

Aus dem Institut für Umwelttoxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktorin: Frau Prof. Dr. Heidi Foth

Modulation von MRP-Transporter durch Metalle in Lungenzellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Annett Harders

geboren am 04.02.1981

in Magdeburg

Eröffnungsdatum: 17.07.2012

Tag der Verteidigung: 15.04.2013

Gutachter/Gutachterin:

1. Frau Prof. Dr. Heidi Foth
2. Herr Prof. Dr. Hans-Günther Schaller
3. Frau Prof. Dr. Tanja Schwerdtle (Münster)

Halle (Saale), 17.07.2012

Referat

Zellkulturen sind in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen Bestandteil unserer Forschung geworden. Sie stellen ein gut zugängliches Modellsystem dar, welches es ermöglicht, tiefere Einblicke in diverse zelluläre Prozesse zu erlangen. In der vorliegenden Arbeit ist die humane Lungentumorzelllinie H322 als Modellsystem herangezogen worden, um zu klären, ob unterschiedliche Konfluenzen der Kulturen einen Einfluss auf die Expression der Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP) 1-5 und des Ubiquitously Expressed Mammalian ABC Half-Transporter (UMAT) haben. Es interessierte auch, wieweit diese Proteine an der Detoxifikation der Metalle Arsenit, Cu(II) und Hg(II) beteiligt sind. Hierbei wurde die Expression der oben genannten Transportproteine mittels der semi-quantitativen Real-time PCR untersucht. Ohne Metallinkubation zeigten MRP2, MRP4 und UMAT bei 100 % Konfluenz die höchste Expression. MRP5 wurde mit zunehmendem Wachstum immer stärker induziert und MRP3 deutlich reprimiert. Nährstoffmangel, ein gesunkener pH-Wert und die Ansammlung von Zerfallsprodukten können Ursachen für die erhöhte Genexpression sein. Da MRP2, MRP4 und MRP5 Transporter für GSH und GSSG darstellen, die an diversen Entgiftungsreaktionen beteiligt sind, wäre dies eine mögliche Erklärung für die beobachtete Induktion. Bei Kulturen mit konfluentem Zellrasen wurden nur einige der untersuchten Gene durch Arsenit, Cu(II) oder Hg(II) moduliert. So ist MRP3 bei 100 % Konfluenz mit 5 µM Arsenit signifikant induziert worden. MRP4 und UMAT zeigten bei Konfluenz 100 % + 3 Tage in Anwesenheit von 2,5 und 5 µM Cu(II) eine erhöhte mRNA-Expression. In Gegenwart von 2,5 µM Hg(II) bei 100 % Konfluenz waren die Transkriptmengen des MRP1-Gens erhöht. Keines der untersuchten Gene wies im subkonfluenten Stadium einen erhöhten mRNA-Gehalt auf. Dies zeigte auch der 28 Tage Langzeitversuch mit Hg(II). Hier sind die H322-Zellen in einem subkonfluenten Stadium geerntet worden, doch keines der untersuchten Gene scheint am Transport von Hg(II) beteiligt zu sein. In den Kulturen mit konfluentem Zellrasen wird deutlich, dass der Zell-Zell Kontakt einen wesentlichen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene und deren Modulation durch die verwendeten Metalle hat. Reproduzierbare Bedingungen hinsichtlich der Konfluenz der Zellkulturen sind somit absolut erforderlich, um eine hohe Qualität der Untersuchungsergebnisse zu garantieren.

