstellt, so ist der Mensch über diesen Pfad dennoch chronisch gegenüber geringen Mengen an Metallen exponiert. Da *Multidrug Resistance-Associated Proteins* (MRP) ein breites Spektrum unterschiedlicher Substrate transportieren, wurde eine Beteiligung dieser Proteine an der Elimination bestimmter Metalle postuliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Eignung von Langzeitkulturen von NHBE-Zellen als Modellsystem zur Erforschung einer Modulation der Expression von MRP1 - 5 und des *Ubiquitously Expressed Mammalian ABC Half-Transporter* (UMAT) untersucht. Dafür wurde die Expression dieser Transporter in NHBE-Zellen aus dem Gewebe von zwei Patienten (B182 und B201) über einen Zeitraum von bis zu 36 Tagen mittels *Real-time* RT-PCR bestimmt. Die Proben der einzelnen Patienten zeigten nach 18 Tagen zwar - verglichen mit den jeweiligen Kulturen nach 9 Tagen - keine signifikanten Änderungen der mRNA-Mengen der untersuchten Transporter, dennoch waren bei der Expression von MRP1, 3 und 4 signifikante inter-individuelle Unterschiede zwischen den Donoren detektierbar. MRP2 und UMAT konnten nicht nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Kultur kommt es nach 36 Tagen in B201 zu einer signifikanten Repression von MRP1 und 3. In den verwendeten Primärkulturen von NHBE-Zellen waren die in der humanen Lunge relevanten MRP-Transporter über einen Zeitraum von bis zu 36 Tagen in Kultur nachweisbar, sie stellen damit ein geeignetes Modellsystem zur Darstellung der Effekte einer Langzeitexposition gegenüber Metallionen auf die Expression dieser Transporter dar.

Die Frage, ob MRP-Transporter in Lungenzellen einen Beitrag zur Detoxifizierung von Arsenit leisten, wurde in verschiedenen Experimenten sowohl an der Tumorzelllinie H322 als auch an NHBE-Zellen untersucht. In Gegenwart von MK571, einem Inhibitor von MRP1 bis 5, sind H322 Zellen im MTT-Test bei Inkubation für einen oder fünf Tage signifikant empfindlicher gegenüber Arsenit. Gleiches zeigte sich auch bei NHBE-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Nach Behandlung mit Arsenit für 24 h ist in H322 auf mRNA-Ebene eine Repression von MRP1, 2 und 4 nachweisbar. In NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182, B201) induzierte die erste fünftägige Behandlung mit Arsenit jedoch die Expression von MRP3, 4 und 5. Nach der zweiten Inkubation mit Arsenit kommt es in den Kulturen von B201 zu einer Repression von MRP1, 3, 4 und 5. In B182 vermindert die Behandlung die Expression dieser Transporter jedoch nicht. Vergleicht man jedoch die Expressionen nach der ersten und der zweiten Inkubation mit Arsenit, ist auch bei B182 ein deutlicher Rückgang der mRNA-Mengen von MRP1 und besonders von MRP3 sowohl in den Kontrollen als auch in den behandelten Kulturen erkennbar. Bemerkenswerterweise waren nach der dritten fünftägigen Inkubation mit Arsenit in den Kulturen von B201 keine signifikanten Effekte mehr auf mRNA-Mengen von MRP1, 4 und 5 nachweisbar, MRP3 war jedoch noch immer reprimiert. Die vierte fünftägige Behandlung der Kulturen von B201 mit Arsenit hatte weiterhin keine signifikante Wirkung auf die Expression von MRP1, 4 und 5. Sie induzierte jedoch MRP3 signifikant.

Kultur von H322 Zellen in Gegenwart von Arsenit (2,5 und 5µM) für einen, drei und fünf Tage, führte unabhängig von Arsenitkonzentration und Behandlungsdauer zu einer signifikanten Steigerung der Gesamttransportaktivität von MRP1 - 5 um 20 %, was auf die Induktion eines oder mehrerer MRPs zurückzuführen sein könnte.
Nach Inkubation von H322 mit Arsenit (2,5 und 5 µM) für 24 h war im Comet-Assay keine Schädigung der DNA erkennbar, in Gegenwart von MK571 kam es jedoch zu gentoxischen Effekten. Wurde die Behandlungsdauer auf fünf Tage ausgedehnt, verursacht bereits Arsenit allein signifikante DNA-Schäden, diese wurden durch MK571 noch verstärkt.

Sowohl H322 als auch NHBE-Zellen wurden auch als Modellsysteme zur Untersuchung einer Beteiligung von MRP-Transportern an der Homöostase von Cu(II) eingesetzt. In H322 und NHBE-Zellen hat MK571 keine Auswirkungen auf die Toleranz der Kulturen gegenüber Cu(II). Vierundzwanzigstündige Inkubation mit 15 und 25 µM Cu(II) beeinflusste weder in H322 noch in NHBE-Zellen die Expression der untersuchten MRP-Transporter, in H322 war auch die mRNA-Menge von UMAT unverändert. Auch verlängerte Einwirkung von Cu(II) für sieben Tage auf H322 Zellen änderte die Expression von MRP1 bis 5, sowie die von UMAT nicht. Die erste fünftägige Behandlung mit Cu(II) (2,5 und 5 µM) hatte in den Kulturen von B182, B201 und B222 keinen Effekt auf die Expression von MRP1, 3, 4 und 5. Die Kontrollen der einzelnen Patienten zeigen untereinander ebenfalls keine signifikanten Expressionsunterschiede. Nach der zweiten fünftägigen Behandlung mit Cu(II) sind Unterschiede zwischen den Kulturen der verschiedenen Patienten erkennbar. Die Behandlung mit Cu(II) hat bei B182 keine Effekte auf MRP1, 3 und 5, sie induzierte jedoch MRP4, womit die Expression wieder das Niveau der Kontrollen nach neun Tagen erreicht. In den Proben von B201 kam es nicht zu deutlichen Wirkungen auf die Expression von MRP1 und 3, höchsten zu einer leichten Repression, die Mengen von MRP4 und 5 waren nicht moduliert. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit Cu(II) keine einheitliche Wirkung in den Kulturen der verschiedenen Patienten hat. Die Ergebnisse deuten jedoch nicht auf einen Beitrag der untersuchten MRP-Transporter zur Detoxifizierung von Cu(II) in den untersuchten Lungenzellkulturen hin.

Die Frage, ob MRP-Transporter einen Anteil am Schutz von Lungenzellen vor Hg(II) haben, wurde ebenfalls an H322 und NHBE-Zellen untersucht. Während MK571 keinen Einfluss auf die Toleranz von H322 Kulturen gegenüber Hg(II) hat, erhöht es die Empfindlichkeit von NHBE-Zellen signifikant. Nach 24-stündiger Inkubation ist in H322 Zellen MRP1 bei 5 µM Hg(II) signifikant reprimiert, bei 30 µM Hg(II) ist die Expression jedoch wieder auf dem Niveau der Kontrollen. In NHBE-Zellen aus dem Material von drei verschiedenen Patienten kommt es unter Behandlung mit Hg(II) für einen Tag nicht zu einer Änderung der mRNA-Menge der untersuchten ABC-Transporter. Verlängerte Belastung mit Hg(II) beeinflusste in H322 weder nach 72 h noch nach sieben Tagen die Expression von MRP1 bis 5 oder UMAT. Werden NHBE-Zellen für fünf Tage mit Hg(II) inkubiert, so zeigen die Kulturen aller drei Patienten (B182, B201 und B222) keine Effekte auf die Mengen von MRP1, 4 und 5. In B201 und

B222 war auch MRP3 nicht signifikant moduliert. In den Kulturen von B182 hingegen kam es zu einer signifikanten Induktion von MRP3. Nach der zweiten fünftägigen Inkubation mit Hg(II) unterscheiden sich die Effekte auf die Expression der untersuchten MRP-Transporter in den Kulturen der beiden Patienten: Während Hg(II) in B182 keine Wirkung auf MRP1, 4 und 5 hatte, war die MRP3-Menge hingegen erkennbar aber nicht signifikant gesteigert. Im Gegensatz dazu waren in B201 MRP3 und 5 nicht moduliert, MRP1 und 4 jedoch waren erkennbar aber nicht signifikant reprimiert. Die Ergebnisse an B182 weisen auf eine mögliche Beteiligung von MRP3 am Schutz der NHBE-Zellen vor chronischer Belastung mit Hg(II) hin, was bisher noch nicht beschrieben wurde.

Zur Beantwortung der Frage, ob bereits Konzentrationen an Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Höhe der im Jahre 2003 gültigen Grenzwerten für das Humanbiomonitoring Effekte auf die RNA-Expressionsmuster in Primärkulturen von NHBE-Zellen haben können, wurden Kulturen von vier verschiedenen Patienten (B214, B215, B216 und B218) mit den genannten Metallen für 72 h jeweils einzeln und in Kombination behandelt. Die Genexpressionsmuster dieser Kulturen wurden mittels Microarrays bestimmt. Kombinierte Exposition gegenüber Cd(II), Co(II) und Pb(II) induzierte Gene, die an der zellulären Antwort auf Stress beteiligt sind, etwa Enzyme des Glutathionhaushalts wie die γ-Glutamylcystein-Synthetase und die Glutathion-Peroxidase 2. Auch die überrepräsentierten Transkriptionsfaktoren Oct-1, HIC1, TGIF, CREB, ATF4, SRF und YY1 deuten auf eine Stressreaktion hin. Der zweite wichtige Effekt der kombinierten Exposition war die verminderte Expression von an der Steuerung des Zellzyklus beteiligten Genen, wie etwa der Repression von Cyklin A1. Die Deregulation von zellzyklus-assoziierten Genen steht im Zusammenhang mit einer veränderten Expression von Genen des Purin- und Pyrimidinmetabolismus wie der Adenosin-Kinase, Phosphodiesterase-7A und Thymidylat-Synthase. Durch Promotoranalyse konnten zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die an der Steuerung des Ablaufs des Zellzyklus beteiligt sind: Elk-1 und der Ets-Transkriptionsfaktor GABP. Drittens führte die Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) zu einer erhöhten Transkription von Genen der Steroidbiosynthese wie der Squalen-Epoxidase und der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase. In diesem Zusammenhang ist auch relevant, dass die Promotoranalyse eine Induktion von SRY zeigte, von welchem bekannt ist, dass er eine Rolle bei der Geschlechtsdeterminierung spielt. Der vierte Effekt, die erhöhte Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme, besonders der Dihydrodiol-Dehydrogenasen 1 und 2 (AKR1C1, AKR1C2) wird, wie die Inkubation mit den einzelnen Schwermetallen zeigte, ausschließlich durch Pb(II) verursacht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dreitägige Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Konzentrationen, wie sie im Blut exponierter Arbeiter vorkommen können, in Primärkulturen von NHBE-Zellen zu einer koordinierten Stressantwort in Form einer Induktion von Genen des Glutathionhaushalts sowie der Reaktion von mindestens sieben stressassoziierten Transkriptionsfaktoren führte, die auch Signale umfasste, die das Überleben von Zellen begünstigen. Darüber hinaus kam es zu einer Deregulierung der Zellproliferation, erhöhtem Steroidmetabolismus und der Induktion von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus.

## 6 Literaturverzeichnis

Aceto A, di Ilio C., Angelucci S, Longo V, Gervasi PG, Federici G. (1989) Glutathione transferases in human nasal mucosa. Arch Toxicol 63:427-431

Affymetrix (2004) GeneChip expression analysis technical manual, (P/N 701021 Rev.5), Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y. (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. Biochim. Biophys. Acta 1511:7–16

Akita H, Suzuki H, Hirohashi T, Takikawa H, Sugiyama Y. (2002) Transport activity of human MRP3 expressed in Sf9 cells: comparative studies with rat MRP3. Pharm Res 19:34–41

Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, Sardini A, Kasza I, Mumford AD, Naoumova RP, Tuddenham EG, Szabo K, Higgins CF. (2005) A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. Blood 106:542-549

Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, Tanganelli S, Vezzola A, Giuliani R, Steimberg N, Apostoli P, Mazzoleni G. (2002) Antioxidant potential and gap junction-mediated intercellular communication as early biological markers of mercuric chloride toxicity in the MDCK cell line. Toxicol In Vitro. 16(4):457-65

Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, Giuliani R, Rovetta F, Steimberg N, Apostoli P, Parrinello G, Mazzoleni G. (2005) Endogenous thiols and MRP transporters contribute to Hg2+ efflux in HgCl2-treated tubular MDCK cells. Toxicology 206:137–151

Allen JD, Brinkhuis RF, van Deemter L, Wijnholds J, Schinkel AH. (2000) Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. Cancer Res. 60, 5761–5766

Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M. (1996) Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. Hum Mol Genet 5: 1649–1655

Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SPC, Deeley RG. (1995) Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. Cancer Res 55: 102–110

Annilo T, Dean M. (2004) Degeneration of an ATP-binding cassette transporter gene, ABCC13, in different mammalian lineages. Genomics 84: 34–46

Aposhian HV, Aposhian MM. (2006) Arsenic toxicology: Five questions. Chem Res Toxicol 19: 1–15

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nature Genet. 25: 25-29

Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, Hartwig A. (2000) Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. Carcinogenesis. 21:2097–2104

Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D. (2002) A Method for the In Vitro Exposure of Human Cells to Environmental and Complex Gaseous Mixtures: Application to Various Types of Atmosphere. ATLA 30, 433-441

Bachleitner-Hofmann, T., Kees, M., Gisslinger, H. (2002) Arsenic trioxide: acute promyolocytic leukemia and beyond. Leuk. Lymphoma 43, 1535–1540

Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, et al. (1998) Functional multidrug resistance protein (MRP) lacking the N-terminal transmembrane domain. J Biol Chem 273:32167–75

Bakos E, Evers R, Sinko E, Varadi A, Borst P, and Sarkadi B. (2000) Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. Mol Pharmacol 57: 760–768

Bakos E, Homolya L. (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) Pflugers Arch - Eur J Physiol 453:621–641

Ballatori N. (2002) Transport of toxic metals by molecular mimicry. Environ Health Perspect 110 (suppl 5):689–694

Ballatori N, Hammond C., Cunningham J, Krance S, Marchan R. (2005) Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. Toxicology and Applied Pharmacology 204 238– 255

Barbosa F Jr, Sertorio JT, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. (2006) Clinical evidence for lead-induced inhibition of nitric oxide formation. Arch Toxicol 80(12):811–816

Barlow CA, Kitiphongspattana K, Siddiqui N, Roe MW, Mossman BT, Lounsbury KM. (2008) Protein kinase A-mediated CREB phosphorylation is an oxidant-induced survival pathway in alveolar type II cells. Apoptosis 13(5):681–692

BAuA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin) (2001) Begründung für Bewertung von Stoffeigenschaften: Cobalt-Metall und Cobalt-Verbindungen. http://www.baua.de/nn_5846/sid_07CBB221417DFFE58C8320D2FE5544DF/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/905/905-cobalt-metall-und-verbindungen.pdf

Bébien M, Salinas S, Becamel C, Richard V, Linares L, Hipskind RA. (2003) Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. Oncogene 22(12):1836–1847

Beckmann JD, Bartzatt R, Ulphani J, Palmatier R, Sisson JH. (1995) Phenol sulfotransferase activities and localization in human nasal polyp epithelium. Biochem Biophys Res Commun 213:104-111

Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, Kruh GD. (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). Cancer Res 62: 6172–6177

Belitz HD, Grosch W. (Hrsg.) (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg:373-374

Bera TK, Lee S, Salvatore G, Lee B, Pastan IH. (2001) MRP8, a new member of abc transporter superfamily, identified by est database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. Mol Med 7:509–516

Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, Pastan I. (2002) MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 99: 6997–7002

Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, de Jong PT. (2000) Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. Nat Genet 25:228–2231

Bergen AA, Plomp AS, Hu X, de Jong PT, Gorgels TG. (2007) ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. Pflugers Arch 453:685-691

Beyersmann D, Hartwig A. (2008) Carcinogenic metal compounds - recent insight in molecular and cellular mechanisms. Arch Toxicol 82(8):493–512

BfR (2004) Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln. Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte, Teil II; BfR-Wissenschaft 04/2004; BfR: Berlin,; http://www.bfr.bund.de/cm/238/verwendung_von_mineralstoffen_in_lebensmitteln_bfr_wissenschaft_4_2004.pdf

BfR (2006) Cadmiumgehalt in Pinienkernen ist gesundheitlich unbedenklich. Stellungnahme Nr. 042/2007 des BfR vom 20. Juni 2006. http://www.bfr.bund.de

Bogdanffy MS, Keller DA. (1999) Metabolism of xenobiotics by the respiratory tract. In: Gardner DE, Crapo JD, McClellan RO (Hrsg.) Toxicology of the Lung. Raven Press, New York: 85-123

Bolstad B. (2007) affyPLM: Methods for fitting probe level models to Affy data. http://www.bioconductor.org/repository/devel/vignette/affyPLM

Bolt HM, Foth H, Hengstler JG, Degen G. (2004) Carcinogenicity categorization of chemicals - new aspects to be considered in a European perspective. Toxicol Lett 151:29–41

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. J Natl Cancer Inst 92:1295-1302

Borst P, Elferink RO. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. Annu Rev Biochem 71:537-592

Borst P, Zelcer N, van de Wetering K, Poolman B. (2006) On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins FEBS Letters 580 1085–1093

Buchet JP, Lauwerys R, Roels H. (1981) Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsinate in man. Int Arch Occup Environ Health, 48: 71–79

Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, and Keppler D. (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. J Biol Chem 271: 15091–15098

Buchwald A. (2006) Copper. in: Olson KR (Hrsg.) Poisoning and Drug Overdose. 5. Aufl., International Edition, McGraw-Hill Education - Europe: 174-176

Bustin SA. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays; Journal of Molecular Endocrinology 25, 169–193

Bustin SA. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems; Journal of Molecular Endocrinology 29, 23–39

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. (2005) Quantitative real-time RT-PCR – a perspective; Journal of Molecular Endocrinology 34, 597–601

Camakaris J, Petris MJ, Bailey L, Shen P, Lockhart P, Glover TW, Barcroft C, Patton J, Mercer JF. (1995) Gene amplification of the Menkes (MNK; ATP7A) P-type ATPase gene of CHO cells is associated with copper resistance and enhanced copper efflux. Hum Mol Genet. 4(11):2117-2123

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47(4):936-42

Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. (2005) Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. Exp Toxicol Pathol. 57 Suppl 1:189-204

Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, Henderson CJ, Wolf CR, Moffat GJ, Itoh K, et al. (2002) Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. Biochem J 365:405–416

Cheng YS, Yamada T, Yeh HC, Swift DL. (1988) Differential deposition of ultrafine aerosols in a human nasal chest. J Aerosol Sci 19:741-751

Chen SH, Liu SH, Liang YC, Lin JK, Lin-Shiau SY. (2000) Death signaling pathway induced by pyrrolidine dithiocarbamate-Cu(2+) complex in the cultured rat cortical astrocytes. Glia 31:249–261

Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. (2005) Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53- dependent DNA-damage responses. Cell 123(3):437–48

Chen YZ, Wu Y, Huang MJ, Lu LH. (2003) Effect of endogenous TGF-beta1 and TNF-alpha on the As(2)O(3) inducing apoptosis of HL-60 cells Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 24(5):231-4

Chen ZS, Lee K, Kruh GD. (2001) Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-β-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. J Biol Chem 276: 33747–33754

Chen ZS, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Shchaveleva I, Kotova E, Kruh GD. (2003) Characterization of the Transport Properties of Human Multidrug Resistance Protein 7 (MRP7, ABCC10) Mol Pharmacol 63:351–358

Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG, Kotova E, and Kruh GD. (2005) Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-β-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). Mol Pharmacol 67: 545–557

Chomczynski P. (1993) A Reagent for Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. BioTechniques 15(3):532-536

Choudhuri S, Klaassen CD. (2006) Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters, International Journal of Toxicology, 25:4, 231 - 259

Clarkson TW. (1989) Mercury. Journal of the American College of Toxicology, 8(7):1291–1296

Cohen MH, Hirschfeld S, Honig SF, Ibrahim A, Johnson JR, O'Leary JJ, White RM, Williams GA, Pazdur R. (2001) Drug approval summaries: arsenic trioxide, tamoxifen citrate, anastrazole, paclitaxel, bexarotene. The Oncologist 6, 4–11

Cole SPC, Chanda ER, Dicke FP, Gerlach JH, and Mirski SE. (1991) Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in a small cell lung cancer cell line: evidence for decreased susceptibility to druginduced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. Cancer Res 51: 3345–3352

Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, and Deeley RG. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 258: 1650–1654

Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG. (1994) Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. Cancer Res 54:5902–5910

Conner CE, Burchell B, Hume R. (1997) UDP-glucuronyl transferase enzyme family in both human and Balb/c mouse lung. Biochem Soc Trans 25:181S

Corbett Research (2003) Rotor-Gene 2000 Real-Time Amplification Operator's Manual Version 4.6. Mortlake, NSW, Australien; http://www.corbettresearch.com

Coursin DB, Cihla HP, Sempf J, Oberley TD, Oberley LW. (1996) An immunohistochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. Histol Histopathol 11:851-860

Courtois A, Payen L, Lagadic D, Guillouzo A, Fardel O. (1999) Evidence for a multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)-related transport system in cultured rat liver biliary epithelial cells. Life Sci. 64(9):763-74

Cyrys J, Stölzel M, Heinrich J, Kreyling WG, Menzel N, Wittmaack K, Tuch T, Wichmann HE. (2003) Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfurt, Germany. The Science of the Total Environment 305: 143–156

Dahl AR, Bond JA, Petridou-Fischer J, Sabourin PJ, Whaley SJ. (1988) Effects of the respiratory tract on inhaled materials. Toxicol Appl Pharmacol 93:484-492

Dano K. (1972) Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor in vivo. Cancer Chemother Rep 56:701-708

Danscher G, Møller-Madsen B. (1985) Silver amplification of mercury sulfide and selenide. A histochemical method for light and electron microscopic localization of mercury in tissue. J Histochem Cytochem 33:219–228

Danscher G, Stoltenberg M. (2006) Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc–sulphur/zinc–selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. Progr. Histochem. Cytochem. 41:57–139

Das SK, Ray K. (2006) Wilson's disease: an update. Nat. Clin. Pract. Neurol. 2(9):482–493

Dawson RJ, Hollenstein K, Locher KP. (2007) Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. Mol Microbiol 65:250-257

De Boeck M, Lombaert N, de Backer S, Finsy R, Lison D, Kirsch-Volders M. (2003) In vitro effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. Mutagenesis. 18:177–186

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Res 11:1156-1166

Deeley RG, Cole SPC. (2003) Multidrug resistance protein 1 (ABCC1). In: ABC Proteins: From Bacteria to Man. Holland IB, Cole SPC, Kuchler, Higgins CF. (Hrsg.) Elsevier Science Ltd., London: 393–422

Deeley RG, Westlake C, Cole SP. (2006) Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. Physiol Rev 86:849-899

Deng HB, Parekh HK, Chow KC, Simpkins H. (2002) Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. J Biol Chem 277(17):15035–15043

Development Core Team (2007) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ISBN 3-900051-07-0. URL: http://www.R-project.org

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft; MAK- und BAT-Werte-Liste (2003) (Mitteilung 39 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe vom 1. Juli 2003); Copyright 2003 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA; Weinheim; ISBN: 3-527-27516-9

DFG-Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Hrsg., (2005) MAK- und BAT-Werte-Liste 2005, Wiley-VCH: Weinheim

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft; MAK- und BAT-Werte-Liste (2007) (Mitteilung 43 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe vom 1. Juli 2007); Copyright 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA; Weinheim; ISBN: 978-3-527-31954-1

Dietrich CG, Ottenhoff R, de Waart DR, Oude Elferink RPJ. (2001) Role of MRP2 and GSH in intrahepatic cycling of toxins. Toxicology 167, 73– 81

Dijkstra M, Having, R, Vonk RJ, Kuipers F. (1996) Bile secretion of cadmium, silver, zinc and copper in the rat. Involvement of various transport systems. Life Sci. 59, 1237– 1246

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke, M. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(20):9363-9367

Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W, Mayberg MR, Bengez L, Janigro D. (2001) Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. Epilepsia 42, 1501–1506

Dopp E, Recklinghausen v. U, Hartmann LM, Stueckradt I, Pollok I, Rabieh S, Hao L, Nussler A, Katier C, Hirner AV, Rettenmeier AW. (2008) Subcellular distribution of inorganic and methylated arsenic compounds in human urothelial cells and human hepatocytes. Drug Metab Dispos 36(5):971-9

Draper MP, Martell RL, Levy SB. (1997) Indomethacin-mediated reversal of multidrug resistance and drug efflux in human and murine cell lines overexpressing MRP, but not P-glycoprotein.Br. J. Cancer 75(6):810–15

Drobna Z, Jaspers I, Thomas DJ, Styblo M. (2003) Differential activation of AP-1 in human bladder epithelial cells by inorganic and methylated arsenicals. FASEB J. 17:67–69

Duffy CP, Elliott CJ, O'Connor RA, Heenan MM, Coyle S, et al. (1998) Eur. J. Cancer 34:1250–59

Duvall RM, Norris GA, Dailey LA, Burke JM, McGee JK, Gilmour MI, Gordon T, Devlin RB. (2008) Source apportionment of particulate matter in the U.S. and associations with lung inflammatory markers. Inhal Toxicol. 20(7):671-83