1	Einleitung	1
1.1	Respirationstrakt: Toxikologische Aspekte, Aufbau und Funktion.....	1
1.2	Metalle: Arsen, Kupfer und Quecksilber	4
1.3	Superfamilie der „ATP-binding cassette“ (ABC) Transporter	9
1.4	„Multidrug Resistance-Associated Proteine“ (MRP) Familie der Untergruppe ABCC....	10
1.5	Der „Ubiquitously Expressed Mammalian ABC-Halftransporter“ (UMAT).....	14
1.6	Zielstellung.....	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Geräte und Chemikalien.....	16
2.1.1	Geräte und Verbrauchsgüter	16
2.1.2	Chemikalien	16
2.2	Zellkultur.....	17
2.2.1	Tumorzelllinie H322.....	17
2.2.2	Kultivierung, Passagieren und Durchführung der Kurz- und Langzeitexperimente ..	17
2.2.3	Vitalitätstest: MTT-Assay.....	18
2.3	Real time PCR zur Ermittlung der Genexpression von MRP-Transportern.....	19
2.3.1	RNA Isolation	19
2.3.2	RNA Gehaltsbestimmung mittels Spektrometer.....	20
2.3.3	cDNA Synthese.....	20
2.3.4	Real-time PCR	21
2.4	Statistische Auswertung.....	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Nutzung humaner Lungentumorzellen.....	25
3.2	Der Vitalitätstest: MTT-Assay.....	25
3.3	Einfluss unterschiedlicher Konfluenzen mit und ohne Inkubation mit den Metallsalzen Arsenit, Cu(II) und Hg(II) auf die mRNA- Expression von MRP1-5 und UMAT in der humanen Lungentumorzelllinie H322.....	27
3.3.1	Effekt unterschiedlicher Konfluenz in H322-Zellen ohne Metallinkubation auf die mRNA-Expression von MRP1-5 und UMAT.....	30
3.3.2	Wirkung von Arsenit in H322-Zellen bei unterschiedlicher Konfluenz.....	31
3.3.3	Wirkung von Cu(II) in H322-Zellen bei unterschiedlicher Konfluenz.....	34
3.3.4	Wirkung von Hg(II) in H322-Zellen bei unterschiedlicher Konfluenz	36
3.4	Der Effekt von Hg(II) und der Konfluenz im Langzeitversuch in H322-Zellen	38
3.4.1	Vitalitätstest	40
3.4.2	Einfluss von Hg(II) auf die Zellmorphologie in H322-Zellen.....	43
3.4.3	Expression von MRP1 bis MRP5 und UMAT in H322-Zellen nach 28 Tagen Inkubation mit 2,5 und 5 µM Hg(II).....	46
3.4.4	Effekt unterschiedlicher Konfluenz auf die Expression von MRP1 bis MRP5 und UMAT in den mit Hg(II) vorbehandelten H322-Zellen.....	49
4	Diskussion	52
4.1	Kulturen der humanen Lungentumorzelllinie H322	52
4.2	Effekte von Arsenit	55
4.3	Effekte von Kupfer.....	59
4.4	Effekte von Quecksilber.....	62
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	70
7	Thesen	77
8	Lebenslauf	
9	Selbständigkeitserklärung	

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

11 Danksagung.....

Abkürzungen:

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ca.	circa
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C _t	Schwellenwertzyklus (eng.: Threshold cycle)
CFTR	eng.: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette Unterfamilie C, Mitglied 7)
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
mM	Millimolar
MDCK	Zelllinie aus den distalen Tubuli der Hundeniere (eng.: Madin-Darby canine kidney)
MK571	eng.: (E)-3-[[[3-[2-(7-Chloro-2-quinoliny)ethenyl]phenyl]-[[3-dimethylamino)-3-xopropyl]thio]methyl]thio]-propanoic Acid
MRP	eng.: Multidrug Resistance-Associated Protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
p53	Protein p53, Tumorsuppressorgen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (eng.: phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (eng.: polymerase chain reaction)
P-gp	P-Glykoprotein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (eng.: rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase Reaktion
sog.	so genannt

Std.	Standard
U	eng.: Unit
UMAT	eng.: Ubiquitously Expressed Mammalian ABC Half-Transporter
U/min	Umdrehungen pro Minute
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

Der Atemtrakt stellt aufgrund des anatomischen Aufbaus eine große Kontaktfläche mit der Umgebung des Menschen dar. So können nicht nur die lebensnotwendige Atemluft, sondern auch Schadstoffe in die Lunge gelangen und verschiedene toxische Reaktionen hervorrufen. Zu diesen Schadstoffen in der Luft, der Umwelt und der Arbeitswelt gehören unter anderem auch die Metalle Arsen, Kupfer und Quecksilber. Diese Umweltkontaminanten sind in der Luft in Spuren enthalten, so dass die Lunge chronisch mit ihnen in Berührung kommen kann. Darüber hinaus ist Arsen im Zigarettenrauch enthalten und Quecksilber und Kupfer im Füllungsmaterial Amalgam für Zähne. Die Elimination dieser Schwermetalle kann über verschiedene Transporter erfolgen. Die MRP-Familie, die zu den ATP-abhängigen ABC-Transportern gehört, kann am Transport von Metallen beteiligt sein und zu einer zellulären Resistenz gegenüber Metallen beitragen.

1.1 Respirationstrakt: Toxikologische Aspekte, Aufbau und Funktion

Die oberen und unteren Atemwege eines Menschen werden tagtäglich mit unterschiedlichen Substanzen belastet. Bei inhalierten Partikeln ist dabei nicht nur die Zusammensetzung, sondern auch die Größe ein wichtiger Aspekt. Je kleiner die Partikel, umso leichter gelangen sie in die tiefen Schichten der Lunge. Feinstaubpartikel mit einem Durchmesser von weniger als 0,1 µm können sogar in den Blutkreislauf übertreten (Kooijman et al., 2007). Der Weg von relativ großen Partikeln endet häufig im Schleim von Nase, Rachen, Trachea und Bronchien. Die so immobilisierten Stoffe werden entweder von Makrophagen phagozytiert oder mit Hilfe des rachenwärts gerichteten Zilienschlags des Flimmerepithels in den Mundraum befördert, wo sie anschließend verschluckt werden. Bei Rauchern ist dieses Selbstreinigungssystem mit der zunehmenden Zerstörung der Kinozilien aufgrund der toxischen Wirkungen des Zigarettenrauchs gestört. Zusätzlich führt jahrelanges Rauchen zu einer Umwandlung (Metaplasie) des ursprünglich respiratorischen Epithels in Plattenepithel (Thomas et al., 1995). Wird das Lungengewebe über einen längeren Zeitraum mit krebserzeugenden Partikeln belastet, so kann dies zu chronischen Lungenerkrankungen bis hin zur Bildung von Tumoren führen. In Deutschland zählen nach aktuellen Studien bösartige Lungentumore zu den dritthäufigsten Krebserkrankungen (RKI und GEKID, 2008). Laut WHO wird zwischen dem kleinzelligen Karzinom (SCLC), dem nicht- kleinzelligen Karzinom (NSCLC) und anderen Karzinomarten unterschieden. Eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung spielen dabei Mutationen im p53-Protein. Dieser „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992) hat in seiner unveränderten Form die Funktion Zellteilungen zu kontrollieren, indem es in Zellen mit irreversiblen DNA-Schäden Apoptose induziert. Bei einem mutierten p53-Protein kann eine ungehinderte Proliferation DNA geschädigter Zellen stattfinden und eine maligne Entartung auftreten (Böhle et al., 2002).

Das größte Risiko bei der Lungenkrebsentstehung ist und bleibt das aktive Rauchen. Aber auch die Exposition gegenüber gesundheitsschädigenden Substanzen am Arbeitsplatz spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung. Die Berufskrankheiten-Verordnung (BKV) enthält in ihrem Anhang eine im Auftrag der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) erstellte, Liste von mindestens 10 Substanzklassen Lungenkrebs erzeugender Arbeitsstoffe (BAuA, 2002).

Die Lunge ist ein verzweigtes und hierarchisch aufgebautes Organ, welches für den Gasaustausch im menschlichen Körper verantwortlich ist. Mit zunehmender Verzweigung des Luftweges ändern sich Durchmesser der Äste des Bronchialbaums und der histologische Aufbau des Lungengewebes. So liegt der Durchmesser für die Trachea bei ungefähr 20 mm. Nach einer ausgedehnten Verästelung zeigt der Durchmesser in den Alveolen viel kleinere Werte von etwa 60 bis 200 μm oder mehr. In Folge dessen haben beide Lungenflügel mit ihren ca. 300 – 400 Millionen Alveolen eine Gesamtfläche von 80 bis 140 m^2 , die für den Gasaustausch zur Verfügung steht (Thomas et al., 1995; Lüllmann-Rauch et al., 2006;).