Elkon R, Linhart C, Sharan R, Shamir R, Shiloh Y. (2003) Genomewide in-silico identification of transcriptional regulators controlling cell cycle in human cells. Genome Res 13(5):773–780

EPA (2004) Air Quality Criteria for Particulate Matter (Final Report, Oct 2004). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA 600/P-99/002aF-bF; http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=87903

Evers R, Kool M, van Deemter L, Janssen H, Calafat J, Oomen LC, Paulusma CC, Oude Elferink RP, Baas F, Schinkel AH, Borst P. (1998) Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. J Clin Invest 101:1310–1319

Falcon S, Gentleman R. (2007) Using GO stats to test gene lists for GO term association. Bioinformatics 23:257–258

FAO/WHO (1993) Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, Forty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Technical Report Series 837), Geneva, World Health Organization

Filipits M, Haddad V, Schmid K, Huynh A, Dunant A, André F, Brambilla E, Stahel R, Pignon JP, Soria JC, Popper HH, Le Chevalier T, Pirker R. (2007) Multidrug Resistance Proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patientswith completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. Clin Cancer Res; 13(13): 3892-3898

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, and Scheper RJ. (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol 148: 1237–1247

Florea AM, Yamoah EN, Dopp E. (2005) Intracellular Calcium Disturbances Induced by Arsenic and Its Methylated Derivatives in Relation to Genomic Damage and Apoptosis Induction Environ Health Perspect 113(6) : 659 - 664

Forbes B, Ehrhardt C. (2005) Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. Eur J Pharm Biopharm. 60(2):193-205

Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J, J. (1989) The role of glutathione in copper metabolism and toxicity Biol. Chem. 264:5598–5605

Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W, Schrenk D. (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. Am J Pathol 157:1575–1580

Garcia-Fernandez AJ, Bayoumi AE, Perez-Pertejo Y, Motas M, Reguera RM, Ordonez C, Balana-Fouce R, Ordonez D. (2002) Alterations of the glutathione–redox balance induced by metals in CHO-K1 cells. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 132: 365–373

Gebel TW. (2001) Genotoxicity of arsenical compounds. Int J Hyg Environ Health. 203(3):249-62

Gebel TW, Leister M, Schumann W, Hirsch-Ernst K. (2002) Low-level self-tolerance to arsenite in human HepG2 cells is associated with a depressed induction of micronuclei. Mutat Res. 514(1-2): 245-55

Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, and Beck J. (1995) The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. Biochem Biophys Res Commun 208: 345–352

Gennuso F, Fernetti C, Tirolo C, Testa N, L'Episcopo F, Caniglia S, Morale MC, Ostrow JD, Pascolo L, Tiribelli C, Marchetti B. (2004) Bilirubin protects astrocytes from its own toxicity by inducing up-

regulation and translocation of multidrug resistanceassociated protein 1 (Mrp1). Proc Natl Acad Sci USA 101:2470–2475

GESTIS (1999) Stoffdatenblatt Blei, Pulver. Stand: 30.07.1999; http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll/Infobase/uberschrift05064

GESTIS (2003a) Stoffdatenblatt Cobalt. Stand: 01.09.2003; http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll/Infobase/uberschrift10298

GESTIS (2003b) Stoffdatenblatt Cobalt(II)-chlorid. Stand: 03.11.2003; http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll/Infobase/uberschrift10336

GESTIS (2004) Stoffdatenblatt Arsen(III)-oxid. Stand: 04.02.2004; http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll?f=templates&fn=main-hit-h.htm&2.0

GESTIS (2004b) Stoffdatenblatt Kupfer(II)-sulfat. Stand: 04.02.2004; http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll/Infobase/uberschrift27812

Glahn F, Schmidt-Heck W, Zellmer S, Guthke R, Wiese J, Golka K, Hergenröder R, Degen GH, Lehmann T, Hermes M, Schormann W, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Gebhardt R, Hengstler JG, Foth H. (2008) Cadmium, cobalt and lead cause stress response, cell cycle deregulation and increased steroid as well as xenobiotic metabolism in primary normal human bronchial epithelial cells which is coordinated by at least nine transcription factors.; Arch Toxicol. 82(8):513-24

Gradhand, U, Kim RB. (2008) Pharmacogenomics of MRP Transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2). Drug Metabolism Reviews. 40(2): 317-354

Grönroos E, Terentiev AA, Punga T, Ericsson J. (2004) YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. Proc Natl Acad Sci U S A 101(33):12165–70

Gross JB Jr, Myers BM, Kost LJ, Kuntz SM, LaRusso NF. (1989) Biliary copper excretion by hepatocyte lysosomes in the rat: major excretory pathway in experimental copper overload. J Clin Invest 83: 30–39

Gump BB, Stewart P, Reihman J, Lonky E, Darvill T, Parsons PJ, Granger DA. (2008) Low-level prenatal and postnatal blood lead exposure and adrenocortical responses to acute stress in children. Environ Health Perspect 116(2):249–255

Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky MG, and Kruh GD. (2003) MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2_,3_-dideoxycytidine and 9_-(2_-phosphonylmethoxyethyl) adenine. J Biol Chem 278: 29509–29514

Guzzi GP, La Porta CAM. (2008) Molecular mechanisms triggered by mercury. Toxicology 244:1–12

Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. Curr Drug Metab 5:21-53

Hamilton EI. (1994) The geobiochemistry of cobalt. Sci. Total Environ., 150: 7–39

Han SG, Castranova V, Vallyathan V. (2007) Comparative cytotoxicity of cadmium and mercury in a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) and its role in oxidative stress and induction of heat shock protein 70. J Toxicol Environ Health A. 70(10):852-60

Hartmann G, Cheung AK, Piquette-Miller M. (2002) Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. J Pharmacol Exp Ther. 303(1):273-81

Hartwig A, Gröblinghoff UD, Beyersmann D, Natarajan AT, Filon R, Mullenders LHF. (1997) Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. Carcinogenesis 18(2):399-405

Hartwig A. (2005a) Cadmium. in: RÖMPP Online, Version 3.3, Dokumentkennung RD-03-00035. http://www.roempp.com, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Hartwig A. (2005b) Cobalt. in: RÖMPP Online, Version 3.3, Dokumentkennung RD-03-02161. http://www.roempp.com, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y. (2003) Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 310:824–829

Healy SM, Wildfang E, Zakharyan RA, Aposhian HV. (1999) Diversity of inorganic arsenite biotransformation. Biol. Trace Elem. Res. 68: 249–66

Hengstler JG, Bolm-Audorff U, Faldum A, Janssen K, Reifenrath M, Götte W, Jung D, Mayer-Popken O, Fuchs J, Gebhard S, Bienfait HG, Schlink K, Dietrich C, Faust D, Epe B, Oesch F. (2003a) Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. Carcinogenesis 24(1):63–73

Hengstler JG, Bogdanffy MS, Bolt HM, Oesch F. (2003b) Challenging dogma: Thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate. Annu Rev Pharmacol Toxicol 43:485–520

Heyder J, Gebhart J, Rudolf G, Schiller CF, Stahlhofen W. (1986) Deposition of Particles in the human respiratory tract in the size-range 0.005-15 µm. J aerosol Sci 17:811-825

Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, . (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. Nature 323:448-450

Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, Sugimachi K, Kuwano M. (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. Clin Cancer Res 6: 2401–2407

Hirohashi T, Suzuki H, Ito K, Ogawa K, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. (1998) Hepatic expression of multidrug resistanceassociated protein-like proteins maintained in Eisai hyperbilirubinemic rats. Mol Pharmacol 53: 1068–1075

Hirsch-Ernst KI, Gaini-Rahimi S, Ernst BP, Schmitz-Salue C, Blume S, Kahl GF. (1998) Molecular cDNA cloning and tissue distribution of mRNA encoding a novel ATP-binding cassette (ABC) half-transporter. Biochem Biophys Res Commun 249: 151–155

Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD. (2001) Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. Cancer Lett 162: 181–191

Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, and Kruh GD. (2004) Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. Cancer Res 64: 4927–4930

Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, Kruh GD. (2004) Analysis of the drug resistance profile of MRP7 (ABCC10): resistance to docetaxel. Cancer Res 64: 4927–4930

Horiguchi H, Oguma E, Kayama F. (2006) Cadmium and cisplatin damage erythropoietin-producing proximal renal tubular cells. Arch Toxicol 80(10):680–686

Houwen RJ, Dijkstra M, Kuipers F, Smit EP, Havinga R, Vonk RJ. (1990) Two pathways for biliary copper excretion in the rat. Biochem Pharmacol 39 1039-1044

Hsu HY, Tsang SF, Lin KW, Yang SC, Lin CN. (2008) Cell death induced by flavonoid glycosides with and without copper. Food Chem Toxicol. 46(7):2394-401

Huang C, Bode AM, Chen NY, Ma WY, Li J. (2001) Transactivation of AP-1 in AP-1-luciferase reporter transgenic mice by arsenite and arsenate. Anticancer Res. 21:261–67

Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. (1999) Thiol and redox reactive agents exert different effects on glutathione metabolism in HeLa cell cultures. Clin Chim Acta. 283(1-2):21-32

Hursh JB, Greenwood MR, Clarkson TW, Allen J, Demuth S. (1980) The effect of ethanol on the fate of mercury vapor inhaled by man. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 214:520–527

IARC (1993a) Meeting of the IARC working group on beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. Scand. J. Work Environ. Health, 19: 360–363

IARC (1993b) Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing Industry. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 58. Lyon:119–237

IARC (2004a) Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, including Arsenic; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 84. Lyon: 39-45; http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol84/84-01-arsenic.html

IARC (2004b) Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 83. Lyon:83

IARC (2006a) Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 86. Lyon: 35-158

IARC (2006b) Inorganic and Organic Lead Compounds; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 87. Lyon: 1-529
http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/mono87.pdf

ICRP. (1994) Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. Ann ICRP 24:1-482

Ishikawa T. (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. Trends Biochem. Sci. 17(11):463–68

Ishikawa T, Wright CD, Ishizuka H. (1994) GS-X Pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. J. Biol. Chem. 269(46), 29085 – 29093

Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, Kuo MT. (1996) Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. J. Biol. Chem. 271(25), 14981–14988

Israel LM. (2006) Cadmium in: Olson KR (Hrsg.) Poisoning and Drug Overdose. 5. Aufl., International Edition, McGraw-Hill Education - Europe:140-141

Itoh K,Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, et al. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes Dev. 13:76–86

Jacquemin E. (2000) Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. Clin Liver Dis 4:753-763

Jalil YA, Ritz V, Jakimenko A, Schmitz-Salue C, Siebert H, Awuah D, Kotthaus A, Kietzmann T, Ziemann C, Hirsch-Ernst KI. (2008) Vesicular localization of the rat ATP-binding cassette half-transporter rAbcb6. Am J Physiol Cell Physiol. 294(2):C579-590

JECFA (1989) Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva, World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; Cambridge, Cambridge University Press, pp. 163–219 (WHO Food Additives Series No. 24)

JECFA (2003a): Methylmercury (ad-dendum); WHO Food Additives Series 52. http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v52je23.htm

JECFA (2003b) Summary and conclusions of the sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 16-18. World Health Organization, Geneva. ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa61sc.pdf

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. (1996) Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. Cancer Res 56:988–94

Jiang J, St. Croix CM, Sussman N, Zhao Q, Pitt BR, Kagan VE. (2002) Contribution of Glutathione and Metallothioneins to Protection against Copper Toxicity and Redox Cycling: Quantitative Analysis Using MT+/+ and MT-/- Mouse Lung Fibroblast Cells. Chem Res Toxicol. 15(8):1080-1087

Kachur AV, Koch CJ, Biaglow JE. (1998) Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. Free Radical Res., 28(3):259-269

Kala SV, Neely MW, Kala G, Prater CI, Atwood DW, Rice JS, Lieberman MW. (2000) The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic J. Biol. Chem. 275: 33404–33408

Kala SV, Kala G, Prater CI, Sartorelli AC, Lieberman MW. (2004) Formation and urinary excretion of arsenic triglutathione and methylarsenic diglutathione. Chem. Res. Toxicol. 17, 243–249

Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, Yamanishi Y. (2008) KEGG for linking genomes to life and the environment; Nucleic Acids Res. 36:480-484

Kao LW, Crosswell MJ, Weisz J. (1979) Steroid metabolism by the lung: conversion of dihydrotestosterone to 5 alpha-androstan-3 alpha, 17 beta-diol by rat lung tissue in vitro. Endocrinology 104(3):664–666

Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. (1996) Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin–Johnson syndrome. Hepatology. 23:1061–1066

Kasten U, Mullenders LHF, Hartwig A. (1997) Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. Mutat. Res. 383:81–89

Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S, Kuwano M. (1999) Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). FEBS Lett 456:327–331

Kawai H, Kiura K, Tabata M, Yoshino T, Takata I, Hiraki A, Chikamori K, Ueoka H,Tanimoto M, Harada M (2002). Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy. Lung Cancer (35) 305–314

Kawai K, Liu SX, Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Jiang JF, St. Croix CM, Fabisiak JP, Pitt BR, Kagan VE. (2000) Antioxidant and antiapoptotic function of metallothioneins in HL-60 cells challenged with copper nitrilotriacetate. Chem. Res. Toxicol. 13, 1275-1286

Kehe K, Reichl FX, Durner J, Walther U, Hickel R, Forth W. (2001) Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. Biomaterials. 22(4):317-322

Kelleher P, Pacheco K, Newman LS. (2000) Inorganic Dust Pneumonias: The Metal-Related Parenchymal Disorders. Environ Health Perspect. 108 Suppl 4: 685 - 696

Kennedy, T, Ghio AJ, Reed W, Samet J, Zagorski J., Quay J., Carter J., Dailey L., Hoidal J. R., Devlin R. B. (1998) Copper-dependent inflammation and nuclear factor-kB activation by particulate air pollution. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 19:366–378

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 26(4):239-57

Kikkawa Y. (1992) Diverse role of pulmonary cytochrome P-450 monooxygenase. Lab Invest 67:535-539

Kilburn KH. (1968) A hypothesis for pulmonary clearance and its implications. Am Rev Respir Dis 98:449–63

Kim DW, Kim KY, Choi BS, Youn P, Ryu DY, Klaassen CD, Park JD. (2007) Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. Arch Toxicol. 81:327–334

Kim SH, Bark H, Choi CH. (2005) Mercury induces multidrug resistance-associated protein gene through p38 mitogen-activated protein kinase. Toxicol Lett. 155(1):143-50

Klaassen, CD. (1978) Effect of metallothionein on hepatic disposition of metals. Am. J. Physiol. 234, E47–E53

Kojima C, Qu W, Waalkes MP, Himeno S, Sakurai T. (2006) Chronic exposure to methylated arsenicals stimulates arsenic excretion pathways and induces arsenic tolerance in rat liver cells. Toxicol Sci. 91(1): 70-81

Koller U. (2005) Feinstaub – Kleine Partikel mit großer Wirkung. www.gsf.de/flugs/Feinstaeube_2005_Flugs.pdf

König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. Biochim Biophys Acta. 1461:377–394

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJT, Juijn JA, Baas F, Borst P. (1997) 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. 57, 3537– 3547

Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P. (1999a) Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. Cancer Res 59:175–182

Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, Borst P. (1999b) MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. Proc Natl Acad Sci USA 96:6914–6919

Kopera E, Schwerdtle T, Hartwig A, Bal W. (2004) Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. Chem. Res. Toxicol. 17:1452–1458

Kosnett MJ. (2006) Arsenic. in: Olson KR (Hrsg.) Poisoning and Drug Overdose. 5. Aufl., International Edition, McGraw-Hill Education - Europe: 115-121

Kosnett MJ. (2006b) Lead. in: Olson KR (Hrsg.) Poisoning and Drug Overdose. 5. Aufl., International Edition, McGraw-Hill Education - Europe: 237-242

Kosnett MJ. (2006c) Mercury. in: Olson KR (Hg.) Poisoning and Drug Overdose. 5. Aufl., International Edition, McGraw-Hill Education - Europe, 253-258

Krause MS, Oliveira LP, Silveira EM, Vianna DR, Rossato JS, Almeida BS, Rodrigues MF, Fernandes AJ, Costa JA, Curi R, de Bittencourt PI. (2007) MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? Cell Biochem Funct. 25(1):23-32

Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, Wang J, Sosa-Pineda B, Murti KG, Schuetz JD. (2006) Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. Nature 443(7111):586-589

Kruh GD, Guo Y, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Chen ZS. (2007) ABCC10, ABCC11, and ABCC12. Pflugers Arch - Eur J Physiol 453:675–684

Ksiazek K, Winckiewicz M, Staniszewski R, Breborowicz A, Witowski J. (2007) Correlation between the donor age and the proliferative lifespan of human peritoneal mesothelial cells in vitro: is TGF-beta1 a link? Exp Gerontol. 42(8):840-3

Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. (2006) The real-time polymerase chain reaction, Molecular Aspects of Medicine 27:95–125

Kumagai Y., Sumi D. (2007) Arsenic: Signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2007. 47:243–62

La Fontaine S, Mercer JFB. (2007) Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. Arch. Biochem Biophys 463:149–167

Lai L, Tan TM. (2002) Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. Biochem J 361: 497–503

Lang T, Hitzl M, Burk O, Mornhinweg E, Keil A, Kerb R, Klein K, Zanger UM, Eichelbaum M, Fromm MF. (2004) Genetic polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver. Pharmacogenetics 14:155–164

Lange PS, Chavez JC, Pinto JT, Coppola G, Sun CW, Townes TM, Geschwind DH, Ratan RR. (2008) ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. J Exp Med 205(5):1227–1242

Lantz RC, Hays AM. (2006) Role of Oxidative Stress in Arsenic-Induced Toxicity. Drug Metab Rev. 38(4): 791-804

Lechner JF, La Veck MA. (1985) A serum free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal densitiy. J Tissue Cult Methods 9(2): 43-48

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

Lehmann T, Torky AR, Stehfest E, Hofmann S, Foth H. (2005) Expression of lung resistance-related protein, LRP, and multidrug resistance-related protein, MRP1, in normal human lung cells in long-term cultures. Arch Toxicol 79:600–609

Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. (1994) The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. J Biol Chem 269:27807–27810

Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. (1996) ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. Biochem J 314(Pt 2):433–437

Leitner HM, et al., (2007) Harnessing drug resistance: Using ABC transporter proteins to target cancer cells, Biochem Pharmacol doi:10.1016/j.bcp.2007.05.014

Leslie EM, Ito K, Upadhyaya P, Hecht SS, Deeley RG, Cole SPC. (2001) Transport of the β-O-glucuronide conjugate of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog. J Biol Chem 276: 27846–27854

Leslie EM, Haimeur A, Waalkes MP. (2004) Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1): Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. J. Biol. Chem. 279, 32700– 32708

LGL (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) (2006) Arsen in Algen. http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/arsen_in_algen.htm

Liedert B, Materna V, Schadendorf GL, Thomale J, Lage H. (2003) Overexpression of cMOAT(MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. Journal of Investigative Dermatology, 121, 172–176

Lilienblum W, Dekant W, Foth H, Gebel T, Hengstler JG, Kahl R, Kramer PJ, Schweinfurth H, Wollin KM. (2008) Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). Arch Toxicol 82(4):211–236

Lison D, Buchet JP, Swennen B, Molders J, Lauwerys R. (1994) Biological monitoring of workers exposed to cobalt metal, salt, oxides, and hard metal dust. Occup. Environ. Med., 51:447–450

Lison D, Carbonnelle P, Mollo L, Lauwerys R, Fubini B. (1995) Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. Chem. Res. Toxicol. 8:600–606

Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, Klaassen CD, Waalkes MP. (2001) Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. Mol. Pharmacol. 60, 302–309

Liu J, Lei D, Waalkes MP, Beliles RP, Morgan DL. (2003) Genomic analysis of the rat lung following elemental mercury vapor exposure. Toxicol Sci. 74(1):174-81

Liu ZM, Huang HS. (2008) Inhibitory role of TGIF in the As2O3-regulated p21 WAF1/CIP1 expression. J Biomed Sci 15(3):333–342

Lockhart PJ, Mercer JFB. (2001) Functional analysis of the sheep Wilson disease protein (sATP7B) in CHO cells. Eur. J. Cell Biol. 80, 349–357

Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SPC. (1996) Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. J Biol Chem 271:9675–9682

Loe DW, Stewart RK, Massey TE, Deeley RG, Cole SPC. (1997) ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. Mol Pharmacol 51: 1034–1041

Loe DW, Deeley RG, Cole SP. (1998) Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. Cancer Res 58:5130–5136

Löffler G, Petrides PE. (Hrsg.) (2003) Biochemie und Pathobiochemie. Kapitel 24.2.2: Kupfer, 7, völlig neu bearbeitete Auflage. Springer Verlag, Heidelberg. 709-713

Lorico A, Rappa G, Flavell RA, Sartorelli AC. (1996) Double knockout of the MRP gene leads to increased drug sensitivity in vitro. Cancer Res. 56, 5351-5355

Lorico A, Rappa G, Finch RA, Yang D, Flavell RA, Sartorelli AC. (1997) Disruption of the Murine MRP (Multidrug Resistance Protein) Gene Leads to Increased Sensitivity to Etoposide (VP-16) and Increased Levels of Glutathione. Cancer Res. 57:5238–42

Lorico A, Bertola A, Baum C, Fodstad O, Rappa G. (2002) Role of the multidrug resistance protein 1 in protection from heavy metal oxyanions: investigations in vitro and in MRP1-deficient mice. Biochemical and Biophysical Research Communications 291, 617–622

Löscher W, Potschka H. (2005) Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. Nat Rev Neurosci 6:591-602

Ma Y, Cao L, Kawabata T, Yoshino T, Yang BB, Okada S. (1998) Cupric nitrilotriacetate induces oxidative DNA damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells. Free Radic Biol Med. 25(4-5):568-75

Mah V, Jalilehvand F. (2008) Mercury(II) complex formation with glutathione in alkaline aqueous solution. J Biol Inorg Chem. 13(4):541-53

Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. (2005) Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. Drug Metab Dispos 33(7):956–962

Majumder S, Dutta P, Mookerjee A, Choudhuri SK. (2006) The role of a novel copper complex in overcoming doxorubicin resistance in Ehrlich ascites carcinoma cells in vivo. Chem Biol Interact. 159(2):90-103

Manautou JE, de Waart DR, Kunne C, Zelcer N, Goedken M, Borst P, Elferink RO. (2005) Altered disposition of acetaminophen in mice with a disruption of the Mrp3 gene. Hepatology 42:1091– 1098

Martinez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del RT, Dean M, Vilageliu L, Gonzalez-Duarte R, Balcells S. (1998) Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. Nat Genet 18:11-12

Materna V, Pleger J, Hoffmann U, Lage H. (2004) RNA expression of MDR1/P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response. Gynecol Oncol 94:152–160

McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N. (1999) pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. J Biol Chem 274:23541–23548

Mead MN. (2005) Arsenic - In search of an antidote to a global poison. Environ Heath Perspect. 113(6): 378-386

Medinsky MA, Bond JA. (2001) Sites and mechanisms for uptake of gases and vapors in the respiratory tract. Toxicology 160:165-172

Mitsuhashi N, Miki T, Senbongi H, Yokoi N, Yano H, Miyazakii M, Nakajimai N, Iwanaga T, Yokoyama Y, Shibata T, Seino S. (2000) MTABC3, a Novel Mitochondrial ATP-binding Cassette Protein Involved in Iron Homeostasis. J. Biol. Chem. 275(23): 17536-17540

Mourón SA, Grillo CA, Dulout FN, Golijow CD. (2006) Induction of DNA strand breaks, DNA-protein crosslinks and sister chromatid exchanges by arsenite in a human lung cell line. Toxicol In Vitro 20(3):279-85

Nampoothiri LP, Agarwal A, Gupta S. (2007) Effect of co-exposure to lead and cadmium on antioxidant status in rat ovarian granulose cells. Arch Toxicol 81(3):145–150

Nies AT, Cantz T, Brom M, Leier I, Keppler D. (1998) Expression of the apical conjugate export pump, Mrp2, in the polarized hepatoma cell line, WIF-B. Hepatology 28:1332–1340

Nies AT, Jedlitschky G, Konig J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D. (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. Neuroscience 129:349–360

Norman BH, Gruber JM, Hollinshead SP, Wilson JW, Starling JJ, Law KL, Self TD, Tabas LB, Williams DC, Paul DC, Wagner MM, and Dantzig AH. (2002) Tricyclic isoxazoles are novel inhibitors of the multidrug resistance protein (MRP1). Bioorg Med Chem Lett 12: 883–886

Norman BH, Lander PA, Gruber JM, Kroin JS, Cohen JD, Jungheim LN, Starling JJ, Law KL, Self TD, Tabas LB, Williams DC, Paul DC, and Dantzig AH. (2005) Cyclohexyl-linked tricyclic isoxazoles are potent and selective modulators of the multidrug resistance protein (MRP1). Bioorg Med Chem Lett 15: 5526–5530

Norris MD, Smith J, Tanabe K, Tobin P, Flemming C, Scheffer GL, Wielinga P, Cohn SL, London WB, Marshall GM, Allen JD, Haber M. (2005) Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. Mol. Cancer Ther. 4: 547–553

NVS (1994) Lebensmitttel- und Nährstoffaufnahme Erwachsener in der Bundesrepublik Deutschland. In: VERA-Schriftenreihe, Band III. W Kübler, HJ Anders, W Heeschen, M Kohlmeier (Hrsg.) Zweite, überarbeitete Auflage. Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. Fleck, Niederkleen.