Die Schleimhaut (Tunica mucosa) der oberen und unteren Atemwege ist aus einem respiratorischen Flimmerepithel aufgebaut, dessen Dicke in alveolärer Richtung abnimmt. Die charakteristischen Zellen des respiratorischen Epithels sind die kinezilientragenden Zellen mit den intraepithelial gelegenen Becherzellen, die einen zähen Schleim absondern. In tieferen Schichten befinden sich zusätzlich seromuköse Drüsen, deren Dichte auf terminalem Weg abnimmt. Die knorpelhaltigen intrapulmonalen Bronchien (bronchi lobares und segmentalis) zeigen wie die Trachea noch mehrreihiges Flimmerepithel mit Becherzellen. In tieferen Abschnitten, wie in den knorpellosen Bronchioli, ist nur noch ein einreihig prismatisches Flimmerepithel ohne Becherzellen zu erkennen. Zusätzlich sind intraepithelial noch sekretorische Clara-Zellen („Keulenzellen“) anzutreffen. In den terminalen Bronchiolen existiert nur noch einschichtig kubisches Epithel ohne Kinozilien mit den sekretorischen Clara-Zellen. Am Ende des Bronchialbaumes geht das bronchiale Epithel in das Alveolarepithel über, welches durch kleine Alveolarepithelzellen vom Typ I („Deckzellen“) und durch große Alveolarepithelzellen vom Typ II („Nischenzellen“) gekennzeichnet ist. Die Alveolarepithelzellen vom Typ I bedecken zu ungefähr 95 % die Alveolarwand und sind aufgrund ihrer abgeflachten Zellform nur schwer im histologischen Präparat zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigen die Alveolarepithelzellen vom Typ II eher eine kubische Form und bilden den sog. Surfactant (90 % Phospholipide und 10 % Surfactant-assoziierte Proteine), der für die Senkung der Oberflächenspannung verantwortlich ist. Zusätzlich befinden sich in der Alveolarschleimhaut Alveolarphagozyten („Staubzellen“), die etwa 10 % der Zellen ausmachen (Thomas et al., 1995).