Oguri T, Isobe T, Fujitaka K, Ishikawa N, Kohno N (2001) Association between expression of the MRP3 gene and exposure to platinum drugs in lung cancer. Int. J. Cancer: 93, 584–589

Ohishi Y, Oda Y, Uchiumi T, Kobayashi H, Hirakawa T, Miyamoto S, Kinukawa N, Nakano H, Kuwano M, Tsuneyoshi M. (2002) ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. Clin Cancer Res 8: 3767– 3775

Olive PL, Banath JP. (1993) Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: ”tail moment” as a function of position in the cell cycle. Mutation Research 294: 275-283

Olivieri G, Brack C, Müller-Spahn F, Stähelin HB, Herrmann M, Renard P, Brockhaus M, Hock C. (2000) Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. J Neurochem. 74(1):231-236

Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. EMBO J 11: 3491–3499

Oude Elferink RP, Meijer DK, Kuipers F, Jansen PL, Groen AK, Groothuis GM. (1995) Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. Biochim Biophys Acta. 1241:215–268

Ozvegy C, Litman T, Szakacs G, Nagy Z, Bates S, Varadi A, Sarkadi B. (2001) Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. Biochem Biophys Res Commun 285:111-117

Pagan I, Costa DL, McGee JK, Richards JH, Dye JA. (2003) Metals mimic airway epithelial injury induced by in vitro exposure to Utah Valley ambient particulate matter extracts. J Toxicol Environ Health A. 66(12):1087-112

Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, and Oude Elferink RP. (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. Science 271:1126–1128

Paulusma CC, Oude Elferink RPJ. (1997) The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. J Mol Med. 75:420–428

Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P, Oude Elferink RP. (1999) Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. Biochem. J. 338: 393–401

Pinte S, Stankovic-Valentin N, Deltour S, Rood BR, Guérardel C, Leprince D. (2004) The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: Definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. J Biol Chem 279(37):38313–38324

Pinto SS, Varner MO, Nelson KW, Labbe AL, White LD. (1976) Arsenic trioxide absorption and excretion in industry. J Occup Med, 18: 677–680

Pomroy C, Charbonneau SM, McCullough RS, Tam GKH. (1980) Human retention studies with $^{74}$As. Toxicol Appl Pharm, 53: 550–556

Poot M. (2001) Analysis of intracellular organelles by flow cytometry or microscopy. Curr Protoc Cytom. Chapter 9, Unit 9.4.

Pratt S, Chen V, Perry WI 3rd, Starling JJ, Dantzig AH. (2006) Kinetic validation of the use of carboxydichlorofluorescein as a drug surrogate for MRP5-mediated transport. Eur J Pharm Sci. 27(5):524-32

Pratt S, Shepard RL, Kandasamy RA, Johnston PA, Perry W, Dantzig AH. (2005) The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. Mol Cancer Ther 4:855–863

Prozialeck WC, Lamar PC. (1999) Interaction of cadmium (Cd2+) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. Biochim Biophys Acta 1451:93–100

Qian YM, Song WC, Cui H, Cole SP, Deeley RG. (2001) Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. J Biol Chem 276:6404–6411

Qian YM, Grant CE, Westlake CJ, Zhang DW, Lander PA, Shepard RL, Dantzig AH, Cole SPC, Deeley RG. (2002) Photolabeling of human and murine multidrug resistance protein 1 with the high affinity inhibitor [125I]LY475776 and azidophenacyl-[35S]glutathione. J Biol Chem 277: 35225–35231

Rajagopal A, Simon SM. (2003) Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. Mol Biol Cell 14:3389–3399

Ralph (2008) Arsenic-based antineoplastic drugs and their mechanisms of action. Metal-Based Drugs 2008, Article ID 260146, doi:10.1155/2008/260146

Rappa G, Lorico A, Flavell RA, Sartorelli AC. (1997) Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. Cancer Res. 57, 5232–5237

Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Pelkonen O, Edwards R, Boobis A, Anttila S. (1998) Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human pulmonary tissues. Arch Toxicol Suppl 20:465-9.:465-469

Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J, Borst P. (2003) The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 9244–9249

Riley MR, Boesewetter DE, Turner RA, Kim AM, Collier JM, Hamilton A. (2005) Comparison of the sensitivity of three lung derived cell lines to metals from combustion derived particulate matter. Toxicology in Vitro 19(3): 411-419

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, . (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245:1066-1073

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 245: 154–160

Ritter D, Knebel JW, Aufderheide M. (2003) Exposure of human lung cells to inhalable substances: A novel test strategy involving clean air exposure periods usind whole dilute cigarette mainstream smoke. Inhalation Toxicology 15: 67-84

Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. (2003) Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. Hepatology 38: 374–384

Robbiani DF, Finch RA, Jager D, Muller WA, Sartorelli AC, and Randolph GJ. (2000) The leukotriene C4 transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3_, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. Cell 103: 757–768

Roelofsen H, Vos TA, Schippers IJ, Kuipers F, Koning H, Moshage H, Jansen PL, Muller M. (1997) Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hephatocyte-derived cells. Gastroenterology 112:511–521

Ros JE, Libbrecht L, Geuken M, Jansen PL, Roskams TA. (2003) High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. J Pathol 200:553–560

Runge DM, Stock TW, Lehmann T, Taege C, Bernauer U, Stolz DB, Hofmann S, Foth H. (2001) Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol culture. Arch Tox 75(6):335-345

Rustemeier K, Stabbert R, Haussmann HJ, Roemer E, Carmines EL. (2002) Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke Food and Chemical Toxicology 40: 93–104

Rychlik B, Pulaski L, Sokal A, Soszynski M, Bartosz G. (2000) Transport of organic anions by multidrug resistance-associated protein in the erythrocyte. Acta Biochim Pol. 47(3):763-72. Review

Salerno M, Petroutsa M, Garnier-Suillerot A. (2002) The MRP1- mediated effluxes of arsenic and antimony do not require arsenic– glutathione and antimony–glutathione complex formation. J. Bioenerg. Biomembr. 34, 135– 145

Sambrook J, Russel DW. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sandusky GE, Mintze KS, Pratt SE, Dantzig AH. (2002) Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays. Histopathology 41:65–74

Saravana Devi S, Vinayagamoorthy N, Agrawal M, Biswas A, Biswas R, Naoghare P, Kumbhakar S, Krishnamurthi K, Hengstler JG, Hermes M, Chakrabarti T. (2008) Distribution of detoxifying genes polymorphism in Maharastrian population of central India. Chemosphere 70(10):1835–1839

Schäfer SG, Elsenhans B, Forth W, Schümann K. (2004a) Quecksilber. In: Marquardt, Hans; Schäfer, Siegfried G. (Hrsg.) Lehrbuch der Toxikologie. 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 794-799

Schäfer SG, Elsenhans B, Forth W, Schümann K. (2004b) Arsen. In: Marquardt, Hans; Schäfer, Siegfried G. (Hrsg.) Lehrbuch der Toxikologie. 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 768-773

Schaumlöffel N, Gebel T. (1998) Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. Mutagenesis (3):281-6

Scheffer GL, Pijnenborg, AC, Smit, EF, Muller M., Postma DS, Timens W, van der Valk P, de Vries EGE, Scheper RJ. (2002a) Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. J. Clin. Pathol. 55, 332–339

Scheffer GL, Hu X, Pijnenborg ACLM, Wijnholds J, Bergen AAB, Scheper RJ. (2002b) MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. Lab. Invest., 82, 515-518

Schild-Poulter C, Shih A, Tantin D, Yarymowich NC, Soubeyrand S, Sharp PA, Haché RJ. (2007) DNA-PK phosphorylation sites on Oct-1 promote cell survival following DNA damage. Oncogene 26(27):3980–3988

Schmidt CM, Cheng CN, Marino A, Konsoula R, Barile FA. (2004) Hormesis effect of trace metals on cultured normal and immortal human mammary cells. Toxicol Ind Health. 20(1-5):57-68

Schoen A, Beck B, Sharma R, Dube E. (2004) Arsenic toxicity at low doses: epidemiological and mode of action considerations Toxicol Appl Pharmacol 198:253–267

Schrenk D, Baus PR, Ermel N, Klein C, Vorderstemann B, Kauffmann HM. (2001) Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins Toxicol. Lett. 120:51–57

Schuller HM, Falzon M, Gazdar AF, Hegedus T. (1987) Cell type-specific differences in metabolic activation of N-nitrosodiethylamine by human lung cancer cell lines. IARC Sci Publ. (84):138-40

Schultz MJ, Wijnholds J, Peppelenbosch MP, Vervoordeldonk MJ, Speelman P, van Deventer SJ, Borst P, and van der Poll T. (2001) Mice lacking the multidrug resistance protein 1 are resistant to Streptococcus pneumoniae-induced pneumonia. J Immunol 166: 4059–4064

Schulz T, Schumacher U, Prehm P. (2007) Hyaluronan Export by the ABC Transporter MRP5 and Its Modulation by Intracellular cGMP. J. Biol. Chem. 282: 20999–21004

Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempfl T, Schmalz G. (2008) Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. Biomaterials 29(10):1377–1387

Schwerdtle T, Walter I, Mackiw I, Hartwig A. (2003) Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. Carcinogenesis 24: 967–974

Scott N, Hatlelid KM, MacKenzie NE, Carter DE. (1993) Reactions of Arsenic(III) and Arsenic(V) Species with Glutathione. Chem Res Toxicol 6, 102-106

Seagrave JC, Dunaway S, McDonald, JD, Mauderly JL, Hayden P, Stidley C. (2007) Responses of differentiated primary human lung epithelial cells to exposure to diesel exhaust at an air-liquid interface. Experimental Lung Research 33(1):27-51

Sekido R, Lovell-Badge R. (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. Nature 453(7197):930-934

Sheline CT, Choi DW. (2004) Cu2+ toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. Ann Neurol. 55(5):645-53

Shen DW, Goldenberg S, Pastan I, Gottesman MM. (2000) Decreased accumulation of [14C]Carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. J Cell Phys 183:108–116

Shepard RL, Cao J, Starling JJ, Dantzig AH. (2003) Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. Int J Cancer 103: 121–125

Shibutani M, Takahashi N, Kobayashi T, Uneyama C, Masutomi N, Nishikawa A, Hirose M. (2002) Molecular profiling of genes up-regulated during promotion by phenobarbital treatment in a medium-term rat liver bioassay. Carcinogenesis 23(6):1047-1055

Shirabe T. (1979) Identification of mercury in the brain of Minamata disease victims by electron microscopic X-ray microanalysis. Neurotoxicology 1:349–356

Spangenberg C, Lausch EU, Trost TM, Prawitt D, May A, Keppler R, Fees SA, Reutzel D, Bell C, Schmitt S, Schiffer IB, Weber A, Brenner W, Hermes M, Sahin U, Tureci O, Koelbl H, Hengstler JG, Zabel BU. (2006) ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin Wbronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. Cancer Res 66(7):3715–3725

St. Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ, and Marin JJ. (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 279: R1495–R1503

St. Pierre MV, Stallmach T, Freimoser Grundschober A, Dufour JF, Serrano MA, Marin JJ, Sugiyama Y, Meier PJ. (2004) Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287:R1505–R1516

Stehfest E, Torky AR, Glahn F, Foth H. (2005) Non destructive micromethod for MRP1 functional assay in human lung tumor cells. Arch Toxicol 80(3):125–133

Steinbach D, Wittig S, Cario G, Viehmann S, Mueller A, Gruhn B, Haefer R, Zintl F, Sauerbrey A. (2003) The multidrug resistanceassociated protein 3 (MRP3) is associated with a poor outcome in childhood ALL and may account for the worse prognosis in male patients and T-cell immunophenotype. Blood 102: 4493–4498

Stock T. (2002) Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen und ihre toxikologische Anwendungsprüfung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Styblo M., Del Razo, LM., Vega, L., Germolec, DR., LeCluyse, EL., Hamilton, GA., Reed, W., Wang, C., Cullen, WR., Thomas DJ. (1995) Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells, Arch. Toxicol. 74 (6) 289–299

Sugawara N, Lai YR, Sugaware C, Arizono K. (1998) Decreased hepatobiliary secretion of inorganic mercury, its deposition and toxicity in the Eisai hyperbilirubinemic rat with no hepatic canalicular organic anion transporter. Toxicology 126, 23–31

Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. (2003) Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. Exp Cell Res. 286:355–365

Tammur J, Prades C, Arnould I, Rzhetsky A, Hutchinson A, Adachi M, Schuetz JD, Swoboda KJ, Ptacek LJ, Rosier M, Dean M, Allikmets R. (2001) Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. Gene 273:89–96

Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M. (1996) A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. Cancer Research, 56, 4124–4129

Telisman S, Colak B, Pizent A, Jurasovic J, Cvitkovic P. (2007) Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. Environ Res 105(2):256–266

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A & Heinen E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. Journal of Biotechnology 75; 291–295

Thompson J, Bannigan J. (2008) Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. Reprod Toxicol 25(3):304–315

Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino T, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S, Kuwano M. (1999) Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. Amer. J. Hum. Genet. 64:739-746

Torky AR, Foth H. (2007) Quecksilber. In: Dunkelberg H, Gebel T, Hartwig A (Hg.) Handbuch der Lebensmitteltoxikologie Band 2. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 803-850

Toyoda Y, Hagiya, Y, Adachi, T, Hoshijima K, Kuo MT, Ishikawa T. (2008) MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. Xenobiotica 38:7,833-862

Trost TM, Lausch EU, Fees SA, Schmitt S, Enklaar T, Reutzel D, Brixel LR, Schmidtke P, Maringer M, Schiffer IB, Heimerdinger CK, Hengstler JG, Fritz G, Bockamp EO, Prawitt D, Zabel BU, Spangenberg C. (2005) Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. Cancer Res 65:840–849

Tsujii H, König J, Rost D, Stöckel B, Leuschner U, Keppler D. (1999) Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. Gastroenterology. 117:653-660

Urani C, Calini V, Melchioretto P, Morazzoni F, Canevali C, Camatini M. (2003) Different induction of metallothioneins and Hsp70 and presence of the membrane transporter ZnT-1 in HepG2 cells exposed to copper and zinc. Toxicol In Vitro. 17(5-6):553-9

van Aubel R A, Smeets PH, van den Heuvel JJ, Russel FG. (2005) Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 288: F327–333

Van Luyn MJ, Muller M, Renes J, Meijer C, Scheper RJ, Nienhuis EF, Mulder NH, Jansen PL, De Vries EG. (1998) Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1. Int J Cancer 76:55–62

Vernhet L, Courtois A, Payen L, Allain N, Anger JP, Guillouzo A, Fardel O. (1999) Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in human heavy metal-selected tumor cells. FEBS Lett. 443, 321–325

Vernhet L, Allain N, Bardiau C, Anger JP, Fardel O. (2000) Differential sensitivities of MRP1-overexpressing lung tumor cells to cytotoxic metals. Toxicology142:127–34

Vernhet L, Allain N, Payen L, Anger JP, Guillouzo A, and Fardel O. (2001a) Resistance of human multidrug resistance-associated protein 1-overexpressing lung tumor cells to the anticancer drug arsenic trioxide. Biochem Pharmacol 61:1387–1391

Vernhet L, Séité MP, Allain N, Guillouzo A, Fardel O. (2001b) Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes J. Pharmacol. Exp. Ther. 298: 234–239

Vielkind U, Swierenda SH. (1989) A simple fixation procedure for immunofluorescent detection of different cytoskeletal components within the same cell, Histochemistry 91:81-88

Visapää I, Fellman V, Lanyi L, Peltonen L. (2002) ABCB6 (MTABC3) excluded as the causative gene for the growth retardation syndrome with aminoaciduria, cholestasis, iron overload, and lactacidosis. Am J Med Genet. 109(3):202-5

Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J. (2006) Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. Biochem. J. 395:599–609

Walter I, Schwerdtle T, Thuy C, Parsons JL, Dianov GL, Hartwig A. (2007) Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene expression and poly(ADP-ribosyl)ation in cultured human cells. DNA Repair (Amst) 6(1):61-70

Wang TC, Jan KY, Wang ASS, Gurr JR. (2007) Trivalent arsenicals induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA damage in human urothelial cells. Mutation Research 615:75–86

Wang XJ, Sun Z, Chen W, Li Y, Villeneuve NF, Zhang DD. (2008) Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1–Cul3 interaction. Toxicol Appl Pharmacol 230: 383–389

Westlake CJ, Cole SP, Deeley RG. (2005) Role of the NH2-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. Mol Biol Cell 16:2483–2492

WHO (1983) Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants; Technical Report Series 696; WHO. Genf

WHO (2001) Fact sheet N°210 Arsenic in drinking water.
http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/print.html

WHO (2003) Concise international chemical assessment document 50, Elemental mercury and inorganic mercury compounds : human health aspects. Genf. ISBN 92 4 153050 2

WHO (2004) Cadmium in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH/03.04/80

Wiebel FJ. Kiefer F, Krupski G, Schuller HM. (1986) Expression of glutathione S-transferase and phenol sulfotransferase, but not of UDP-glucuronosyltransferase, in the human lung tumor cell lines NCI-H322 and NCI-H358. Biochem Pharmacol. 35(8):1337-43

Wierstra I. (2008) Sp1: Emerging roles - Beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. Biochem Biophys Res Commun. 372:1-13

Wijmenga C, Klomp LW. (2004) Molecular regulation of copper excretion in the liver. Proc Nutr Soc. 63(1):31-39

Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, and Borst P. (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistanceassociated protein. Nat Med 3: 1275–1279

Wijnholds J, Scheffer GL, van der Valk M, van der Valk P, Beijnen JH, Scheper RJ, and Borst P. (1998) Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage. J Exp Med 188: 797–808

Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P. (2000) Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. Proc Natl Acad Sci USA 97: 7476–7481

Wiklund SJ, Agurell E. (2003) Aspects of design and statistical analysis in the COMET assay. Mutagenesis. 18: 167-75

Wioland MA, Fleury-Feith J, Corlieu P, Commo F, Monceaux G, Lacau-St-Guily J, Bernaudin JF. (2000) CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. J Histochem Cytochem 48:1215–1222

Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi S, Ishikawa T. (2001) Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. Biochem Biophys Res Commun 288:933–939

Yabuuchi H, Takayanagi S, Yoshinaga K, Taniguchi N, Aburatani H, and Ishikawa T. (2002) ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver. Biochem Biophys Res Commun 299: 410–417

Yang A, Cardona DL, Barile FA. (2002) Subacute cytotoxicity testing with cultured human lung cells. Toxicology in Vitro 16(1): 33-39

Yang ZF, Mott S, Rosmarin AG. (2007) The Ets transcription factor GABP is required for cell-cycle progression. Nat Cell Biol 9(3):339–346

Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, Tomida A, Funato T, Yokomizo A, Naito S, Imoto I, Tsuruo T, Inazawa J. (2004) Alteration in Copy Numbers of Genes as a Mechanism for Acquired Drug Resistance. Cancer Research. 64(4):1403-1410

Yih LH, Lee TC. (2000) Arsenite induces p53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts. Cancer Res 60(22):6346-52

Yoshida M, Satoh M, Shimada A, Yasutake A, Sumi Y, Tohyama C. (1999) Pulmonary toxicity caused by acute exposure to mercury vapor is enhanced in metallothionein-null mice. Life Sci. 64, 1861–1867

Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T, Cole SPC, Deeley RG, Gerlach JH. (1999) Expression of Multidrug Resistance Protein-related Genes in Lung Cancer: Correlation with Drug Response. Clin. Cancer Res. 5:673–680

Zaman GJ, Lankelma J, van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, et al. (1995) Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. Proc Natl Acad Sci U S A 92:7690–7694

Zamek-Gliszczynski MJ, Xiong H, Patel NJ, Turncliff RZ, Pollack GM, and Brouwer KLR. (2003) Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2′,7′-dichlorofluorescein and its diacetate promoiety in the liver. J Pharmacol Exp Ther 304: 801–809

Zelcer N, Saeki T, Reid G, Beijnen JH, Borst P. (2001) Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). J Biol Chem 276:46400–46407

Zelcer N, van de Wetering K, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, Wielinga PR, Tephly T, Dahan A, Beijnen JH, Borst P. (2005) Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. Proc Natl Acad Sci USA 102:7274–7279

Zhang HM, Li L, Papadopoulou N, Hodgson G, Evans E, Galbraith M, Dear M, Vougier S, Saxton J, Shaw PE. (2008) Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1. Nucleic Acids Res 36(8):2594–2607

Zhu Q, Center MS. (1996) Evidence that SP1 modulates transcriptional activity of the multidrug resistance-associated protein gene. DNA Cell Biol 15:105–111

# 7 Anhang

**Verweise auf Abbildungen und Tabellen im Anhang sind mit (Anh.) gekennzeichnet.**

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1 Deposition von Partikeln mit dae = 1 µm im Respirationstrakt eines durch die Nase atmenden Mannes. Bei einer Flussrate von 250 cm3/s und einer Atemzugdauer von 8s (Heyder et al., 1986) 3
Abb. 2 Der Transport unterschiedlicher Substrate durch MRP-Proteine 8
Abb. 3 Mögliche Topologie der MRP-Transporter. Die Abbildung basiert auf den Simulationen durch verschiedene computergestützte Modelle (Deeley et al., 2006) 8
Abb. 4 Bestimmung der DNA-Schädigung im Comet-Assay. 40
Abb. 5 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von H322 Zellen. 42
Abb. 6 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von normalen humanen Bronchialepithelzellen. 42
Abb. 7 Relative Expression der 18S rRNA und der GAPDH-mRNA in Primärkulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patienten B182 und B201) im Verlauf der Experimente. 44
Abb. 8 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patienten B182 und B201). 45
Abb. 9 Immunhistochemischer Nachweis von MRP1 in Kulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen B248/3/I auf Deckgläschen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. 46
Abb. 10 Immunhistochemischer Nachweis von MRP1 in Kulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen B248/3/I auf PET-Membranen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. 47
Abb. 11 Die Morphologie von normalen humanen Bronchialepithelzellen auf verschiedenen Kulturmaterialien. 48
Abb. 12 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) über 24 h. 49
Abb. 13 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) über 5 Tage. 50
Abb. 14 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) über 24 h. 51
Abb. 15 Der Transport von CDF durch MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) über 24 h, 3 und 5 Tage. 53
Abb. 16 Genotoxizität von As(III) im Comet-Assay an H322 Zellen nach Inkubation über 24 h. 54
Abb. 17 Genotoxizität von As(III) im Comet-Assay an H322 Zellen nach Inkubation über 5 d. 55
Abb. 18 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patient 242/3/II) nach Inkubation mit As(III) über 24 h. 56
Abb. 19 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patient 246/3/I) nach Inkubation mit As(III) über 24 h. 57
Abb. 20 Schematischer Ablauf der Langzeitversuche mit Arsenit an normalen humanen Bronchialepithelzellen. 58
Abb. 21 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach Inkubation mit As(III) über 5 Tage. 60
Abb. 22 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach der zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III). 61

Abb. 23 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B182) nach der ersten und zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III). 62
Abb. 24 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B201) nach der dritten fünftägigen Inkubation mit As(III). 63
Abb. 25 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B201) nach der vierten fünftägigen Inkubation mit As(III). 64
Abb. 26 Die Kulturen von B182 nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Arsenit. 65
Abb. 27 Vergleich der Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patient 222/6/I) mit und ohne Vorbehandlung mit Arsenit (6x 5 Tage) nach Inkubation mit As(III) über 67 h. 66
Abb. 28 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit Cu(II) über 24 h. 67
Abb. 29 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit Cu(II) über 72 h. 68
Abb. 30 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter und UMAT in H322 Zellen nach Inkubation mit Cu(II) über 24 h. 69
Abb. 31 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter und UMAT in H322 Zellen nach Inkubation mit Cu(II) über 7 Tage. 70
Abb. 32 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patient B253/3/I) nach Inkubation mit Cu(II) über 24 h. 71
Abb. 33 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen (B146/1/I) nach Inkubation mit Cu(II) über 24 h. 72
Abb. 34 Schematischer Ablauf der Langzeitversuche mit Cu(II) an normalen humanen Bronchialepithelzellen. 72
Abb. 35 Zusammenfassung der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B182, B201 und B222) nach der ersten und zweiten Inkubation mit Cu(II) über 5 Tage. 74
Abb. 36 Die Kulturen von B182 nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Cu(II). 75
Abb. 37 Die Vitalität von H322 Zellen nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h. 76
Abb. 38 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h. 77
Abb. 39 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter und UMAT in H322 Zellen nach Inkubation mit Hg(II) über 72 h. 78
Abb. 40 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit Hg(II) über 7 Tage. 79
Abb. 41 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen (Patienten B244 und B246) nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h. 80
Abb. 42 Die relative Expression der mRNA der ABC-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B146, B162 und B242) nach Inkubation mit Hg(II) über 24 h. 82
Abb. 43 Schematischer Ablauf der Langzeitversuche mit Hg(II) an normalen humanen Bronchialepithelzellen. 83
Abb. 44 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B182, B201 und B222) nach Inkubation mit Hg(II) über 5 d. 85
Abb. 45 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach der zweiten Inkubation mit Hg(II) über 5 d. 86
Abb. 46 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B201) nach der ersten und der zweiten fünftägigen Inkubation mit Hg(II). 87

Abb. 47 Die Kulturen von B182 nach der sechsten fünftägigen Behandlung mit Hg(II). 88
Abb. 48 Die Vitalität von normalen humanen Bronchialepithelzellen nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) über drei Tage. 90
Abb. 49 Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage. 92
Abb. 50 Schematischen Darstellung der Gene des Glutathionhaushalts, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren, mittels KEGG Pathway. 93
Abb. 51 Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, und B218) nach Inkubation entweder mit Cd(II), Co(II) oder Pb(II) über drei Tage. 95
Abb. 52 Hauptkomponentenanalyse basierend auf jeweils zwei der ersten drei Hauptkomponenten der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage. 170
Abb. 53 Erklärte Varianz durch die einzelnen Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage. 171
Abb. 54 Schematischen Darstellung der Gene des Pyrimidinmetabolismus, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination in NHBE-Zellen moduliert waren, mittels KEGG Pathway. 179
Abb. 55 Schematischen Darstellung der Gene des Purinmetabolismus, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination in NHBE-Zellen moduliert waren, mittels KEGG Pathway. 181
Abb. 56 Schematischen Darstellung der Gene der Steroidbiosynthese, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren, mittels KEGG Pathway. 182
Abb. 57 Schematischen Darstellung der Cytochrom P450 Enzyme, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren, mittels KEGG Pathway. 184
Abb. 58 Hauptkomponentenanalyse basierend auf jeweils zwei der ersten drei Hauptkomponenten der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215 und B218) nach Inkubation entweder mit Cd(II), Co(II) oder Pb(II) für drei Tage. 187
Abb. 59 Erklärte Varianz durch die einzelnen Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215 und B218) nach Inkubation entweder mit Cd(II), Co(II) oder Pb(II) für drei Tage. 188

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1 Humane MRP-Transporter 7
Tab. 2 Physikalisch-chemische Eigenschaften und Einstufungen der eingesetzten Metalle: 15
Tab. 3 Primersequenzen für die *Real-time* PCR. 34
Tab. 4 Übersicht über die für die Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper 37
Tab. 5 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen des Langzeitexperiments nach der zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III). 62
Tab. 6 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen des Langzeitexperiments nach der dritten fünftägigen Inkubation mit As(III). 63
Tab. 7 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen des Langzeitexperiments nach der vierten fünftägigen Inkubation mit As(III). 64
Tab. 8 Gene des Glutathionhaushalts, die nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren. 93
Tab. 9 Daten der Patienten deren Gewebe in der vorliegenden Arbeit zur Gewinnung von NHBE-Zellen genutzt wurde. 155
Tab. 10 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen der Langzeitversuche mit Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patienten B182 und B201) im Verlauf der Experimente. 156
Tab. 11 Expression von MRP1 bis 5 sowie GAPDH und 18S rRNA in H322 nach Inkubation mit As(III) für (24 h). 156
Tab. 12 Der Transport von CDF durch MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) für 24 h, drei und fünf Tage mit und ohne Zugabe von MK571 (5 mg/l). 157
Tab. 13 Relative Expression der GAPDH-mRNA und der 18S rRNA in den Langzeitexperimenten mit Arsenit an Primärkulturen von NHBE-Zellen (B182, B201). 157
Tab. 14 Relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182, B201) nach Inkubation mit As(III) über 5 Tage. 158
Tab. 15 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach der zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III). 158
Tab. 16 Die Relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen (Patient B201) nach der dritten fünftägigen Inkubation mit As(III). 159
Tab. 17 Die Relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen (Patient B201) nach der vierten fünftägigen Inkubation mit As(III). 159
Tab. 18 Relative Expression der mRNA von MRP-Transportern, UMAT und GAPDH in H322 nach Inkubation mit Cu(II) (24 h). 159
Tab. 19 Relative Expression der MRP-und UMAT-mRNA in H322 nach Inkubation mit Cu(II) über 7 Tage. 160
Tab. 20 Relative Expression von MRP1, 3 und 5 in B146/1/I nach Inkubation mit Cu(II) (24 h). 160
Tab. 21 Relative Expression der GAPDH-mRNA und der 18S rRNA in den Langzeitexperimenten mit Cu(II) an NHBE-Zellen (Patienten B182, B201 und B222). 160
Tab. 22 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B182, B201und B222) nach Inkubation mit Cu(II) über 5 Tage. 161
Tab. 23 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach zweimaliger Inkubation mit Cu(II) über jeweils 5 Tage. 162
Tab. 24 Relative Expression der MRP-mRNA in H322 nach Inkubation mit Hg(II) (24 h). 162

Tab. 25 Relative Expression der MRP-und UMAT-mRNA in H322 nach Inkubation mit Hg(II) über 72 h. 163
Tab. 26 Relative Expression der MRP-und UMAT-mRNA in H322 nach Inkubation mit Hg(II) über 7 Tage. 163
Tab. 27 Relative Expression der mRNA von MRP-Transportern, UMAT und GAPDH in Primärkulturen von NHBE-Zellen (B146/1/III, B162/1/I und B242/2/II) nach Inkubation mit Hg(II) (24 h). 164
Tab. 28 Relative Expression der GAPDH-mRNA und der 18S rRNA in den Langzeitexperimenten mit Hg(II) an Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B182, B201 und B222). 165
Tab. 29 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B182, B201und B222) nach Inkubation mit Hg(II) über 5 Tage. 166
Tab. 30 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach der zweiten Inkubation mit Hg(II) über 5 Tage. 167
Tab. 31 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B201) nach der ersten und der zweiten fünftägigen Inkubation mit Hg(II). 168
Tab. 32 Probenpaar-Sets, deren Expression in mindestens zwei von vier Kulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) um mindestens das Zweifache verändert war nach Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage. 172
Tab. 33 Die Wirkung der kombinierten Behandlung mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) über drei Tage auf die Genexpressionsmuster von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218). 175
Tab. 34 Gene des Pyrimidinmetabolismus, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren (zu Abb. 54). 180
Tab. 35 Gene des Purinmetabolismus, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren (zu Abb. 55). 180
Tab. 36 Gene der Steroidbiosynthese, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren (zu Abb. 56). 180
Tab. 37 Cytochrom P450 Enzyme, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren (zu Abb. 57). 184
Tab. 38 Promotoranalyse zur Ermittlung der Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an der Regulation der modulierten Genen in den mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination behandelten Kulturen beteiligt sind. 185
Tab. 39 Gene deren Expression in Kulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215 und B218) mindestens um das Zweifache verändert war nach Behandlung mit Pb(II) über drei Tage, nicht jedoch nach Inkubation mit Cd(II) oder Co(II). 189
Tab. 40 Gene deren Expression in Kulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215 und B218) mindestens um das Zweifache verändert war nach Behandlung mit Cd(II) über drei Tage, nicht jedoch nach Inkubation mit Pb(II) oder Co(II). 190
Tab. 41 Gene deren Expression moduliert war in Kulturen von NHBE-Zellen (Pat.: B214, B215, 216 und B218) nach Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über 3 Tage, nicht jedoch nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) oder Pb(II) allein. 190

**Tabellarische Auflistung der Daten zu den Experimenten**

**Tab. 9 Daten der Patienten deren Gewebe in der vorliegenden Arbeit zur Gewinnung von NHBE-Zellen genutzt wurde.**

BK: Bronchialkarzinom, PK: Plattenepithelkarzinom, AK: Adenokarzinom, OL: Oberlappen, ML: Mittellappen, UL: Unterlappen, NR: Nichtraucher, PJ: Packungsjahre (Anzahl der Packungen gerauchter Zigaretten pro Tag und Jahr), - keine Informationen verfügbar.

| ID | Geschlecht | Alter | Diagnose | Rauchstatus | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| 146 | m | 61 | BK<br>li UL | 10 PJ | Asbestexposition |
| 162 | m | 52 | Metastase li UL | 25 PJ | Dreher, Chemotherapie, Bestrahlung |
| 182 | w | 57 | BK<br>li OL | 15 PJ | Fleischereifachverkäuferin |
| 201 | m | 77 | BK<br>re OL | NR seit 6J,<br>54 PJ | - |
| 214 | m | 50 | BK<br>li UL | NR, passiv R | Mechaniker, Lösungsmittelexposition, Bauarbeiter, Klempner |
| 215 | m | 64 | BK<br>re UL | 92 PJ | Kraftfahrer, Metzger, Maler, |
| 216 | m | 68 | Tumor<br>li UL | 60 PJ | Zementherstellung, Aluminumhütte, Lindanproduktion, Plastikherstellung |
| 218 | w | 72 | BK<br>li UL | 8 PJ | Köchin |
| 222 | m | 74 | Pneum-ektomie | seit 1,5 J NR,<br>60-70 PJ | Schmied, Braunkohlebergbau |
| 242 | m | 64 | AK | - | - |
| 243 | m | 62 | PK<br>ML | 45 PJ | - |
| 244 | m | 67 | BK<br>re OL | 7 PJ | Schreiner |
| 245 | m | 54 | BK<br>li UL | 80 PJ | Maurer |
| 246 | m | 72 | BK<br>li UL | NR, seit 8J | - |
| 248 | w | 76 | BK<br>re OL | NR | Geflügelzüchterin, Futterproduktion |
| 252 | m | 67 | BK<br>li OL | 30 PJ | Kraftfahrer |

**Tab. 10 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in den Kontrollen der Langzeitversuche mit Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patienten B182 und B201) im Verlauf der Experimente.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf den Mittelwert des jeweiligen Experiments nach neun Tagen in Kultur. n=8

| Kulturdauer | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| 9 Tage | | | | |
| B182 | 0,74 | 0,84 | 0,75 | 0,66 |
| | 1,26 | 1,16 | 1,25 | 1,34 |
| B201 | 0,82 | 0,80 | 0,86 | 0,90 |
| | 1,18 | 1,20 | 1,14 | 1,10 |
| 18 Tage | | | | |
| B182 | 0,53 | 0,21 | 0,42 | 0,20 |
| | 0,82 | 0,95 | 1,18 | 1,57 |
| B201 | 1,18 | 1,15 | 1,18 | 0,95 |
| | 1,69 | 1,57 | 2,45 | 2,42 |
| 27 Tage | | | | |
| B201 | 0,46 | 1,01 | 0,62 | 0,47 |
| | 0,59 | 1,25 | 0,78 | 0,56 |
| 36 Tage | | | | |
| B201 | 0,40 | 0,29 | 0,38 | 0,36 |
| | 0,50 | 0,42 | 0,92 | 1,00 |

**Tab. 11 Expression von MRP1 bis 5 sowie GAPDH und 18S rRNA in H322 nach Inkubation mit As(III) für (24 h).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Dargestellt sind die Minimal- und Maximalwerte. Bei den MRP-Transportern ist die Expression im Verhältnis zum Referenzgen GAPDH angegeben. Die potenziellen Referenzgene GAPDH und 18S rRNA wurden relativ zum Mittelwert der Expression in den unbehandelten Kulturen angegeben. n=4;

| As(III) [µM] | **MRP1** | **MRP2** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** | **GAPDH** | **18S rRNA** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 1,54 | 1,61 | 1,22 | 1,11 | 0,95 | 0,94 | 0,90 |
| | 1,93 | 1,70 | 1,26 | 1,26 | 1,02 | 1,06 | 1,10 |
| 2,5 | 1,26 | 1,26 | 1,09 | 0,86 | 1,24 | 0,78 | 0,96 |
| | 2,01 | 1,82 | 1,32 | 1,17 | 0,79 | 1,09 | 1,11 |
| 5 | 0,73 | 1,01 | 0,96 | 0,74 | 0,76 | 1,08 | 1,10 |
| | 1,15 | 1,34 | 1,08 | 0,95 | 0,80 | 1,17 | 1,31 |

**Tab. 12 Der Transport von CDF durch MRP-Transporter in H322 Zellen nach Inkubation mit As(III) für 24 h, drei und fünf Tage mit und ohne Zugabe von MK571 (5 mg/l).**

Die Transportaktivität verschiedener MRP-Transporter wurde in Summe indirekt über die Messung der intrazellulären Fluoreszenz bestimmt (vgl. 2.7). Relative Fluoreszenz als Mittelwert aus drei Experimenten ± SEM, bezogen auf unbehandelte H322 Zellen.

| | Durchschnitt: | SE: |
|---|---|---|
| Kontrolle | 100,0 | |
| Kontrolle + NaOH | 101,1 | 0,9 |
| As 2,5µM 1d | 83,2 | 3,4 |
| As 5µM 1d | 79,9 | 1,2 |
| As 2,5µM 3d | 82,8 | 2,9 |
| As 5µM 3d | 82,0 | 1,3 |
| As 2,5µM 5d | 81,0 | 2,6 |
| As 5µM 5d | 83,7 | 5,4 |
| As 2,5µM 1d + MK571 | 123,0 | 4,7 |
| As 5µM 1d + MK571 | 125,3 | 2,3 |
| As 2,5µM 3d + Mk571 | 127,0 | 2,6 |
| As 5µM 3d + MK571 | 127,9 | 3,2 |
| As 2,5µM 5d + MK571 | 124,8 | 3,4 |
| As 5µM 5d + MK571 | 127,9 | 1,0 |

**Tab. 13 Relative Expression der GAPDH-mRNA und der 18S rRNA in den Langzeitexperimenten mit Arsenit an Primärkulturen von NHBE-Zellen (B182, B201).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Relative Expression bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen („As 0“) des jeweiligen Experiments. Erste Woche: N=2; n=4; zweite Woche: N=2; n=4; dritte und vierte Woche: N=1; n=4

a)

| **B182** | **1. Woche** | | **2. Woche** | |
|---|---|---|---|---|
| | GAPDH | 18S rRNA | GAPDH | 18S rRNA |
| As 0/1 | 1,05 | 0,94 | 0,83 | 0,91 |
| As 0/2 | 0,95 | 1,06 | 1,17 | 1,09 |
| As 1/1 | 1,03 | 0,66 | 1,37 | 2,34 |
| As 1/2 | 1,21 | 1,08 | 1,08 | 0,72 |
| As 2,5/1 | 1,12 | 0,72 | 1,15 | 2,77 |
| As 2,5/2 | 1,10 | 0,95 | 1,78 | 2,52 |

b)

| **B201** | **1. Woche** | | **2. Woche** | | **3. Woche** | | **4. Woche** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | GAPDH | 18S rRNA | GAPDH | 18S rRNA | GAPDH | 18S rRNA | GAPDH | 18S rRNA |
| As 0/1 | 0,90 | 1,01 | 1,04 | 0,94 | 0,94 | 0,86 | 1,13 | 1,11 |
| As 0/2 | 1,10 | 0,99 | 0,96 | 1,06 | 1,06 | 1,14 | 0,87 | 0,89 |
| As 1/1 | 1,30 | 0,71 | 1,46 | 1,37 | 0,60 | 0,92 | 1,17 | 0,92 |
| As 1/2 | 0,85 | 0,92 | 1,18 | 1,07 | 0,65 | 1,15 | 1,13 | 0,95 |
| As 2,5/1 | 1,89 | 0,72 | 1,14 | 0,86 | 1,03 | 1,03 | 1,73 | 0,91 |
| As 2,5/2 | 1,68 | 0,63 | 2,18 | 1,32 | 1,07 | 0,93 | 1,70 | 1,07 |

**Tab. 14 Relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182, B201) nach Inkubation mit As(III) über 5 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgene: B182: GAPDH; B201: 18S rRNA. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf die unbehandelten Kulturen des jeweiligen Patienten. N=2; n=4

| | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| **As(III) 0 µM** | | | | |
| B182 | 0,74 | 0,84 | 0,82 | 0,66 |
| | 1,26 | 1,16 | 1,18 | 1,34 |
| B201 | 0,86 | 0,98 | 0,99 | 0,97 |
| | 1,14 | 1,02 | 1,01 | 1,03 |
| **As(III) 1 µM** | | | | |
| B182 | 0,93 | 1,26 | 1,73 | 1,48 |
| | 1,07 | 1,29 | 1,77 | 1,67 |
| B201 | 0,72 | 0,84 | 0,90 | 0,85 |
| | 0,84 | 1,12 | 1,07 | 0,99 |
| **As(III) 2,5 µM** | | | | |
| B182 | 0,88 | 1,33 | 1,75 | 2,04 |
| | 0,92 | 1,44 | 2,42 | 2,52 |
| B201 | 0,89 | 1,54 | 1,42 | 1,53 |
| | 1,25 | 1,55 | 1,70 | 1,76 |

**Tab. 15 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach der zweiten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Mittelwert der relativen Expression ± SE. n=4

| | **MRP1** | **SE:** | **MRP3** | **SE:** | **MRP4** | **SE:** | **MRP5** | **SE:** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| As(III) 0 µM | | | | | | | | |
| B182 | 0,67 | 0,01 | 0,27 | 0,03 | 0,50 | 0,14 | 0,70 | 0,10 |
| B201 | 0,97 | 0,03 | 0,71 | 0,02 | 0,82 | 0,14 | 0,70 | 0,10 |
| As(III) 1 µM | | | | | | | | |
| B182 | 0,48 | 0,18 | 0,23 | 0,03 | 0,41 | 0,06 | 0,56 | 0,00 |
| B201 | 0,47 | 0,01 | 0,36 | 0,02 | 0,34 | 0,03 | 0,37 | 0,02 |
| As(III) 2,5 µM | | | | | | | | |
| B182 | 0,49 | 0,03 | 0,21 | 0,04 | 0,49 | 0,02 | 0,63 | 0,01 |
| B201 | 0,36 | 0,03 | 0,50 | 0,07 | 0,31 | 0,02 | 0,37 | 0,03 |

**Tab. 16 Die Relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen (Patient B201) nach der dritten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf unbehandelte Kulturen von B201. n=4

| As(III) [µM] | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,79 | 0,97 | 0,80 | 0,83 |
| | 1,21 | 1,03 | 1,19 | 1,17 |
| 1 | 0,82 | 0,23 | 0,74 | 0,70 |
| | 1,24 | 0,59 | 0,95 | 1,44 |
| 2,5 | 0,90 | 0,55 | 0,81 | 1,24 |
| | 1,10 | 0,57 | 0,83 | 1,31 |

**Tab. 17 Die Relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in NHBE-Zellen (Patient B201) nach der vierten fünftägigen Inkubation mit As(III).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S rRNA. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf unbehandelte Kulturen von B201. n=4

| As(III) [µM] | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,89 | 0,81 | 0,59 | 0,53 |
| | 1,11 | 1,19 | 1,41 | 1,47 |
| 1 | 0,91 | 1,31 | 0,76 | 0,79 |
| | 1,27 | 1,63 | 0,96 | 0,90 |
| 2,5 | 1,17 | 2,10 | 0,59 | 0,68 |
| | 1,63 | 2,23 | 1,15 | 1,24 |

**Tab. 18 Relative Expression der mRNA von MRP-Transportern, UMAT und GAPDH in H322 nach Inkubation mit Cu(II) (24 h).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf unbehandelte Kulturen von H322. n=4

| Cu(II) [µM] | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** | **UMAT** | **GAPDH** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,90 | 0,86 | 0,87 | 0,77 | 0,88 | 0,79 |
| | 1,10 | 1,14 | 1,13 | 1,23 | 1,12 | 1,21 |
| 15 | 0,70 | 0,82 | 0,99 | 0,65 | 0,96 | 0,51 |
| | 0,89 | 0,90 | 1,12 | 1,00 | 1,32 | 1,84 |
| 25 | 0,84 | 0,99 | 1,01 | 0,96 | 1,10 | 0,84 |
| | 0,97 | 1,07 | 1,12 | 0,98 | 1,14 | 1,10 |

**Tab. 19 Relative Expression der MRP-und UMAT-mRNA in H322 nach Inkubation mit Cu(II) über 7 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf unbehandelte Kulturen von H322. n=4

| Cu(II) [µM] | **MRP1** | **MRP2** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** | **UMAT** | **GAPDH** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,78 | 0,81 | 0,73 | 0,88 | 0,96 | 0,98 | 0,87 |
| | 1,22 | 1,19 | 1,27 | 1,12 | 1,04 | 1,02 | 1,13 |
| 2,5 | 0,82 | 1,09 | 0,96 | 0,99 | 0,71 | 1,03 | 0,58 |
| | 1,23 | 1,11 | 1,73 | 1,10 | 0,81 | 1,08 | 1,16 |
| 5 | 0,90 | 0,85 | 1,26 | 0,88 | 0,51 | 0,75 | 0,90 |
| | 0,94 | 1,14 | 1,57 | 0,98 | 0,80 | 0,85 | 1,03 |

**Tab. 20 Relative Expression von MRP1, 3 und 5 in B146/1/I nach Inkubation mit Cu(II) (24 h).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf den Mittelwert der unbehandelte Kulturen von B146/1/I. n=4

| Cu(II) [µM] | **MRP1** | **MRP3** | **MRP5** | **GAPDH** |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,87 | 0,94 | 0,94 | 0,66 |
| | 1,13 | 1,06 | 1,06 | 1,34 |
| 15 | 0,97 | 1,03 | 1,29 | 0,53 |
| | 0,98 | 1,13 | 1,30 | 0,57 |
| 25 | 0,86 | 1,30 | 1,07 | 0,21 |
| | 1,11 | 1,83 | 1,42 | 0,54 |

**Tab. 21 Relative Expression der GAPDH-mRNA und der 18S rRNA in den Langzeitexperimenten mit Cu(II) an NHBE-Zellen (Patienten B182, B201 und B222).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Relative Expression bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen („Cu 0“) des jeweiligen Experiments. Erste Woche: N=3; n=4; zweite Woche: N=2; n=4;

a)

| **B182** | **1. Woche** | | **2. Woche** | |
|---|---|---|---|---|
| | GAPDH | 18S rRNA | GAPDH | 18S rRNA |
| Cu 0/1 | 0,99 | 1,04 | 1,18 | 1,19 |
| Cu 0/2 | 1,01 | 0,96 | 0,82 | 0,81 |
| Cu 1/1 | 1,24 | 1,28 | 1,17 | 1,03 |
| Cu 1/2 | 0,47 | 0,52 | 0,96 | 0,78 |
| Cu 2,5/1 | 0,80 | 0,62 | 0,97 | 0,87 |
| Cu 2,5/2 | 1,13 | 1,47 | 1,17 | 1,16 |

b)

| **B201** | **1. Woche** | | **2. Woche** | |
|---|---|---|---|---|
| | GAPDH | 18S rRNA | GAPDH | 18S rRNA |
| Cu 0/1 | 1,14 | 1,11 | 1,40 | 1,49 |
| Cu 0/2 | 0,86 | 0,89 | 0,60 | 0,51 |
| Cu 1/1 | 1,17 | 1,22 | 1,34 | 1,07 |
| Cu 1/2 | 0,37 | 0,59 | 0,87 | 0,71 |
| Cu 2,5/1 | 0,87 | 0,94 | 0,33 | 0,67 |
| Cu 2,5/2 | 0,58 | 0,72 | 1,54 | 1,35 |

c)

| **B222** | **1. Woche** | |
|---|---|---|
| | GAPDH | 18S rRNA |
| Cu 0/1 | 0,78 | 0,77 |
| Cu 0/2 | 1,22 | 1,23 |
| Cu 1/1 | 1,42 | 1,12 |
| Cu 1/2 | 1,55 | 1,61 |
| Cu 2,5/1 | 1,46 | 1,09 |
| Cu 2,5/2 | 0,86 | 0,78 |

**Tab. 22 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B182, B201und B222) nach Inkubation mit Cu(II) über 5 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S rRNA. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf die unbehandelten Kulturen von B182. N=3; n=4;

| | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| **Cu(II) 0 µM** | | | | |
| B182 | 0,75 | 0,92 | 0,75 | 0,81 |
| | 1,25 | 1,08 | 1,25 | 1,19 |
| B201 | 1,14 | 1,09 | 0,86 | 0,91 |
| | 1,64 | 1,63 | 1,13 | 1,12 |
| B222 | 0,70 | 0,84 | 0,40 | 0,47 |
| | 1,09 | 1,16 | 0,94 | 0,72 |
| **Cu(II) 2,5 µM** | | | | |
| B182 | 1,30 | 1,11 | 1,57 | 1,18 |
| | 1,36 | 1,44 | 1,60 | 1,20 |
| B201 | 1,09 | 0,89 | 0,92 | 0,91 |
| | 1,11 | 1,33 | 1,36 | 0,95 |
| B222 | 0,61 | 0,67 | 0,45 | 0,46 |
| | 0,69 | 0,96 | 0,53 | 0,48 |
| **Cu(II) 5 µM** | | | | |
| B182 | 1,39 | 1,21 | 1,28 | 0,98 |
| | 2,05 | 1,79 | 2,30 | 1,95 |
| B201 | 0,59 | 0,63 | 0,48 | 0,40 |
| | 0,91 | 0,90 | 0,74 | 0,67 |
| B222 | 1,04 | 0,94 | 0,81 | 0,70 |
| | 1,29 | 1,54 | 1,24 | 0,84 |