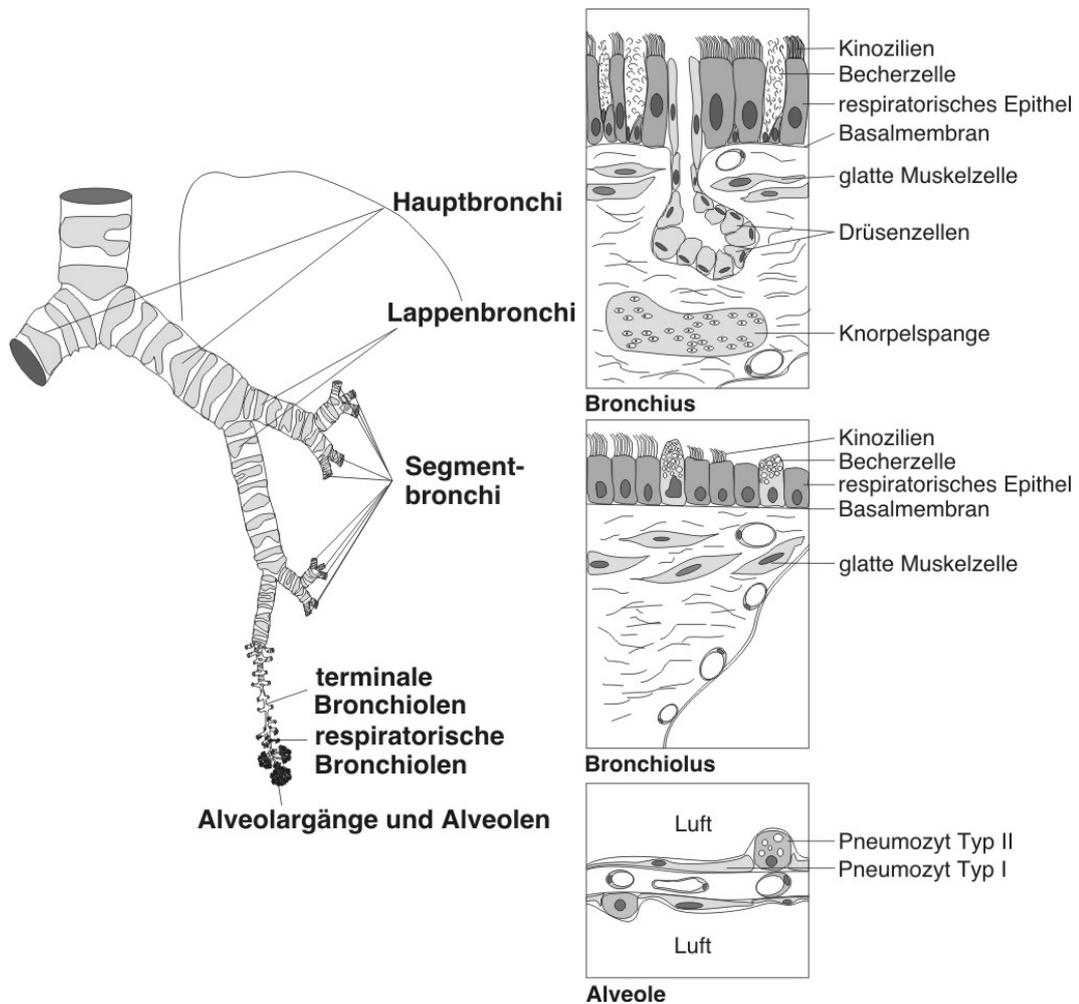


Abb. 1 Verzweigungen der Atemwege und der Aufbau des Lungenepithels (Gosselink et al., 2005)

Alle Abschnitte der Atemwege, die mit einem respiratorischen Epithel ausgekleidet sind, besitzen die Fähigkeit, durch den rachenwärts gerichteten Zilienschlag (20 Schläge pro Sekunde) anfallende Fremdstoffe und Bronchialschleim aus den Atemwegen zu entfernen. Kinozilien sind Epithelfortsätze, die rhythmisch schlagende Bewegungen durch vorhandene Mikrotubuli und die zugehörigen Motorproteine ausführen können. Dadurch ist eine ständige Reinigung (mukoziliäre Clearance) der zilientragenden Atemwege gewährleistet (Lüllmann-Rauch et al., 2006). Für die Produktion des Bronchialschleims sind unter anderem die Becherzellen sowie die serösen und mukösen Drüsenzellen verantwortlich. Die in den knorpellosen Bronchiolen gelegenen Clara-Zellen sind zilienlose Epithelien, die wie die Alveolarepithelzellen vom Typ II einen eiweißhaltigen Phospholipidfilm zur Senkung der Oberflächenspannung bilden. In diesem Sekret sind unter anderem die Proteine SP-A (Surfactant-assoziierte Protein A), SP-D (Surfactant-assoziierte Protein D) und das 10-kd-Clara-Zell-spezifische Protein (histochemischer Marker für Clara-Zellen) enthalten, die einer

überschießenden Entzündungsreaktion entgegenwirken. Die Surfactant Proteine SP-A und SP-D zeigen zusätzlich noch antimikrobielle und opsonierende Effekte. Zudem enthalten die Clara-Zellen einige Enzyme des Cytochrom P-450 Oxidase- Systems, was sie befähigt, eingeatmete organische Xenobiotika zu metabolisieren. Kommt es zu einer selektiven Schädigung der Clara-Zellen, z.B. durch Autoabgase und Insektizide, so können diese Schadstoffe zu einer malignen Entartung der Clara-Zellen führen (Thomas et al., 1995; Bucher et al., 1997; Gosselink et al., 2005; Lüllmann-Rauch et al., 2006).