**Tab. 23 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach zweimaliger Inkubation mit Cu(II) über jeweils 5 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S rRNA. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf die unbehandelten Kulturen von B182 nach der ersten Inkubation mit Cu(II) für fünf Tage. N=2; n=4;

| | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| **Cu(II) 0 µM** | | | | |
| B182 | 0,53 | 0,59 | 0,42 | 0,20 |
| | 0,82 | 0,95 | 0,58 | 0,68 |
| B201 | 1,74 | 1,57 | 1,37 | 1,20 |
| | 2,35 | 1,85 | 2,44 | 2,46 |
| **Cu(II) 2,5 µM** | | | | |
| B182 | 0,64 | 0,87 | 0,53 | 0,27 |
| | 0,67 | 0,97 | 0,54 | 0,39 |
| B201 | 1,17 | 1,66 | 0,67 | 0,48 |
| | 1,74 | 1,68 | 1,81 | 1,49 |
| **Cu(II) 5 µM** | | | | |
| B182 | 0,68 | 1,00 | 0,98 | 0,78 |
| | 0,97 | 1,63 | 1,03 | 0,97 |
| B201 | 0,61 | 0,52 | 0,76 | 0,43 |
| | 1,40 | 1,23 | 1,45 | 1,73 |

**Tab. 24 Relative Expression der MRP-mRNA in H322 nach Inkubation mit Hg(II) (24 h).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten Kulturen. n=4

| Hg(II) [µM] | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** | **UMAT** | **GAPDH** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,99 | 0,99 | 0,98 | 0,91 | 0,91 | 0,95 |
| | 1,01 | 1,01 | 1,02 | 1,09 | 1,09 | 1,05 |
| 5 | 0,56 | 0,87 | 0,52 | 0,59 | 0,75 | 0,47 |
| | 0,68 | 0,98 | 0,79 | 0,66 | 0,88 | 0,98 |
| 30 | 0,85 | 1,05 | 0,75 | 0,66 | 1,00 | 0,29 |
| | 0,99 | 1,06 | 0,88 | 1,06 | 1,15 | 0,82 |

**Tab. 25 Relative Expression der MRP-und UMAT-mRNA in H322 nach Inkubation mit Hg(II) über 72 h.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten Kulturen. n=4

| Hg(II) [µM] | **MRP1** | **MRP2** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** | **UMAT** | **GAPDH** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,89 | 0,97 | 0,99 | 0,97 | 0,98 | 0,89 | 0,99 |
| | 1,11 | 1,03 | 1,01 | 1,03 | 1,02 | 1,11 | 1,01 |
| 2,5 | 0,87 | 0,80 | 0,89 | 0,88 | 0,70 | 0,76 | 0,66 |
| | 0,89 | 1,11 | 1,02 | 0,92 | 0,94 | 0,80 | 1,28 |
| 5 | 0,97 | 0,98 | 1,11 | 0,86 | 0,68 | 0,90 | 0,90 |
| | 1,05 | 1,09 | 1,28 | 1,08 | 1,06 | 1,02 | 0,97 |

**Tab. 26 Relative Expression der MRP-und UMAT-mRNA in H322 nach Inkubation mit Hg(II) über 7 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf den Mittelwert der unbehandelten Kulturen. n=4

| Hg(II) [µM] | **MRP1** | **MRP2** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** | **UMAT** | **GAPDH** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0,80 | 0,99 | 0,84 | 0,91 | 0,97 | 0,99 | 0,68 |
| | 1,20 | 1,01 | 1,16 | 1,09 | 1,03 | 1,01 | 1,32 |
| 2,5 | 0,68 | 0,81 | 0,83 | 0,90 | 0,89 | 0,70 | 0,76 |
| | 1,07 | 1,00 | 1,06 | 1,36 | 1,20 | 1,06 | 1,14 |
| 5 | 0,74 | 0,80 | 0,99 | 1,02 | 1,09 | 0,65 | 0,70 |
| | 0,79 | 0,96 | 1,06 | 1,13 | 1,11 | 0,66 | 0,98 |

**Tab. 27 Relative Expression der mRNA von MRP-Transportern, UMAT und GAPDH in Primärkulturen von NHBE-Zellen (B146/1/III, B162/1/I und B242/2/II) nach Inkubation mit Hg(II) (24 h).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: GAPDH. Bei den MRP-Transportern sind die Minimal- und Maximalwerte angegeben, bezogen auf die unbehandelten Kulturen von B146/1/I, sofern sie in allen drei Patienten bestimmt wurden. Bei MRP4, UMAT und GAPDH sind die Minimal- und Maximalwerte bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen „Hg 0“ des jeweiligen Patienten. n.b. = nicht bestimmt; n.n. = nicht nachweisbar; N=3; n=4;

| | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** | **UMAT** | GAPDH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Hg(II) 0 µM** | | | | | | |
| B146/1/I | 0,85 | 0,91 | n.b. | 0,89 | n.b. | 0,85 |
| | 1,15 | 1,09 | n.b. | 1,11 | n.b. | 1,15 |
| B162/1/I | 0,52 | 0,02 | n.b. | 1,32 | 0,85 | 0,82 |
| | 0,66 | 0,02 | n.b. | 1,50 | 1,15 | 1,18 |
| B242/2/II | 0,25 | 0,26 | 0,66 | 0,26 | n.n. | 0,88 |
| | 0,42 | 0,38 | 1,34 | 0,44 | n.n. | 1,12 |
| **Hg(II) 2,5 µM** | | | | | | |
| B146/1/I | 1,17 | 1,79 | n.b. | 0,76 | n.b. | 0,72 |
| | 1,21 | 2,28 | n.b. | 1,04 | n.b. | 1,82 |
| B162/1/I | 0,50 | 0,02 | n.b. | 0,99 | 0,95 | 1,41 |
| | 0,58 | 0,03 | n.b. | 1,19 | 1,01 | 1,69 |
| B242/2/II | 0,33 | 0,33 | 0,97 | 0,37 | n.n. | 1,01 |
| | 0,37 | 0,37 | 1,05 | 0,47 | n.n. | 1,46 |
| **Hg(II) 5 µM** | | | | | | |
| B146/1/I | 0,75 | 1,59 | n.b. | 0,92 | n.b. | 0,99 |
| | 1,28 | 2,72 | n.b. | 1,03 | n.b. | 1,23 |
| B162/1/I | 0,56 | 0,02 | n.b. | 1,21 | 1,01 | 1,01 |
| | 0,59 | 0,02 | n.b. | 1,43 | 1,11 | 1,06 |
| B242/2/II | 0,33 | 0,45 | 0,88 | 0,41 | n.n. | 0,92 |
| | 0,51 | 0,49 | 0,95 | 0,52 | n.n. | 1,58 |

**Tab. 28 Relative Expression der GAPDH-mRNA und der 18S rRNA in den Langzeitexperimenten mit Hg(II) an Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B182, B201 und B222).**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Relative Expression bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen („Hg 0“) des jeweiligen Experiments. Erste Woche: N=3; n=4; zweite Woche: N=2; n=4;

a)

| **B182** | **1. Woche** | | **2. Woche** | |
|---|---|---|---|---|
| | GAPDH | 18S rRNA | GAPDH | 18S rRNA |
| Hg 0/1 | 0,99 | 1,04 | 1,18 | 1,19 |
| Hg 0/2 | 1,01 | 0,96 | 0,82 | 0,81 |
| Hg 1/1 | 1,00 | 1,09 | 0,55 | 0,62 |
| Hg 1/2 | 0,89 | 0,95 | 0,69 | 0,65 |
| Hg 2,5/1 | 0,40 | 0,43 | 0,88 | 1,09 |
| Hg 2,5/2 | 1,09 | 0,92 | 0,61 | 0,63 |
| Hg 5/1 | 0,55 | 0,59 | 1,12 | 0,75 |
| Hg 5/2 | 0,32 | 0,32 | 0,61 | 0,49 |

b)

| **B201** | **1. Woche** | | **2. Woche** | |
|---|---|---|---|---|
| | GAPDH | 18S rRNA | GAPDH | 18S rRNA |
| Hg 0/1 | 1,14 | 1,11 | 1,40 | 1,49 |
| Hg 0/2 | 0,86 | 0,89 | 0,60 | 0,51 |
| Hg 1/1 | 0,94 | 0,89 | 1,54 | 1,41 |
| Hg 1/2 | 0,11 | 0,31 | 1,88 | 1,40 |
| Hg 2,5/1 | 0,85 | 0,95 | 1,49 | 1,13 |
| Hg 2,5/2 | 0,73 | 0,74 | 1,52 | 1,48 |
| Hg 5/1 | 0,76 | 0,70 | 0,73 | 0,84 |
| Hg 5/2 | 0,87 | 0,83 | 1,43 | 1,21 |

c)

| **B222** | **1. Woche** | |
|---|---|---|
| | GAPDH | 18S rRNA |
| Hg 0/1 | 0,78 | 0,77 |
| Hg 0/2 | 1,22 | 1,23 |
| Hg 1/1 | 1,39 | 1,15 |
| Hg 1/2 | 1,49 | 1,14 |
| Hg 2,5/1 | 1,33 | 0,89 |
| Hg 2,5/2 | 1,41 | 1,29 |
| Hg 5/1 | 0,82 | 1,01 |
| Hg 5/2 | 1,46 | 1,16 |

**Tab. 29 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von drei Patienten (B182, B201und B222) nach Inkubation mit Hg(II) über 5 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S rRNA. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf die unbehandelten Kulturen von B182. N=3; n=4;

| | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| **Hg(II) 0 µM** | | | | |
| B182 | 0,75 | 0,92 | 0,75 | 0,81 |
| | 1,25 | 1,08 | 1,25 | 1,19 |
| B201 | 1,14 | 1,09 | 0,86 | 0,91 |
| | 1,64 | 1,63 | 1,13 | 1,12 |
| B222 | 0,70 | 0,84 | 0,40 | 0,47 |
| | 1,09 | 1,16 | 0,94 | 0,72 |
| **Hg(II) 1 µM** | | | | |
| B182 | 1,02 | 1,25 | 1,24 | 1,05 |
| | 1,21 | 1,29 | 1,32 | 1,48 |
| B201 | 0,95 | 0,71 | 0,95 | 0,65 |
| | 1,47 | 1,80 | 1,47 | 1,45 |
| B222 | 1,36 | 1,50 | 1,17 | 0,89 |
| | 1,44 | 1,70 | 1,66 | 0,99 |
| **Hg(II) 2,5 µM** | | | | |
| B182 | 1,15 | 1,72 | 1,23 | 0,99 |
| | 1,16 | 1,91 | 1,97 | 1,40 |
| B201 | 1,01 | 1,43 | 0,61 | 0,64 |
| | 1,05 | 1,44 | 0,71 | 0,85 |
| B222 | 1,22 | 1,24 | 0,81 | 0,87 |
| | 1,33 | 1,77 | 1,06 | 1,00 |
| **Hg(II) 5 µM** | | | | |
| B182 | 1,15 | 1,95 | 1,38 | 0,98 |
| | 1,33 | 2,25 | 2,90 | 2,14 |
| B201 | 1,09 | 1,94 | 0,89 | 0,98 |
| | 1,20 | 2,03 | 0,97 | 1,13 |
| B222 | 1,06 | 1,32 | 1,16 | 0,76 |
| | 1,25 | 1,44 | 1,38 | 1,31 |

**Tab. 30 Die relative Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen von zwei Patienten (B182 und B201) nach der zweiten Inkubation mit Hg(II) über 5 Tage.**

Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgene: B182: GAPDH; B201: 18S rRNA. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf die unbehandelten Kulturen des jeweiligen Patienten nach der zweiten fünftägigen Behandlung mit Hg(II). N=2; n=4;

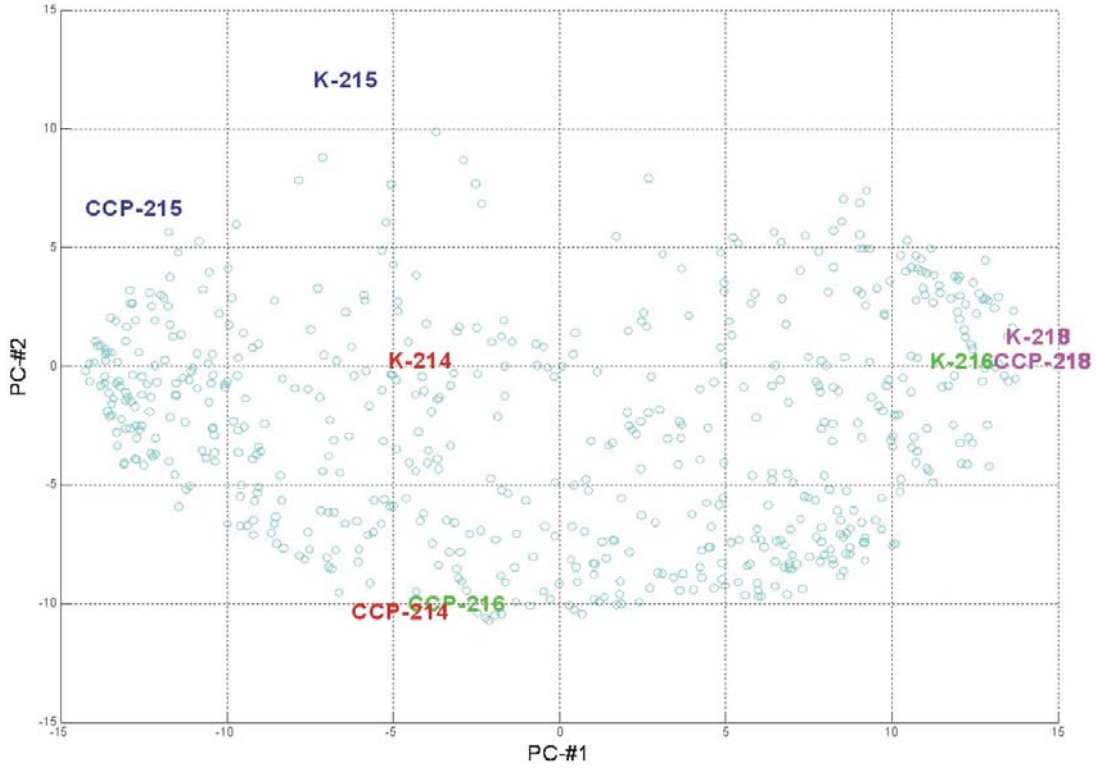
| | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| **Hg(II) 0 µM** | | | | |
| B182 | 0,77 | 0,75 | 0,83 | 0,45 |
| | 1,23 | 1,25 | 1,17 | 1,55 |
| B201 | 0,85 | 0,92 | 0,72 | 0,66 |
| | 1,15 | 1,08 | 1,28 | 1,34 |
| **Hg(II) 1 µM** | | | | |
| B182 | 0,98 | 1,01 | 0,75 | 0,75 |
| | 1,11 | 1,60 | 0,88 | 0,87 |
| B201 | 0,75 | 0,96 | 0,31 | 0,36 |
| | 1,03 | 1,10 | 0,44 | 0,56 |
| **Hg(II) 2,5 µM** | | | | |
| B182 | 0,97 | 1,02 | 0,86 | 1,00 |
| | 1,37 | 1,72 | 1,29 | 1,37 |
| B201 | 0,45 | 0,65 | 0,26 | 0,32 |
| | 0,57 | 0,82 | 0,44 | 0,57 |
| **Hg(II) 5 µM** | | | | |
| B182 | 1,22 | 2,01 | 1,15 | 1,07 |
| | 1,63 | 2,16 | 1,94 | 2,51 |
| B201 | 0,48 | 0,88 | 0,44 | 0,34 |
| | 0,83 | 1,22 | 0,73 | 0,84 |

**Tab. 31 Vergleich der relativen Expression der mRNA der MRP-Transporter in Primärkulturen von NHBE-Zellen (Patient B201) nach der ersten und der zweiten fünftägigen Inkubation mit Hg(II).**

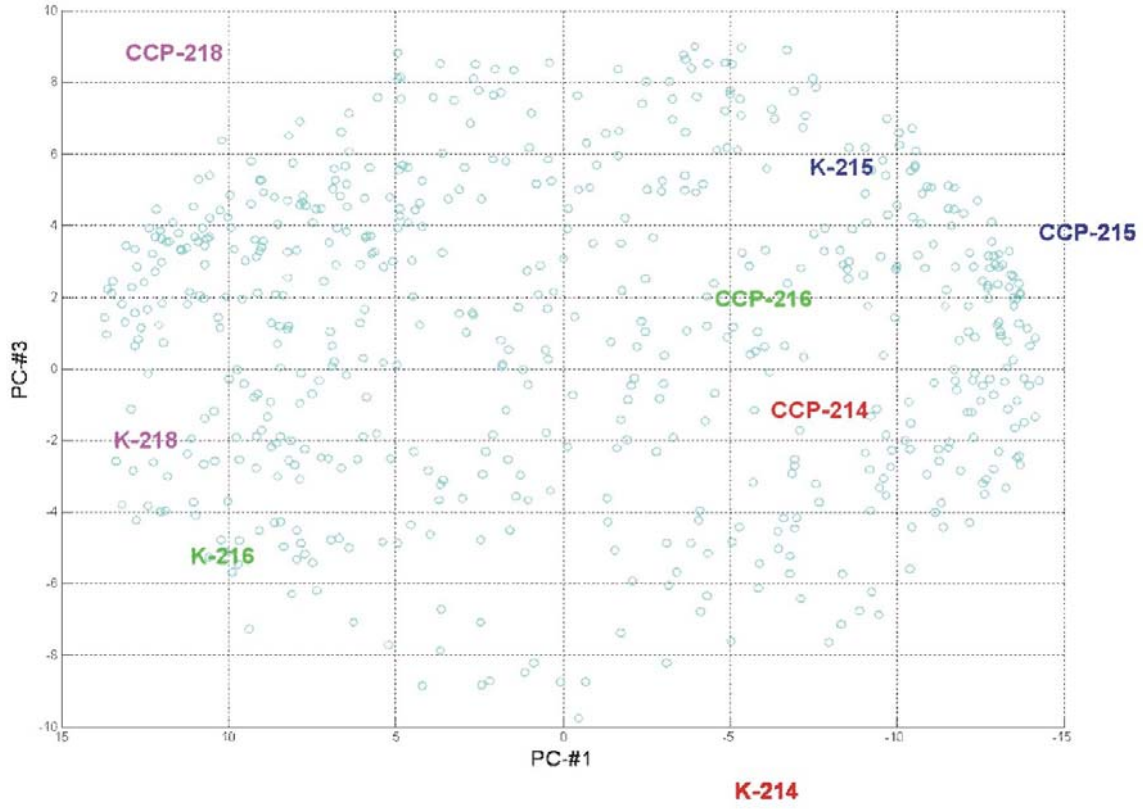
Semi-quantitative Bestimmung mittels *Real-time* RT-PCR. Referenzgen: 18S rRNA. Minimal- und Maximalwerte bezogen auf die unbehandelten Kulturen von B201 nach der ersten Inkubation. n=4

| | **MRP1** | **MRP3** | **MRP4** | **MRP5** |
|---|---|---|---|---|
| **Hg(II) 0 µM** | | | | |
| B201 5d Hg(II) | 0,82 | 0,80 | 0,86 | 0,90 |
| | 1,18 | 1,20 | 1,14 | 1,10 |
| B201 5+5d Hg(II) | 1,25 | 1,15 | 1,38 | 1,18 |
| | 1,69 | 1,36 | 2,45 | 2,42 |
| **Hg(II) 1 µM** | | | | |
| B201 5d Hg(II) | 0,68 | 0,53 | 0,96 | 0,64 |
| | 1,06 | 1,32 | 1,48 | 1,43 |
| B201 5+5d Hg(II) | 1,11 | 1,21 | 0,59 | 0,65 |
| | 1,51 | 1,39 | 0,83 | 1,00 |
| **Hg(II) 2,5 µM** | | | | |
| B201 5d Hg(II) | 0,72 | 1,05 | 0,62 | 0,63 |
| | 0,76 | 1,06 | 0,71 | 0,83 |
| B201 5+5d Hg(II) | 0,67 | 0,82 | 0,51 | 0,58 |
| | 0,85 | 1,03 | 0,83 | 1,04 |
| **Hg(II) 5 µM** | | | | |
| B201 5d Hg(II) | 0,79 | 1,43 | 0,89 | 0,97 |
| | 0,87 | 1,50 | 0,98 | 1,11 |
| B201 5+5d Hg(II) | 0,71 | 1,11 | 0,85 | 0,62 |
| | 1,22 | 1,54 | 1,40 | 1,51 |

a)


K-215
CCP-215
K-214
K-218
K-216
CCP-218
CCP-216
CCP-214
PC-#2
PC-#1

b)


CCP-218
K-215
CCP-215
CCP-216
CCP-214
K-218
K-216
PC-#3
PC-#1
K-214

c)

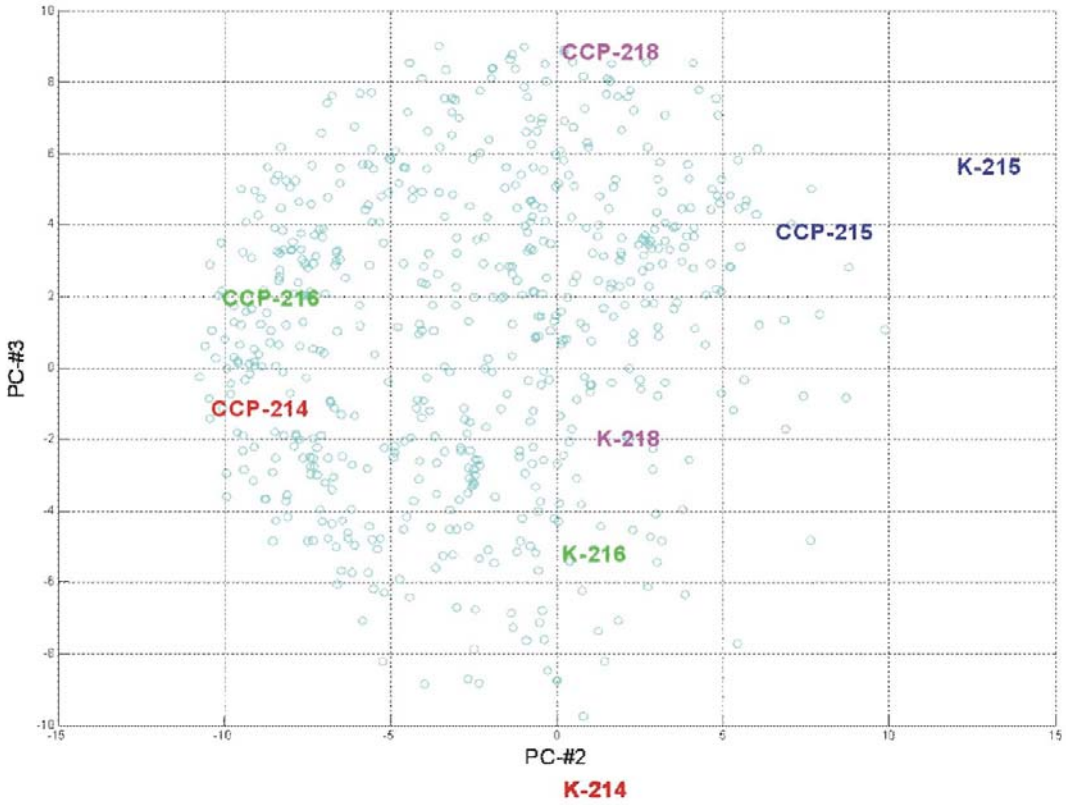



**Abb. 52 Hauptkomponentenanalyse basierend auf jeweils zwei der ersten drei Hauptkomponenten der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage.**

NHBE-Zellen wurden für drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination inkubiert, diese Proben sind mit „CCP“ gekennzeichnet. Die unbehandelten Kontrollen sind mit „K“ bezeichnet. Die Hauptkomponentenanalyse basiert auf 590 Probenpaar-Sets, die in mindestens einem der vier Experimente um mindestens das Zweifache moduliert waren.

a) #PC-1: Hauptkomponente Nr. 1; #PC-2: Hauptkomponente Nr. 2

b) #PC-1: Hauptkomponente Nr. 1; #PC-3: Hauptkomponente Nr. 3

c) #PC-2: Hauptkomponente Nr. 2; #PC-3: Hauptkomponente Nr. 3

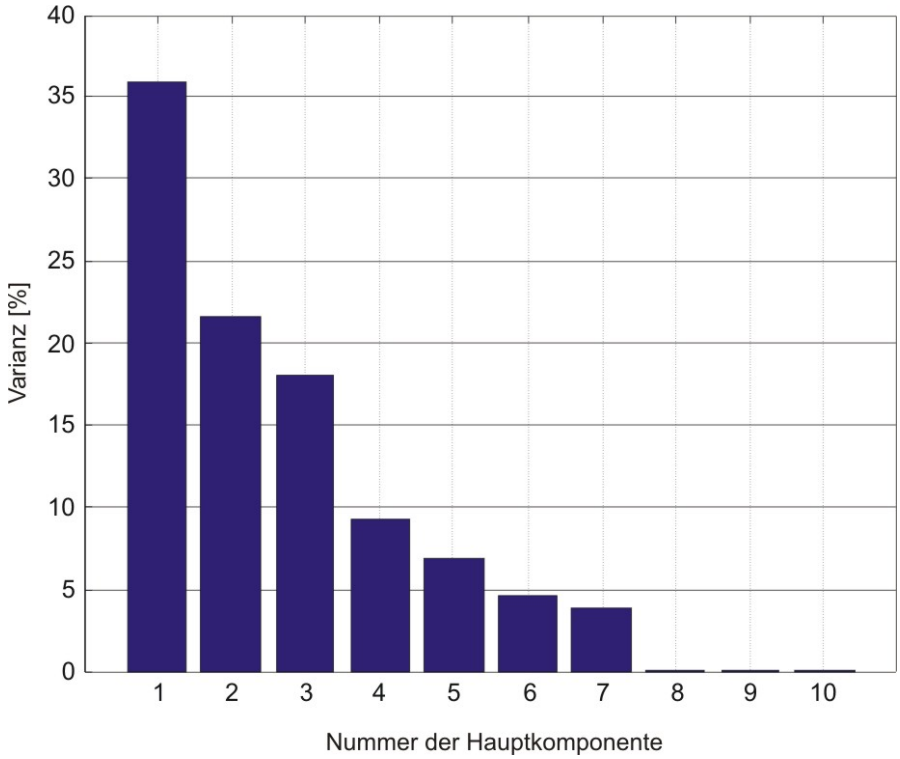



**Abb. 53 Erklärte Varianz durch die einzelnen Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage.**

Die ersten drei Hauptkomponenten erklären 75,7 % der Varianz.

**Tab. 32 Probenpaar-Sets, deren Expression in mindestens zwei von vier Kulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) um mindestens das Zweifache verändert war nach Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über drei Tage.**

Die NHBE-Zellen wurden für drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination behandelt.

| | **Patient (Faktor der Expressionsänderung)** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Proben Nr.** | **B214** | **B215** | **B218** | **B216** | **Symbol** | **Beschreibung** | **KEGG-Pathway** |
| 1555854_at | 4,03 | 1,89 | 1,93 | 4,80 | | | |
| 1562102_at | 1,59 | 2,03 | 3,10 | 4,95 | AKR1C1 | aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase) | 00980: Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 |
| 202242_at | 3,30 | 2,39 | 2,03 | 2,97 | TSPAN7 | tetraspanin 7 | Transmembrane protein |
| 202831_at | 2,07 | 2,25 | 1,71 | 3,38 | GPX2 | glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal) | 00480: Glutathione metabolism, 00590: Arachidonic acid metabolism |
| 202922_at | 2,09 | 1,62 | 1,55 | 2,96 | GCLC | glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit | 00251: Glutamate metabolism, 00480: Glutathione metabolism |
| 202923_s_at | 1,67 | 2,06 | 1,74 | 2,26 | GCLC | glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit | 00251: Glutamate metabolism, 00480: Glutathione metabolism |
| 217626_at | 2,12 | 3,09 | 1,85 | 3,10 | AKR1C2 | aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III) | 00980: Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 |
| 218723_s_at | 3,23 | 1,56 | 2,43 | 3,51 | C13orf15 | chromosome 13 open reading frame 15 | |
| 228754_at | 1,98 | 1,71 | 2,27 | 2,83 | SLC6A6 | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6 | |
| 228825_at | 2,10 | 1,58 | 2,20 | 1,89 | LTB4DH | leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase | |
| 241418_at | 2,33 | 2,16 | 2,37 | 2,21 | LOC344887 | similar to NmrA-like family domain containing 1 | |
| 204457_s_at | -2,81 | -4,39 | -2,01 | -1,74 | GAS1 | growth arrest-specific 1 | 04340: Hedgehog signaling pathway |
| 201169_s_at | 1,60 | 2,03 | | 2,16 | BHLHB2 | basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 | 04710: Circadian rhythm |
| 215891_s_at | 1,55 | 2,22 | | 2,60 | GM2A | GM2 ganglioside activator | |
| 217188_s_at | 1,83 | 2,04 | | 3,65 | C14orf1 | chromosome 14 open reading frame 1 | |
| 224407_s_at | 1,74 | 2,34 | | 2,22 | RP6-213H19.1 | serine/threonine protein kinase MST4 | |
| 33646_g_at | 1,67 | 2,03 | | 2,15 | GM2A | GM2 ganglioside activator | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1554018_at | 2,49 | | 1,63 | 2,48 | GPNMB | glycoprotein (transmembrane) nmb | |
| 201626_at | 3,41 | | 1,98 | 3,46 | INSIG1 | insulin induced gene 1 | |
| 201627_s_at | 2,78 | | 2,26 | 2,90 | INSIG1 | insulin induced gene 1 | |
| 202539_s_at | 2,11 | | 1,51 | 2,27 | HMGCR | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase | 00100: Biosynthesis of steroids |
| 203989_x_at | 2,15 | | 1,99 | 2,26 | F2R | coagulation factor II (thrombin) receptor | 04020: Calcium signaling pathway, 04810: Regulation of actin cytoskeleton |
| 205968_at | 2,09 | | 1,73 | 2,02 | KCNS3 | potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3 | |
| 206561_s_at | 2,17 | | 2,05 | 6,42 | AKR1B10 | aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) | 00051: Fructose and mannose metabolism, 00052: Galactose metabolism, 00120: Bile acid biosynthesis, 00260: Glycine, serine and threonine metabolism, 00310: Lysine degradation, 00363: Bisphenol A degradation, 00591: Linoleic acid metabolism, 00625: Tetrachloroethene degradation, 00650: Butanoate metabolism |
| 209218_at | 2,17 | | 1,73 | 2,32 | SQLE | squalene epoxidase | 00100: Biosynthesis of steroids, 00900: Terpenoid biosynthesis |
| 212282_at | 1,63 | | 2,39 | 2,63 | TMEM97 | transmembrane protein 97 | |
| 213069_at | 2,13 | | 2,30 | 1,66 | HEG1 | HEG homolog 1 (zebrafish) | |
| 213397_x_at | 2,37 | | 1,60 | 2,29 | ANG | angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 | |
| 213562_s_at | 2,47 | | 1,64 | 2,77 | SQLE | squalene epoxidase | 00100: Biosynthesis of steroids, 00900: Terpenoid biosynthesis |
| 221750_at | 2,95 | | 2,56 | 2,84 | HMGCS1 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble) | 00072: Synthesis and degradation of ketone bodies, 00280: Valine, leucine and isoleucine degradation, 00650: Butanoate metabolism |
| 226675_s_at | 2,81 | | 2,19 | 2,28 | MALAT1 | metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA) | |
| 230256_at | 2,34 | | 2,11 | 1,95 | C1orf104 | chromosome 1 open reading frame 104 | |
| 208606_s_at | -2,69 | -2,03 | -2,12 | | WNT4 | wingless-type MMTV integration site family, member 4 | 04310: Wnt signaling pathway, 04340: Hedgehog signaling pathway, 04916: Melanogenesis, 05217: Basal cell carcinoma |
| 223773_s_at | -1,88 | | -2,01 | -2,89 | C1orf79 | chromosome 1 open reading frame 79 | |
| 223774_at | -1,85 | | -2,15 | -2,29 | C1orf79 | chromosome 1 open reading frame 79 | |
| 204840_s_at | 2,03 | | 2,05 | | EEA1 | early endosome antigen 1 | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 202422_s_at | 2,04 | | | 2,40 | ACSL4 | acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 | 00071: Fatty acid metabolism, 03320: PPAR signaling pathway, 04920: Adipocytokine signaling pathway |
| 203343_at | 2,28 | | | 2,22 | UGDH | UDP-glucose dehydrogenase | 00040: Pentose and glucuronate interconversions, 00053: Ascorbate and aldarate metabolism, 00500: Starch and sucrose metabolism, 00520: Nucleotide sugars metabolism |
| 204120_s_at | 2,69 | | | 2,99 | ADK | adenosine kinase | 00230: Purine metabolism |
| 210145_at | 2,05 | | | 2,05 | PLA2G4A | phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent) | 00564: Glycerophospholipid metabolism, 00565: Ether lipid metabolism, 00590: Arachidonic acid metabolism, 00591: Linoleic acid metabolism, 04010: MAPK signaling pathway, 04370: VEGF signaling pathway |
| 212417_at | 2,04 | | | 2,70 | SCAMP1 | secretory carrier membrane protein 1 | |
| 220238_s_at | 2,79 | | | 2,37 | KLHL7 | kelch-like 7 (Drosophila) | |
| 226158_at | 2,18 | | | 2,65 | KLHL24 | kelch-like 24 (Drosophila) | |
| 227539_at | 2,03 | | | 2,08 | | | |
| 218748_s_at | | 2,13 | | 2,04 | EXOC5 | exocyst complex component 5 | |
| 224046_s_at | | 2,05 | | 2,20 | PDE7A | phosphodiesterase 7A | 00230: Purine metabolism |
| 202589_at | | | 2,12 | 2,00 | TYMS | thymidylate synthetase | 00240: Pyrimidine metabolism, 00670: One carbon pool by folate |
| 221480_at | -2,08 | | | -2,19 | HNRPD | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa) | |
| 205569_at | | | -2,07 | -2,64 | LAMP3 | lysosomal-associated membrane protein 3 | |
| 205899_at | | | -2,08 | -2,83 | CCNA1 | cyclin A1 | 04110: Cell cycle, 05221: Acute myeloid leukemia |
| 206172_at | | | -2,41 | -3,09 | IL13RA2 | interleukin 13 receptor, alpha 2 | 04630: Jak-STAT signaling pathway |
| 233737_s_at | | | -2,38 | -2,62 | LOC284561 | hypothetical protein LOC284561 | |

**Tab. 33 Die Wirkung der kombinierten Behandlung mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) über drei Tage auf die Genexpressionsmuster von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218).**

Angegeben sind KEGG Pathways und GO-Kategorien, die Gene beinhalten, die durch die kombinierte Schwermetallbehandlung mindestens in den Kulturen von drei der vier Patienten induziert oder reprimiert wurden.

| **Überrepräsentierte KEGG Pathways** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Patient B214** | | **Patient B215** | | **Patient B218** | | **Patient B216** | |
| **KEGG-ID** | **Induziert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** |
| 100 | Biosynthesis of steroids | 8 | <0,001 | | | 10 | <0,001 | 11 | <0,001 |
| 900 | Terpenoid biosynthesis | 3 | 0,003 | | | 3 | 0,001 | 4 | <0,001 |
| 480 | Glutathione metabolism | 7 | 0,004 | 3 | 0,160 | 4 | 0,022 | 9 | <0,001 |
| | **Reprimiert** | | | | | | | | |
| 4110 | Cell cycle | 5 | 0,011 | 4 | 0,172 | 13 | 0,001 | 6 | 0,105 |
| | | | | | | | | | |
| **Überrepräsentierte biologische Prozesse (GO: biological processes)** | | | | | | | | | |
| **GO-ID** | **Induziert** | | | | | | | | |
| GO:0006512 | ubiquitin cycle | 33 | 0,008 | 22 | 0,025 | 14 | 0,113 | 27 | 0,056 |
| GO:0008202 | steroid metabolic process | 23 | <0,001 | | | 18 | <0,001 | 25 | <0,001 |
| GO:0044255 | cellular lipid metabolic process | 48 | <0,001 | 23 | 0,142 | 31 | <0,001 | 56 | <0,001 |
| GO:0065003 | macromolecular complex assembly | 37 | 0,013 | 24 | 0,046 | | | 32 | 0,041 |
| GO:0022607 | cellular component assembly | 37 | 0,031 | 26 | 0,033 | | | 34 | 0,037 |
| GO:0006629 | lipid metabolic process | 55 | <0,001 | 27 | 0,175 | 36 | <0,001 | 63 | <0,001 |
| GO:0016126 | sterol biosynthetic process | 9 | <0,001 | | | 10 | <0,001 | 11 | <0,001 |
| GO:0008610 | lipid biosynthetic process | 27 | <0,001 | | | 21 | <0,001 | 36 | <0,001 |
| GO:0006694 | steroid biosynthetic process | 13 | <0,001 | | | 12 | <0,001 | 18 | <0,001 |
| GO:0016125 | sterol metabolic process | 14 | <0,001 | | | 13 | <0,001 | 14 | <0,001 |
| GO:0045934 | negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic | 22 | 0,0444 | 16 | 0,038 | 12 | 0,043 | 22 | 0,020 |

| | acid metabolic process | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GO:0006066 | alcohol metabolic process | 26 | 0,002 | | | 16 | 0,001 | 34 | <0,001 |
| | | **Patient B214** | | **Patient B215** | | **Patient B218** | | **Patient B216** | |
| **GO-ID** | **Induziert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** |
| GO:0006695 | cholesterol biosynthetic process | 5 | 0,007 | | | 7 | <0,001 | 6 | 0,001 |
| GO:0031324 | negative regulation of cellular metabolic process | 25 | 0,033 | 18 | 0,031 | 13 | 0,049 | 24 | 0,023 |
| GO:0008203 | cholesterol metabolic process | 10 | 0,004 | | | 10 | <0,001 | 9 | 0,007 |
| GO:0006732 | coenzyme metabolic process | 11 | 0,150 | 15 | <0,001 | 8 | 0,026 | 21 | <0,001 |
| GO:0006888 | ER to Golgi vesicle-mediated transport | 13 | <0,001 | 12 | <0,001 | | | 8 | 0,035 |
| GO:0048193 | Golgi vesicle transport | 16 | <0,001 | 14 | <0,001 | 6 | 0,051 | 12 | 0,007 |
| GO:0006979 | response to oxidative stress | 6 | 0,098 | 6 | 0,018 | 4 | 0,058 | 12 | <0,001 |
| GO:0006749 | glutathione metabolic process | 4 | 0,002 | 2 | 0,051 | 2 | 0,027 | 5 | <0,001 |
| GO:0006916 | anti-apoptosis | 14 | 0,032 | 16 | <0,001 | 6 | 0,167 | 13 | 0,035 |
| GO:0031365 | N-terminal protein amino acid modification | | | | | | | 3 | 0,021 |
| GO:0015718 | monocarboxylic acid transport | 3 | 0,026 | 4 | 0,001 | 2 | 0,036 | 4 | 0,003 |
| GO:0043069 | negative regulation of programmed cell death | 16 | 0,053 | 16 | 0,001 | 9 | 0,048 | 15 | 0,052 |
| GO:0008283 | cell proliferation | | | 36 | 0,004 | 27 | 0,004 | 48 | 0,002 |
| GO:0006534 | cysteine metabolic process | 2 | 0,024 | 2 | 0,011 | 1 | 0,113 | 2 | 0,020 |
| GO:0015734 | taurine transport | 1 | 0,051 | 1 | 0,034 | 1 | 0,024 | 1 | 0,047 |
| GO:0035227 | regulation of glutamate-cysteine ligase activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,034 | | | 1 | 0,047 |
| | **Reprimiert** | | | | | | | | |
| GO:0044238 | primary metabolic process | 96 | 0,012 | | | 401 | <0,001 | 240 | 0,001 |
| GO:0008152 | metabolic process | 102 | 0,020 | | | 428 | <0,001 | 260 | 0,001 |
| GO:0006139 | nucleobase. Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process | 52 | 0,020 | | | 216 | <0,001 | 131 | 0,001 |
| GO:0007049 | cell cycle | 22 | <0,001 | 29 | 0,007 | 68 | <0,001 | 36 | 0,016 |
| GO:0016070 | RNA metabolic process | 41 | 0,027 | | | 168 | <0,001 | 105 | 0,001 |
| GO:0048730 | epidermis morphogenesis | 5 | <0,001 | 3 | 0,042 | 5 | 0,028 | | |
| GO:0000074 | regulation of progression through cell cycle | | | 20 | 0,009 | 37 | 0,011 | 27 | 0,004 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GO:0051726 | regulation of cell cycle | | | 20 | 0,010 | 37 | 0,013 | 27 | 0,005 |
| GO:0000278 | mitotic cell cycle | 11 | <0,001 | 15 | 0,001 | 25 | 0,002 | 13 | 0,073 |
| GO:0007067 | mitosis | 9 | 0,001 | 12 | 0,002 | 21 | 0,001 | 9 | 0,163 |
| GO:0000087 | M phase of mitotic cell cycle | 9 | 0,001 | 12 | 0,002 | 21 | 0,001 | 9 | 0,170 |
| | | **Patient B214** | | **Patient B215** | | **Patient B218** | | **Patient B216** | |
| **GO-ID** | **Reprimiert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** |
| GO:0000279 | M phase | 9 | 0,003 | 12 | 0,010 | 23 | 0,003 | | |
| GO:0007346 | regulation of progression through mitotic cell cycle | 3 | 0,004 | 3 | 0,019 | 3 | 0,137 | 3 | 0,046 |
| | | | | | | | | | |
| **Überrepräsentierte Funktionen auf molekularer Ebene (GO: molecular functions)** | | | | | | | | | |
| | **Induziert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** |
| GO:0005515 | protein binding | 369 | <0,001 | 252 | <0,001 | 155 | 0,145 | 335 | <0,001 |
| GO:0016491 | oxidoreductase activity | 40 | 0,160 | 30 | 0,039 | 27 | 0,003 | 73 | <0,001 |
| GO:0016229 | steroid dehydrogenase activity | 5 | 0,003 | 3 | 0,025 | 5 | <0,001 | 4 | 0,012 |
| GO:0047115 | trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase activity | 3 | <0,001 | 2 | 0,003 | 3 | <0,001 | 3 | <0,001 |
| GO:0000287 | magnesium ion binding | 28 | 0,024 | | | 16 | 0,012 | 24 | 0,050 |
| GO:0004033 | aldo-keto reductase activity | 3 | 0,021 | | | 4 | <0,001 | 5 | <0,001 |
| GO:0031406 | carboxylic acid binding | 4 | <0,001 | 2 | 0,026 | 3 | 0,001 | 2 | 0,048 |
| GO:0032052 | bile acid binding | 2 | 0,003 | 2 | 0,001 | 2 | 0,001 | 2 | 0,002 |
| GO:0047026 | 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (A-specific) activity | 2 | 0,003 | 1 | 0,063 | 2 | 0,001 | 2 | 0,002 |
| GO:0004357 | glutamate-cysteine ligase activity | 2 | 0,003 | 2 | 0,001 | 1 | 0,046 | 2 | 0,002 |
| GO:0003955 | NAD(P)H dehydrogenase (quinone) activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,032 | 1 | 0,023 | 1 | 0,046 |
| GO:0005368 | taurine transmembrane transporter activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,032 | 1 | 0,023 | 1 | 0,046 |
| GO:0005369 | Taurine sodium symporter activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,032 | 1 | 0,023 | 1 | 0,046 |
| GO:0030290 | sphingolipid activator protein activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,032 | 1 | 0,023 | 1 | 0,046 |
| GO:0030429 | kynureninase activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,032 | 1 | 0,023 | 1 | 0,046 |
| GO:0032440 | 2-alkenal reductase activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,032 | 1 | 0,023 | 1 | 0,046 |
| GO:0047006 | 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,032 | 1 | 0,023 | 1 | 0,046 |
| GO:0047522 | 15-oxoprostaglandin 13-oxidase activity | 1 | 0,051 | 1 | 0,032 | 1 | 0,023 | 1 | 0,046 |

| | **Reprimiert** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GO:0005515 | protein binding | 103 | <0,001 | 159 | 0,029 | 389 | <0,001 | 222 | 0,022 |
| GO:0003723 | RNA binding | 16 | 0,005 | | | 59 | <0,001 | 39 | <0,001 |
| GO:0005198 | structural molecule activity | 14 | 0,024 | | | 45 | 0,019 | 30 | 0,025 |
| | | **Patient B214** | | **Patient B215** | | **Patient B218** | | **Patient B216** | |
| **GO-ID** | **Reprimiert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** | **n** | **p-Wert** |
| GO:0000166 | nucleotide binding | 38 | 0,001 | | | 145 | <0,001 | 75 | 0,032 |
| GO:0003676 | nucleic acid binding | 46 | 0,036 | 76 | 0,117 | 192 | <0,001 | 138 | <0,001 |
| GO:0016505 | apoptotic protease activator activity | 2 | 0,016 | 2 | 0,050 | 5 | 0,001 | | |
| GO:0016504 | protease activator activity | 2 | 0,018 | 2 | 0,055 | 5 | 0,001 | | |
| GO:0004857 | enzyme inhibitor activity | 8 | 0,007 | 12 | 0,007 | 21 | 0,008 | | |
| | | | | | | | | | |
| **Überrepräsentierte Zellbestandteile (GO: cellular component)** | | | | | | | | | |
| **GO-ID** | **Induziert** | | | | | | | | |
| GO:0005783 | endoplasmic reticulum | 76 | <0,001 | 49 | <0,001 | 24 | 0,043 | 60 | <0,001 |
| GO:0012505 | endomembrane system | 42 | <0,001 | 24 | 0,002 | 13 | 0,088 | 29 | 0,006 |
| GO:0017109 | glutamate-cysteine ligase complex | 2 | 0,003 | 2 | 0,001 | 1 | 0,045 | 2 | 0,002 |
| | **Reprimiert** | | | | | | | | |
| GO:0043231 | intracellular membrane-bound organelle | 71 | 0,047 | 129 | 0,032 | 331 | <0,001 | 196 | <0,001 |
| GO:0044428 | nuclear part | 20 | 0,002 | | | 88 | <0,001 | 38 | 0,017 |
| GO:0005634 | nucleus | 48 | 0,013 | 84 | 0,010 | 218 | <0,001 | 131 | <0,001 |
| GO:0000775 | Chromosome, pericentric region | 4 | 0,009 | 6 | 0,004 | 7 | 0,049 | | |
| GO:0005763 | mitochondrial small ribosomal subunit | 1 | 0,175 | 2 | 0,049 | 4 | 0,006 | 3 | 0,013 |

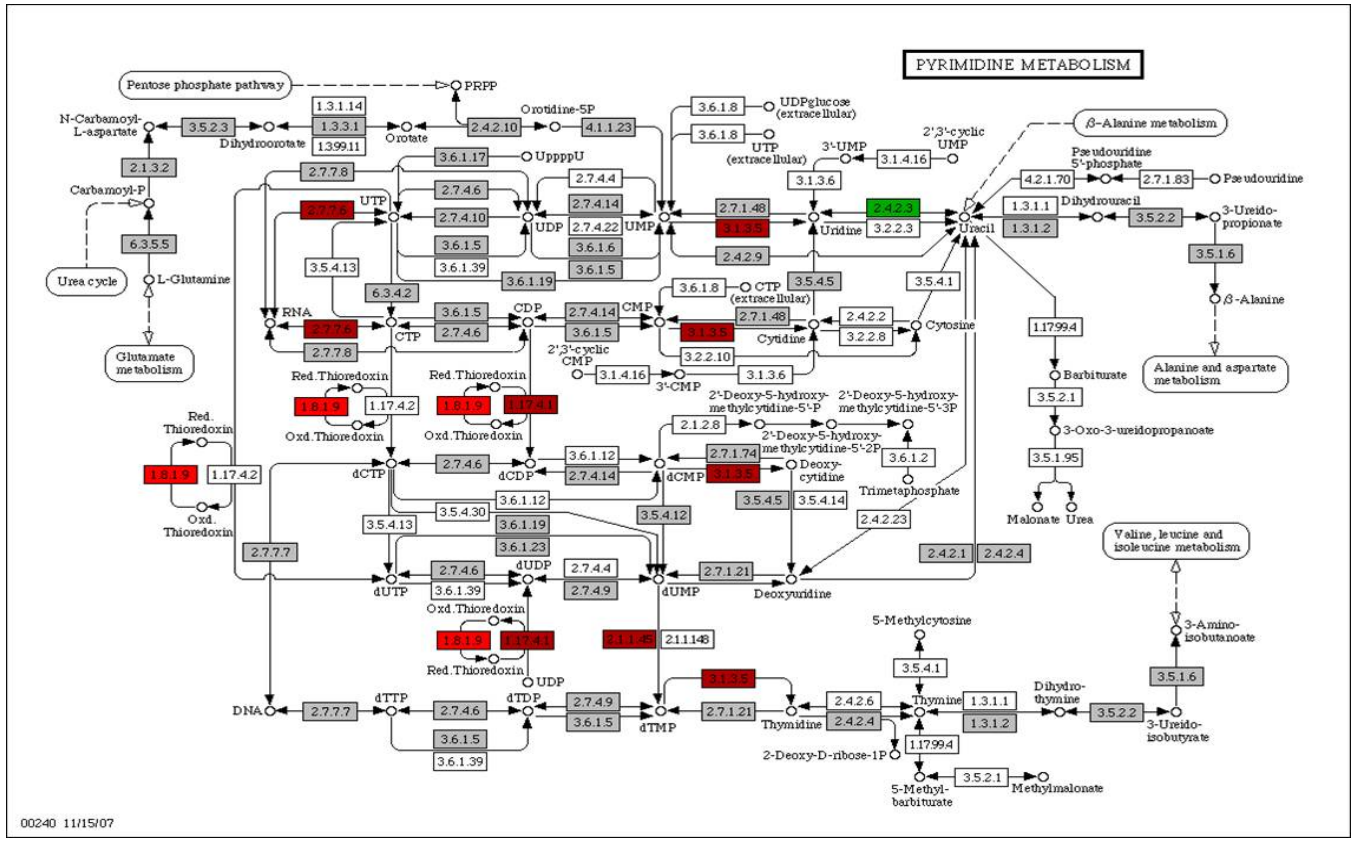



**Abb. 54 Schematischen Darstellung der Gene des Pyrimidinmetabolismus, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination in NHBE-Zellen moduliert waren, mittels KEGG Pathway.**

Kulturen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) wurden für drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination behandelt. Dunkelrot markierte Gene sind in den behandelten Kulturen von zwei der vier Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Hellrot markierte Gene sind mindestens in den Kulturen von drei Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Ebenso sind die dunkelgrün markierten Gene in den behandelten Kulturen von zwei der vier Patienten mindestens um das Zweifache reprimiert. Hellgrün markierte Gene sind dementsprechend in den Kulturen von drei der vier Patienten reprimiert.

**Tab. 34 Gene des Pyrimidinmetabolismus, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren (zu Abb. 54).**

Zur Erläuterung der Farben vgl. Legende zu Abb. 54.

| EC-Nummer: | Symbol: | Name: |
|---|---|---|
| 1.8.1.9 | TXNRD2 | thioredoxin-disulfide reductase 2 |
| 2.7.7.6 | POLR3F | DNA-directed RNA polymerase subunit C34 |
| 3.1.3.5 | 5'-AMPase | 5'-ribonucleotide phosphohydrolase |
| 1.17.4.1 | RRM2B | ribonucleotide reductase, class II |
| 2.1.1.45 | TYMS | thymidylate synthase |
| 2.4.2.3 | UPP2 | uridine phosphorylase 2 |

**Tab. 35 Gene des Purinmetabolismus, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren (zu Abb. 55).**

Zur Erläuterung der Farben vgl. Legende zu Abb. 55.

| EC-Nummer: | Symbol: | Name: |
|---|---|---|
| 3.1.4.17 | PDE | 3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase |
| 2.7.7.6 | POLR3F | DNA-directed RNA polymerase subunit C34 |
| 1.17.4.1 | RRM2B | ribonucleotide reductase, class II |
| 2.7.1.20 | ADK | adenosine kinase |
| 3.1.3.5 | 5'-AMPase | 5'-ribonucleotide phosphohydrolase |
| 2.4.2.3 | UPP2 | uridine phosphorylase 2 |

**Tab. 36 Gene der Steroidbiosynthese, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren (zu Abb. 56).**

Zur Erläuterung der Farben vgl. Legende zu Abb. 56.

| EC-Nummer: | Symbol: | Name: |
|---|---|---|
| 5.3.3.2 | | isopentenyl-diphosphate Δ-isomerase |
| 1.1.1.34 | | hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) |
| 1.6.5.2 | NQO1 | NADH:quinone oxidoreductase |
| 1.14.99.7 | | squalene epoxidase |
| 2.5.1.21 | FDFT1 | farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 |
| 1.14.13.70 | CYP51A1 | cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1 |
| 1.14.13.72 | SC4MOL | methylsterol monooxygenase |
| 1.14.21.6 | SC5DL, STE1 | lathosterol oxidase |
| 1.3.1.21 | DHCR7, DWF5 | 7-dehydrocholesterol reductase |

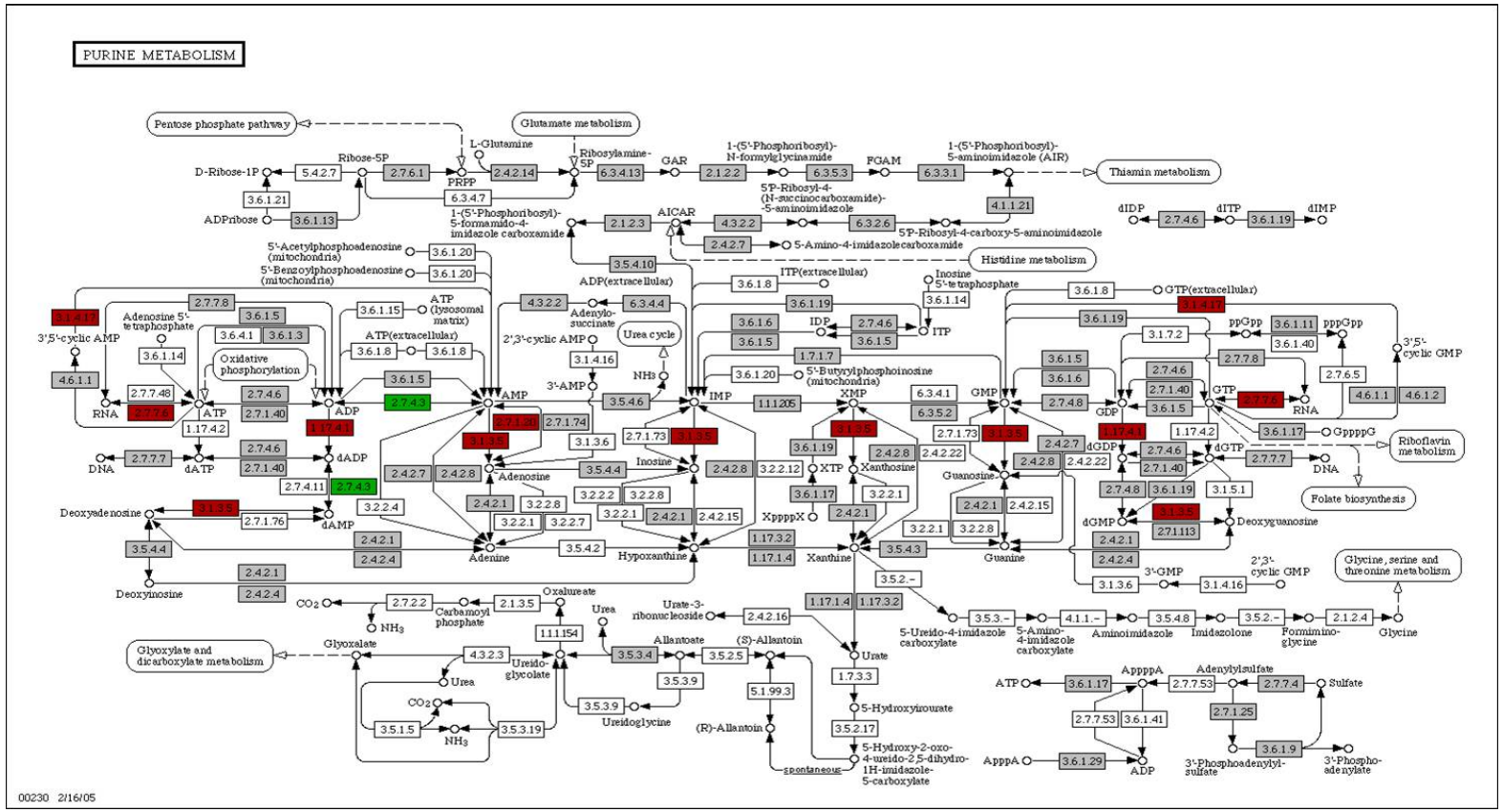



**Abb. 55 Schematischen Darstellung der Gene des Purinmetabolismus, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination in NHBE-Zellen moduliert waren, mittels KEGG Pathway.**

Kulturen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) wurden für drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination behandelt. Dunkelrot markierte Gene sind in den behandelten Kulturen von zwei der vier Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Hellrot markierte Gene sind mindestens in den Kulturen von drei Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Ebenso sind die dunkelgrün markierten Gene in den behandelten Kulturen von zwei der vier Patienten mindestens um das Zweifache reprimiert. Hellgrün markierte Gene sind dementsprechend in den Kulturen von drei der vier Patienten reprimiert.

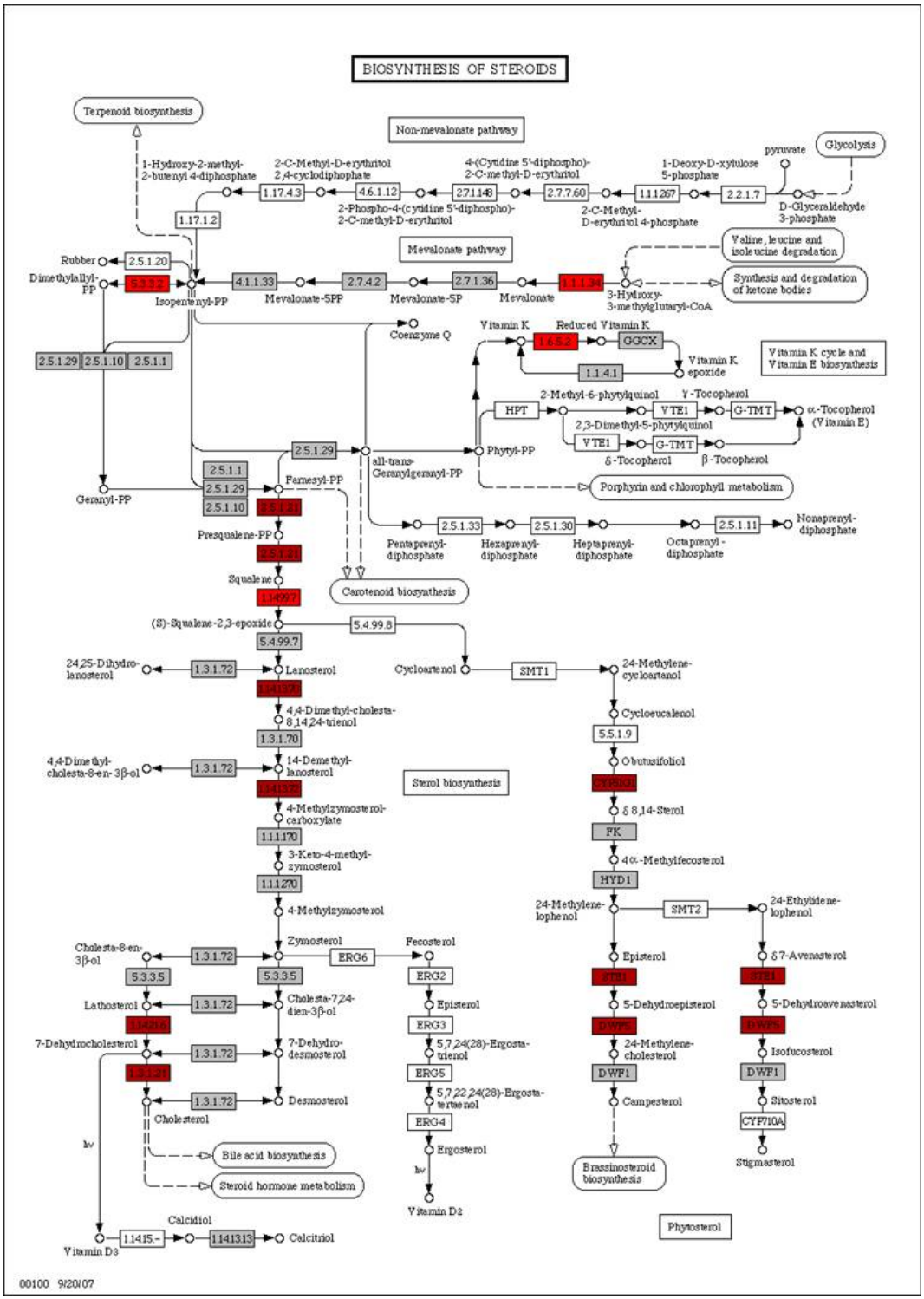
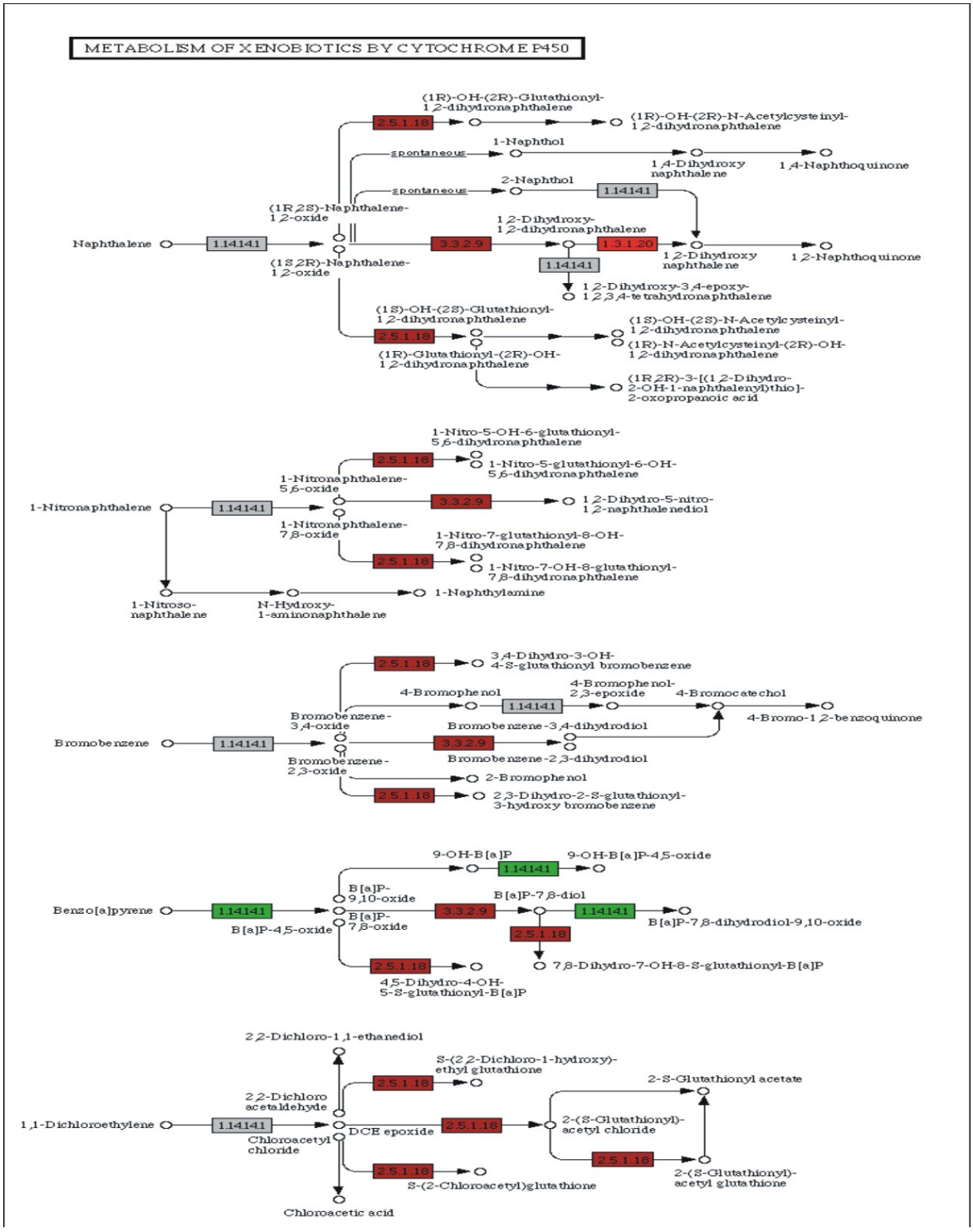



**Abb. 56 Schematischen Darstellung der Gene der Steroidbiosynthese, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren, mittels KEGG Pathway.**

NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) wurden über drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination behandelt. Dunkelrot markierte Gene sind in den behandelten Kulturen von zwei der vier Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Hellrot markierte Gene sind mindestens in den Kulturen von drei Patienten mindestens um das Zweifache induziert.

a)


METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME P450
(1R)-OH-(2R)-Glutathionyl-1,2-dihydronaphthalene
2.5.1.18
(1R)-OH-(2R)-N-Acetylcysteinyl-1,2-dihydronaphthalene
1-Naphthol
spontaneous
1,4-Dihydroxy naphthalene
1,4-Naphthoquinone
2-Naphthol
spontaneous
1.14.14.1
(1R,2S)-Naphthalene-1,2-oxide
1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene
Naphthalene
1.14.14.1
3.3.2.9
1.3.1.20
1,2-Dihydroxy naphthalene
1,2-Naphthoquinone
(1S,2R)-Naphthalene-1,2-oxide
1.14.14.1
1,2-Dihydroxy-3,4-epoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene
(1S)-OH-(2S)-Glutathionyl-1,2-dihydronaphthalene
2.5.1.18
(1S)-OH-(2S)-N-Acetylcysteinyl-1,2-dihydronaphthalene
(1R)-N-Acetylcysteinyl-(2R)-OH-1,2-dihydronaphthalene
(1R)-Glutathionyl-(2R)-OH-1,2-dihydronaphthalene
(1R,2R)-3-[(1,2-Dihydro-2-OH-1-naphthalenyl)thio]-2-oxopropanoic acid
1-Nitro-5-OH-6-glutathionyl-5,6-dihydronaphthalene
2.5.1.18
1-Nitro-5-glutathionyl-6-OH-5,6-dihydronaphthalene
1-Nitronaphthalene-5,6-oxide
1-Nitronaphthalene
1.14.14.1
3.3.2.9
1,2-Dihydro-5-nitro-1,2-naphthalenediol
1-Nitronaphthalene-7,8-oxide
1-Nitro-7-glutathionyl-8-OH-7,8-dihydronaphthalene
2.5.1.18
1-Nitro-7-OH-8-glutathionyl-7,8-dihydronaphthalene
1-Nitroso-naphthalene
N-Hydroxy-1-aminonaphthalene
1-Naphthylamine
2.5.1.18
3,4-Dihydro-3-OH-4-S-glutathionyl bromobenzene
4-Bromophenol
4-Bromophenol-2,3-epoxide
4-Bromocatechol
1.14.14.1
4-Bromo-1,2-benzoquinone
Bromobenzene-3,4-oxide
Bromobenzene-3,4-dihydrodiol
Bromobenzene
1.14.14.1
3.3.2.9
Bromobenzene-2,3-oxide
Bromobenzene-2,3-dihydrodiol
2-Bromophenol
2.5.1.18
2,3-Dihydro-2-S-glutathionyl-3-hydroxy bromobenzene
9-OH-B[a]P
9-OH-B[a]P-4,5-oxide
1.14.14.1
B[a]P-9,10-oxide
B[a]P-7,8-diol
Benzo[a]pyrene
1.14.14.1
3.3.2.9
1.14.14.1
B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-oxide
B[a]P-4,5-oxide
B[a]P-7,8-oxide
2.5.1.18
2.5.1.18
7,8-Dihydro-7-OH-8-S-glutathionyl-B[a]P
4,5-Dihydro-4-OH-5-S-glutathionyl-B[a]P
2,2-Dichloro-1,1-ethanediol
S-(2,2-Dichloro-1-hydroxy)-ethyl glutathione
2.5.1.18
2-S-Glutathionyl acetate
2,2-Dichloro acetaldehyde
1,1-Dichloroethylene
1.14.14.1
DCE epoxide
2.5.1.18
2-(S-Glutathionyl)-acetyl chloride
Chloroacetyl chloride
2.5.1.18
2.5.1.18
2-(S-Glutathionyl)-acetyl glutathione
S-(2-Chloroacetyl)glutathione
Chloroacetic acid

b)

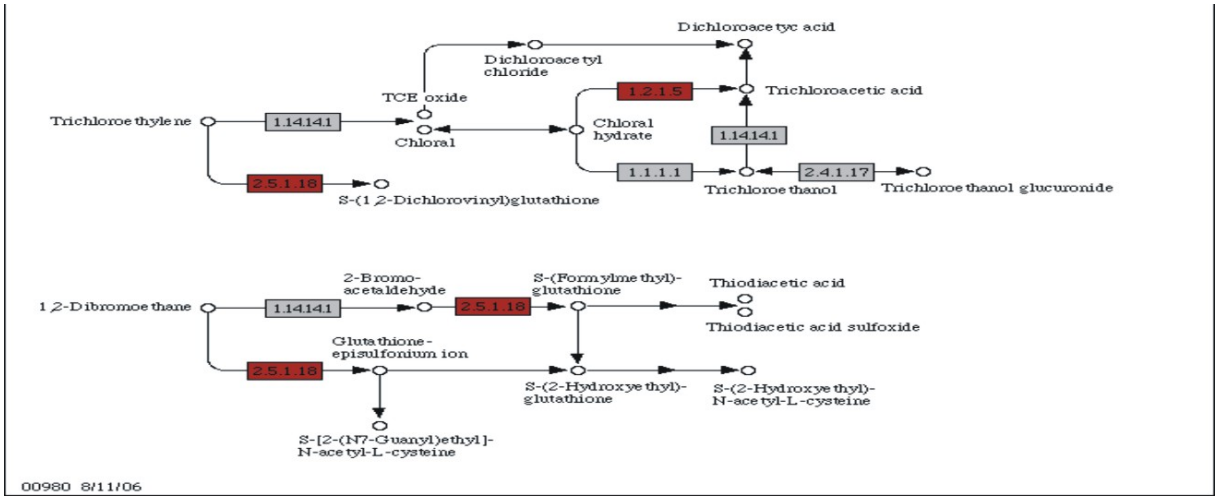



**Abb. 57 Schematischen Darstellung der Cytochrom P450 Enzyme, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren, mittels KEGG Pathway.**

a) erster Teil und b) zweiter Teil des KEGG-Pathways. NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215, B216 und B218) wurden über drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination behandelt. Dunkelrot markierte Gene sind in den behandelten Kulturen von zwei der vier Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Hellrot markierte Gene sind mindestens in den Kulturen von drei Patienten mindestens um das Zweifache induziert. Ebenso sind die dunkelgrün markierten Gene in den behandelten Kulturen von zwei der vier Patienten mindestens um das Zweifache reprimiert. Hellgrün markierte Gene sind dementsprechend in den Kulturen von drei der vier Patienten reprimiert.

**Tab. 37 Cytochrom P450 Enzyme, welche nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination moduliert waren (zu Abb. 57).**

Zur Erläuterung der Farben vgl. Legende zu Abb. 57.

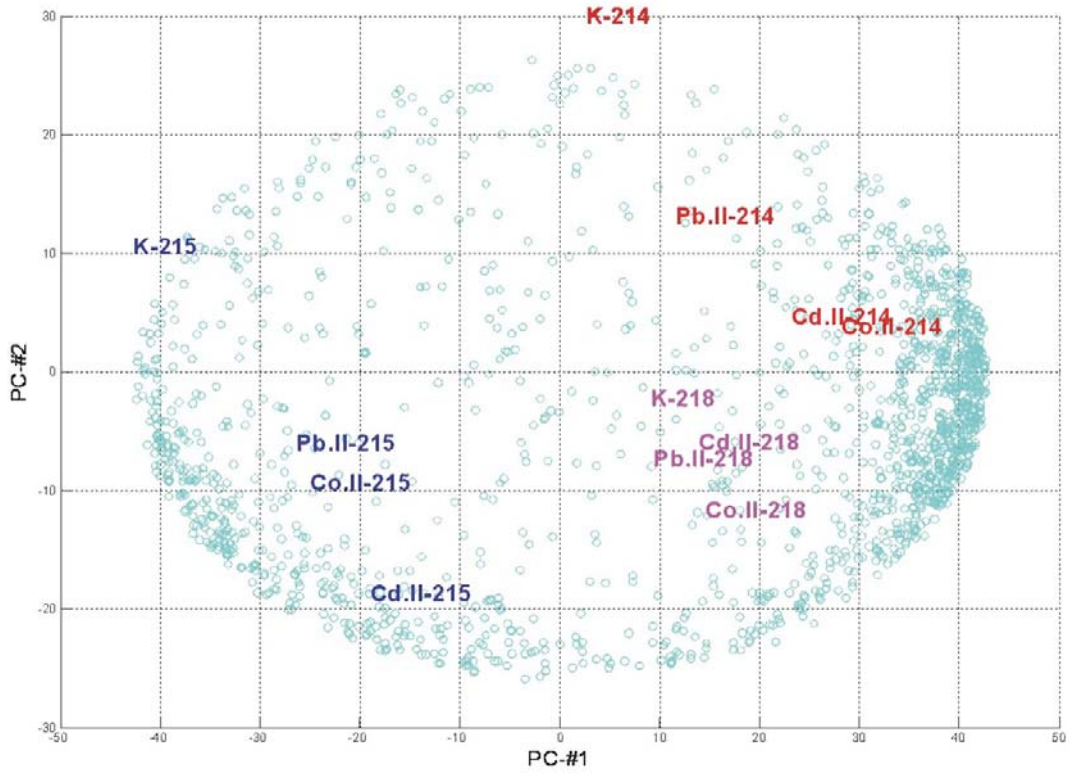
| EC-Nummer: | Symbol: | Name: |
|---|---|---|
| 1.3.1.20 | | trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase |
| 2.5.1.18 | GST | glutathione S-transferase |
| 3.3.2.9 | EPHX1 | microsomal epoxide hydrolase |
| 1.2.1.5 | ALDH | aldehyde dehydrogenase |
| 1.14.14.1 | CYP1A1 | cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 |

**Tab. 38 Promotoranalyse zur Ermittlung der Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an der Regulation der modulierten Genen in den mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination behandelten Kulturen beteiligt sind.**

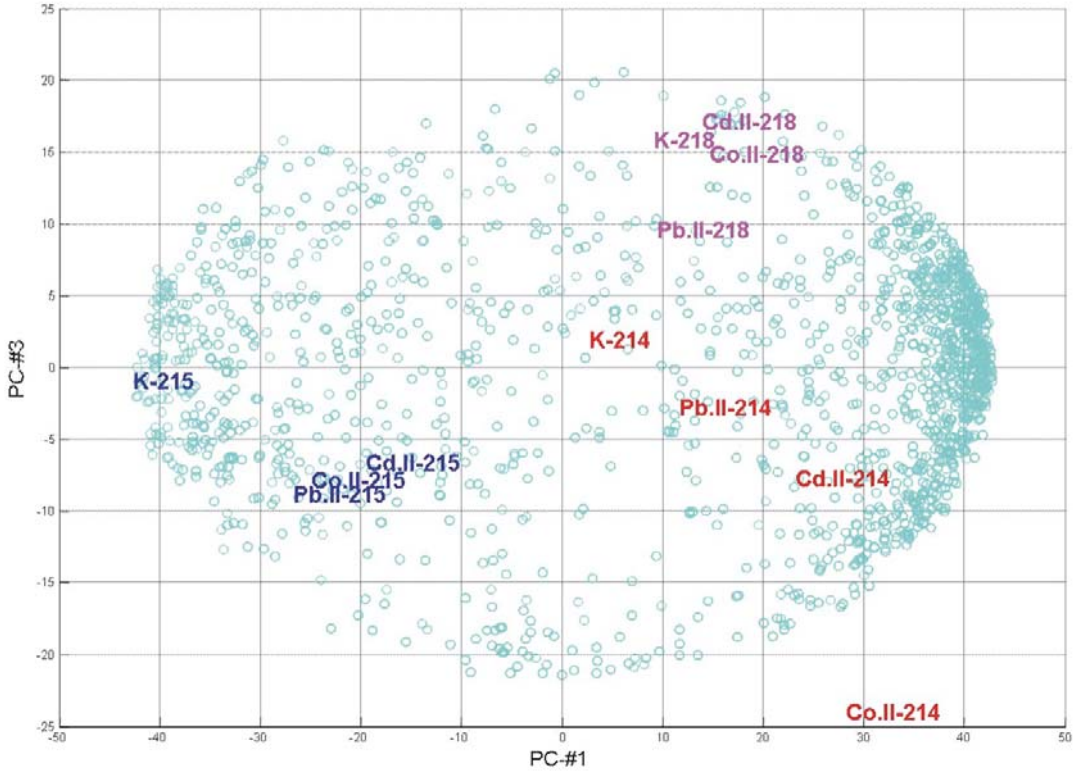
Die NHBE-Zellen wurden über drei Tage mit 15 µg/l Cd(II), 25 µg/l Co(II) und 550 µg/l Pb(II) in Kombination behandelt. Angegeben sind Transkriptionsfaktoren deren Bindungsstellen in den Promotorregionen der in den behandelten Kulturen induzierten oder reprimierten Gene im Vergleich zu den Promotoren des Genexpressionsmusters der unbehandelten Kulturen in mindestens zwei der vier Patienten überrepräsentiert sind. Dabei zeigen die rot dargestellten Werte eine Überrepräsentation in den induzierten Genen an und die grün dargestellten eine Überrepräsentation in den reprimierten Genen. „ns“ = nicht signifikant.

| Trans-kriptions-faktor | p-Werte | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Patienten | | | |
| | **B 214** | **B215** | **B216** | **B218** |
| Oct-1 | 0,015 | 0,011 | 0,007 | 0,008 |
| Elk-1 | ns | 0,004 | 0,012 | <0,001 |
| GABP | ns | 0,005 | 0,004 | 0,031 |
| ATF | ns | 0,034 | 0,012 | 0,002 |
| HIC1 | 0,048 | ns | 0,004 | <0,001 |
| YY1 | ns | 0,047 | 0,047 | 0,003 |
| TGIF | ns | ns | 0,006 | 0,002 |
| CREB | ns | ns | 0,014 | 0,007 |
| SRY | 0,002 | ns | 0,042 | ns |
| ATF4 | 0,039 | ns | 0,012 | ns |
| UF1H3beta | 0,036 | ns | ns | 0,027 |
| SRF | 0,043 | 0,038 | ns | ns |

a)


K-214
Pb.II-214
K-215
Cd.II-214
Co.II-214
K-218
Pb.II-215
Cd.II-218
Pb.II-218
Co.II-215
Co.II-218
Cd.II-215
PC-#2
PC-#1

b)


Cd.II-218
K-218
Co.II-218
Pb.II-218
K-214
K-215
Pb.II-214
Cd.II-215
Co.II-215
Cd.II-214
Pb.II-215
Co.II-214
PC-#3
PC-#1

c)

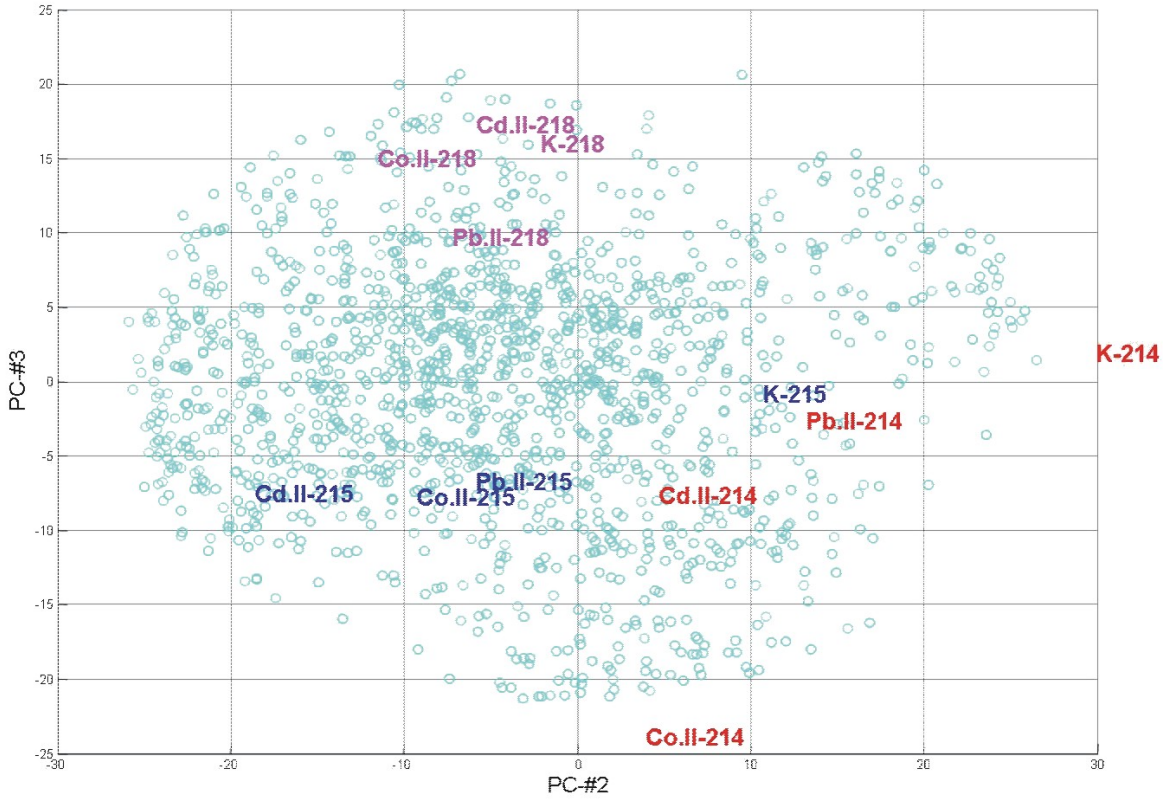



**Abb. 58 Hauptkomponentenanalyse basierend auf jeweils zwei der ersten drei Hauptkomponenten der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215 und B218) nach Inkubation entweder mit Cd(II), Co(II) oder Pb(II) für drei Tage.**

NHBE-Zellen wurden über drei Tage entweder mit 15 µg/l Cd(II) „Cd II“, 25 µg/l Co(II) „Co II“ oder 550 µg/l Pb(II) „Pb II“ inkubiert. Die unbehandelten Kontrollen sind mit „K“ bezeichnet. Die Hauptkomponentenanalyse basierte auf 1531 Probenpaar-Sets, die sich in einem von 66 möglichen paarweisen Vergleichen um mindestens das Vierfache unterschieden.

a) #PC-1: Hauptkomponente Nr. 1; #PC-2: Hauptkomponente Nr. 2

b) #PC-1: Hauptkomponente Nr. 1; #PC-3: Hauptkomponente Nr. 3

c) #PC-2: Hauptkomponente Nr. 2; #PC-3: Hauptkomponente Nr. 3

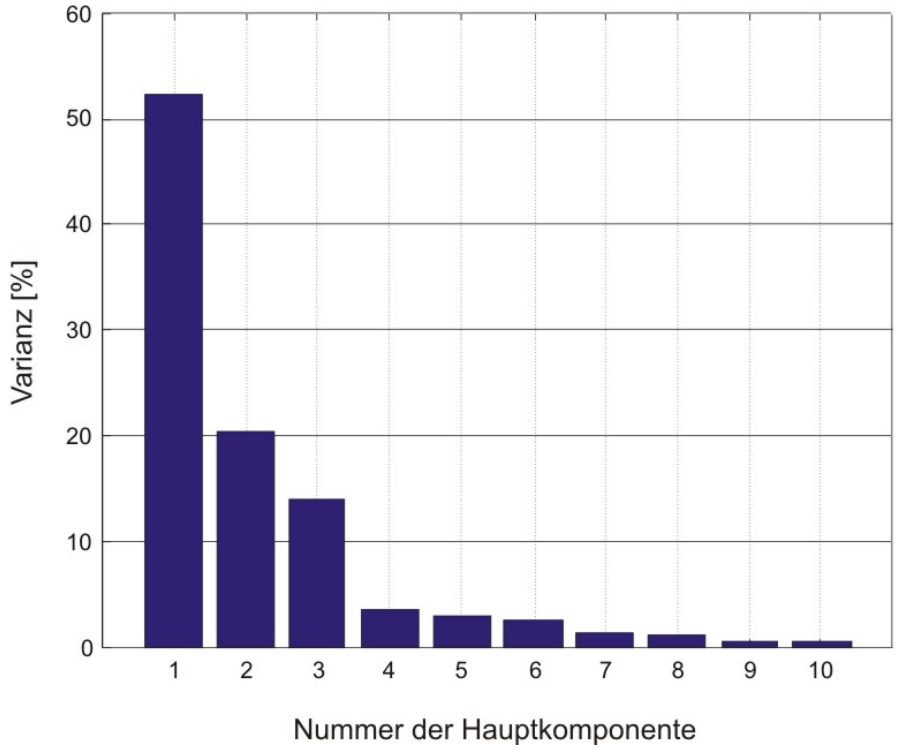



**Abb. 59 Erklärte Varianz durch die einzelnen Hauptkomponenten der Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsdaten von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215 und B218) nach Inkubation entweder mit Cd(II), Co(II) oder Pb(II) für drei Tage.**

Die ersten drei Hauptkomponenten erklären 86,1 % der Varianz.

**Tab. 39 Gene deren Expression in Kulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215 und B218) mindestens um das Zweifache verändert war nach Behandlung mit Pb(II) über drei Tage, nicht jedoch nach Inkubation mit Cd(II) oder Co(II).**

| | Faktor der Induktion | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Patient | | | | | | | | | | | |
| | B 214 | | | B215 | | | B218 | | | | | |
| Proben ID | Cd | Co | Pb | Cd | Co | Pb | Cd | Co | Pb | Symbol | Bezeichnung | KEGG-Pathway |
| 1562102_at | | | 2,03 | | | 2,16 | | | 5,79 | AKR1C1 | aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase) | 00980: Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 |
| 202242_at | | | 3,84 | | | 2,41 | | | 3,03 | TSPAN7 | tetraspanin 7 | |
| 241418_at | | | 3,00 | | | 2,49 | | | 2,15 | LOC344887 | similar to NmrA-like family domain containing 1 | |
| 202922_at | | | 2,24 | | | 2,12 | | | 1,99 | GCLC | glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit | 00251: Glutamate metabolism, 00480: Glutathione metabolism |
| 206561_s_at | | | 2,52 | | | | | | 3,97 | AKR1B10 | aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) | 00051: Fructose and mannose metabolism, 00052: Galactose metabolism, 00120: Bile acid biosynthesis, 00260: Glycine, serine and threonine metabolism, 00310: Lysine degradation, 00363: Bisphenol A degradation, 00591: Linoleic acid metabolism, 00625: Tetrachloroethene degradation, 00650: Butanoate metabolism |
| 213397_x_at | | | 2,20 | | | | | | 2,02 | ANG | angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 | |
| 218723_s_at | | | 3,32 | | | 1,69 | | | 3,39 | C13orf15 | chromosome 13 open reading frame 15 | |

**Tab. 40 Gene deren Expression in Kulturen von NHBE-Zellen (Patienten: B214, B215 und B218) mindestens um das Zweifache verändert war nach Behandlung mit Cd(II) über drei Tage, nicht jedoch nach Inkubation mit Pb(II) oder Co(II).**

| | Faktor der Induktion | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | B214 | | | B215 | | | B218 | | | | |
| **Probe-ID** | **Cd** | **Co** | **Pb** | **Cd** | **Co** | **Pb** | **Cd** | **Co** | **Pb** | **Symbol** | **Bezeichnung** |
| 209258_s_at | 2,69 | | | 2,49 | | | 1,56 | | | SMC3 | structural maintenance of chromosomes 3 |
| 236429_at | | | | 2,56 | | | 2,01 | | | ZNF83 | zinc finger protein 83 |

**Tab. 41 Gene deren Expression moduliert war in Kulturen von NHBE-Zellen (Pat.: B214, B215, 216 und B218) nach Behandlung mit Cd(II), Co(II) und Pb(II) in Kombination über 3 Tage, nicht jedoch nach Inkubation mit Cd(II), Co(II) oder Pb(II) allein.**

| | Patient (Faktor der Expressionsänderung) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probe-ID** | **B214** | **B215** | **B218** | **B216** | **Symbol** | **Bezeichnung** | **KEGG-Pathway** |
| 217188_s_at | 1,83 | 2,04 | | 3,65 | C14orf1 | chromosome 14 open reading frame 1 | |
| 204840_s_at | 2,03 | | 2,05 | | EEA1 | early endosome antigen 1 | |
| 212417_at | 2,04 | | | 2,70 | SCAMP1 | secretory carrier membrane protein 1 | |
| 220238_s_at | 2,79 | | | 2,37 | KLHL7 | kelch-like 7 (Drosophila) | |
| 218748_s_at | | 2,13 | | 2,04 | EXOC5 | exocyst complex component 5 | |
| 202589_at | | | 2,12 | 2,00 | TYMS | thymidylate synthetase | 00240: Pyrimidine metabolism, 00670: One carbon pool by folate |
| 205569_at | | | -2,07 | -2,64 | LAMP3 | lysosomal-associated membrane protein 3 | |
| 205899_at | | | -2,08 | -2,83 | CCNA1 | cyclin A1 | 04110: Cell cycle, 05221: Acute myeloid leukemia |
| 206172_at | | | -2,41 | -3,09 | IL13RA2 | interleukin 13 receptor, alpha 2 | 04630: Jak-STAT signaling pathway |
| 233737_s_at | | | -2,38 | -2,62 | LOC284561 | hypothetical protein LOC284561 | |

**Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidi Foth für die Überlassung des faszinierenden Forschungsthemas, die freundliche und umfassende Unterstützung bei der Bearbeitung desselbigen, sowie ausführliche Diskussionen.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß für die Betreuung dieser Arbeit, sein Interesse an ihrer Entwicklung und produktive Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. J. G. Hengstler (Leibniz-Institut für Arbeitsforschung (IfADo) an der TU Dortmund) danke ich herzlich für den Impuls zur Untersuchung von Lungenzellkulturen mittels Microarrays, sowie für die geduldige und zielführende Unterstützung in allen Phasen dieses Projekts.

Herrn Dr. R. Guthke und Herrn W. Schmidt-Heck vom Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. - Hans-Knöll-Institut (HKI), Abt. Molekulare und Angewandte Mikrobiologie, Jena, danke ich für die Analyse der Microarray-Daten.

Meinen Kollegen am Institut für Umwelttoxikologie danke ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und ihre stete Hilfsbereitschaft - ganz besonders Dr. Abdel-Rahman Torky und Jan Wiese für die Unterstützung bei der Fluoreszenzmikroskopie und dem Comet-Assay. Natürlich auch C. Regener, I. Martin und H. Auffarth. In diesem Zusammenhang möchte ich auch die Hilfe aller ehemaliger oder noch amtierender Technischer Assistentinnen nicht unerwähnt lassen. Ich danke: D. Funk, H. Grygier, T. Hensel, S. Herrmann, T. Röder, D. Schulz, C. Trümpler.

Dr. Dirk Wesenberg danke ich herzlich für ebenso umfangreiche wie produktive Kommentare zu dieser Arbeit, sowie für praktische Anregungen im Labor.

Ich danke Dr. Sarah Tonack (University of Liverpool, Department of Surgery and Oncology) herzlich für viele zielführende Labor-Tips und fundierte Gespräche zu den unterschiedlichsten Themen.

Dipl. Ing. Maria Morawietz (Fraunhofer-Institut für Werkstoffmechanik, Halle (Saale)) danke ich für die ebenso geduldige wie kompetente Unterstützung bei der Laserscanmikroskopie.

Meiner Mutter danke ich herzlich für die sprachliche Korrektur dieser Arbeit.
Meinen Eltern und meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis und den unverzichtbaren Rückhalt.

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.06.02 bis zum 28.02.06 durch das Philip Morris External Research Program finanziell unterstützt (Project No.: 312445).

## Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name: | Marc Felix Johannes Glahn |
| Geburtsdatum: | 02.01.1973 |
| Geburtsort: | München |

Ausbildung:

| | |
|---|---|
| 1985 - 1989 | Realschule in München |
| 1989 - 1990 | Ausbildung bei der Deutschen Bundesbahn in München |
| 1990 - 1994 | Gymnasium in München |
| 1994 - 1995 | Zivildienst in München |
| 1995 - 1996 | Fachhochschule München: Physikalische Technik |
| 1996 - 1998 | Ludwig-Maximilians-Universität München:<br>Grundstudium Lebensmittelchemie |
| 1998 - 2000 | Technische Universität München:<br>Hauptstudium Lebensmittelchemie |
| 29.11.2000 | 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker |
| 2001 - 2002 | Praktikum am Landesamt für das Gesundheitswesen und Lebensmittel-sicherheit Südbayern in Oberschleißheim bei München |
| 25.01.2002 | 2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker |
| 01.06.2002 bis 30.06.2008 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Institut für Umwelttoxikologie.<br>Assoziierter Kollegiat im DFG-Graduiertenkolleg 416 “Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe” |
| Seit 2003 | Weiterbildung zum Fachtoxikologen DGPT |
| Seit 01.09.2008 | Promotion und Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Mitglieds im Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU),<br>Frau Prof. Dr. Heidi Foth |

Halle (Saale), den 10.09.2009

Felix Glahn

## Publikationen

Originalartikel in Fachzeitschriften:

Stehfest E, Torky AR, Glahn F, Foth H. (2005) Non destructive micromethod for MRP1 functional assay in human lung tumor cells. Arch Toxicol 80(3):125–133

Torky A, Raemisch A, Glahn F, Foth H (2008) Arachidonic acid pathway activates multidrug resistance related protein in cultured human lung cells. Arch Toxicol. 82(5):323-32.

Strauss K, Scharpenberg H, Crewe RM, Glahn F, Foth H, Moritz RFA. (2008) The role of the queen mandibular gland pheromone in honeybees (Apis mellifera): honest signal or suppressive agent? Behavioral Ecology and Sociobiology 62(9):1523-1531

Glahn F, Schmidt-Heck W, Zellmer S, Guthke R, Wiese J, Golka K, Hergenröder R, Degen GH, Lehmann T, Hermes M, Schormann W, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Gebhardt R, Hengstler JG, Foth H. (2008) Cadmium, cobalt and lead cause stress response, cell cycle deregulation and increased steroid as well as xenobiotic metabolism in primary normal human bronchial epithelial cells which is coordinated by at least nine transcription factors.; Arch Toxicol. 82(8):513-24

Glahn F, Harders A, Wiese J, Thomas S, Torky AR, Foth H. Arsenite and human lung cell cultures - MRP-Transporters and other protective mechanisms. In Vorbereitung.

Glahn F, Harders A, Kerwien S, Wiese J, Torky AR, Foth H. The role of MRP-transporters in human lung cells exposed to Hg(II). In Vorbereitung

Publizierte Abstracts zu Vorträgen auf internationalen Kongressen:

Glahn F, Jambor M, Torky AW, Stehfest E, Hofmann S, Foth H. (2006) The effects of As(III), Cu(II) and Hg(II) on the expression of MRP-transporters in long-term cultures of normal human bronchial epithelial cells. 43rd Congress of the European Societies of Toxicology, 20.09.-24.09.2006 Cavtat / Croatia, Toxicology Letters 164S:12

Publizierte Abstracts zu Postern auf internationalen Kongressen:

Glahn F, Torky AW, Foth H. (2003) The effect of heavy metal ions on the expression of MRPs and UMAT in relation to the intracellular glutathione level. 41st Congress of the European Societies of Toxicology, 28.09.-¬01.10.2003 Florence / Italy, Toxicology Letters 144 Suppl. 1:516.

Glahn F, Torky AW, Simm C, Foth H. (2004) Localization of MRP-transporters in human lung cells and A549 cells transformation of S. pombe with the human ABC-halftransporter UMAT. Xth International Congress Toxicology / EUROTOX 2004, 11.07.-15.¬07.2004 Tampere / Finland, Toxicol Appl Pharmacol 197:304.

Glahn F, Torky AW, Stehfest E, Hofmann S, Foth H. (2005) The expression of MRP transporters ans UMAT in tumor cells and primary cultures of human cells exposed to heavy metals. 42st Congress of the European Societies of Toxicology, 11.09.-14.09.2005 Cracow / Poland. Toxicology Letters 158:168.

Glahn F, Jambor M, Torky A, Stehfest E, Hofmann S, Foth H. (2007) Modulation of MRP-transporters by heavy metals in human lung cells. 46th National Annual Meeting of the Society of Toxicology, Charlotte, North Carolina, USA, 25.-29.03.2007. The Toxicologist 96(1):228

Tuch TM, Franck U, Schilde M, Wilde M, Menzel V, Portius P, Foth H, Glahn F, Teupser D, Thiery J, Herbarth O. (2007) Modification of commercially available whole body exposure chambers for rodents for exposure to fine and ultrafine aerosols. European Aerosol Conference 09.-14.09.2007. Salzburg / Austria. Abstracts of the European Aerosol Conference

Glahn F, Wiese J, Torky A, Foth H (2009) Arsenic and human lung cell cultures – genotoxicity and effects on MRP-transporters. 48th National Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore, Maryland, USA, 15.-19.03.2009. The Toxicologist 108(1):366

Publizierte Abstracts zu Postern auf nationalen Kongressen:

Glahn F, Torky AW, Stehfest E, Foth H. (2003) Effects of metals on glutathione and expression of MRP and UMAT in human lung cells. 44th National Annual Meeting of Pharmacology and Toxicology 17.03.-¬20.2003 Mainz / Germany. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 367, R 156

Glahn F, Hofmann S, Foth H. (2004) Effect of metal-induced stress on the expression of MRPs and UMAT in primary human lung cells and lung tumor cells. 45th National Annual Meeting of Pharmacology and Toxicology 15.03.-¬17.03.2004 Mainz / Germany, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 369, R 236

Glahn F, Torky AW, Stehfest E, Hoffmann S, Foth H. (2005) Upregulation of MRP Expression by Metals in Human Lung Cells in Culture. 46th National Annual Meeting of Pharmacology and Toxicology 15.03.¬-17.03.2005 Mainz / Germany, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 371 Suppl.1 R106

Glahn F, Jambor M, Hofmann S, Foth H. (2006) Der Effekt von Schwermetallen auf die Expression von MRPTransportern in humanen Lungenzellkulturen. 47th National Annual Meeting of Pharmacology and Toxicology 04.¬04.-06.04.2006 Mainz / Germany, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 372, Suppl.1.

Glahn F, Ströfer M, Torky AW, Stehfest E, Hofmann S, Foth H. (2007) Cultures of human lung cells as model system for effects of As(III), Cu(II) and Hg(II) 48th National Annual Meeting of Pharmacology and Toxicology 13.-15.03.2007 Mainz / Germany, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 375, Suppl.1.

Glahn F, Wiese J, Torky A, Harders A, Ahmad M, Foth H. (2008) Human lung cell cultures as model system for the effects of various heavy metals. 49th National Annual Meeting of Pharmacology and Toxicology 11.-13.03.2008 Mainz / Germany, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377, Suppl.1.

Glahn F, Wiese J, Harders A, Torky A, Ahmad M, Foth H. (2009) How donor and confluence influence the effects of heavy metals in cultures of human lung cells. 50th National Annual Meeting of Pharmacology and Toxicology 10.-12.03.2009 Mainz / Germany, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 379, Suppl.1.

**Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.
Weiterhin versichere ich, dass ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und diese Dissertation an keiner anderen Einrichtung eingereicht habe.

Halle (Saale), den 10. September 2009

Felix Glahn