1.2 Metalle: Arsen, Kupfer und Quecksilber

Seit tausenden von Jahren spielen Metalle mit ihren unterschiedlichsten Eigenschaften für den Menschen eine wichtige Rolle. Sie sind nicht nur Bestandteile unserer Erde und aller Lebewesen der Natur, zudem nehmen sie im menschlichen Organismus an vielen lebensnotwendigen Reaktionen teil und sichern somit den Erhalt der Gesundheit. Die Entdeckung der Metalle brachte für die Menschheit große Veränderungen mit sich, die nicht nur mit Vorteilen behaftet waren. Mit zunehmender Industrialisierung stieg die Nachfrage und somit die Gewinnung von den in der Erdkruste befindlichen Metallen, wobei man sich über deren toxikologische Wirkung auf Mensch und Umwelt lange Zeit nicht bewusst war. Bis zum 18. und 19. Jahrhundert löste die Süßung des Weines durch die Zugabe von Blei (Sapa oder Bleiacetat) eine Reihe von Vergiftungserscheinungen aus, welche die damaligen Mediziner vor ein Rätsel stellten. Die Zunahme von Krankheiten durch den vermehrten Abbau und Gebrauch von Metallen ließ das Interesse über deren toxikologische Auswirkungen immer mehr anwachsen (Schäfer et al., 2004). Seit den 50er Jahren existieren in Deutschland Senatskommissionen der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zur toxikologischen Prüfung und Bewertung von Arbeitsstoffen, Lebensmitteln und von Stoffen und Ressourcen in der Landwirtschaft. Zur Bewertung von gesundheitsschädigenden Stoffen am Arbeitsplatz werden jährlich von der Arbeitsstoffkommission die maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK) für Arbeitsstoffe in der Luft und die biologischen Arbeitsstofftoleranzwerte (BAT) bzw. biologischen Leitwerte (BLW) zum Monitoring von Arbeitsstoffen in biologischem Material (Blut/Urin) in einer Liste veröffentlicht. Zudem erfolgt eine Einteilung in krebserzeugende, keimzellmutagene, sensibilisierende, hautresorptive und die Schwangerschaft beeinträchtigende Stoffe (DFG 2009). Der MAK-Wert gibt die höchste zulässige Konzentration eines Arbeitsstoffes in der Luft an, der nach 8-stündiger Exposition bei einer 40 Stunden Woche keine Gesundheitsgefährdung für den Arbeitnehmer darstellt. Der BAT-Wert steht für die höchstzulässige Konzentration eines Arbeitsstoffes in Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin. Bei der Bewertung von krebserzeugenden Arbeitsstoffen der Kategorien 1-3 wird statt des

BAT-Wertes das Expositionsäquivalent für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA-Wert) verwendet. (DFG 2009).

Tab. 1 Gefahrstoff-Einstufung der eingesetzten Metalle und deren Grenzwerte

Metall	Einstufung der MAK-Kommission	Grenzwerte
Arsen, As	Kategorie 1	TRK (Luft): 0,1 mg/m ³ EKA (Urin): 50 µg/L
Kupfer, Cu	-	-
Quecksilber, Hg (metallisch/anorganisch)	Kategorie 3B	MAK (Luft): 0,1 mg/m ³ BAT (Urin): 100 µg/L

MAK Kategorie: (1) Stoffe, die beim Menschen Krebs erzeugen; (-) keine Hinweise auf Kanzerogenität und Mutagenität; (3B) aus In-vitro- oder aus Tierversuchen liegen Anhaltspunkte für eine krebserzeugende Wirkung vor, die jedoch zur Einordnung in eine andere Kategorie nicht ausreichen; TRK: technische Richtkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz; EKA: Expositionsäquivalent für krebserzeugende Arbeitsstoffe; BAT: biologische Arbeitsstofftoleranzwerte (Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2003)

Von den mehr als 100 chemischen Elementen im Periodensystem zählen circa 80 % zu den Metallen und ungefähr 6 % zu den Halbmetallen. Von dieser in der Natur vorkommenden Vielfalt sind einige Metalle, wie Natrium, Kalium, Eisen, Zink und Kupfer für den menschlichen Organismus von biologischer Relevanz. Diese als essenziell bezeichneten Metalle übernehmen wichtige Aufgaben bei unterschiedlichen Aufbauprozessen und sind als Bestandteil von Enzymen für eine Vielzahl biologischer Reaktionen unentbehrlich. Die essenzielle Wirkung entfaltet sich hierbei für jedes Element in einem unterschiedlichen Konzentrationsbereich. Zu geringe Dosen können Mangelerscheinungen hervorrufen und erhöhte Konzentrationen toxische Reaktionen auslösen. Andere Metalle, wie Cadmium, Quecksilber, Blei und Arsen sind für den Menschen vor allem von toxikologischer Relevanz (Schäfer et al., 2004; Strietzel et al., 2005). Metalle, die durch Inhalation, Verschlucken oder durch Hautkontakt in den menschlichen Körper gelangen, können sowohl als freie Ionen, Metallkomplexe, Metallpartikel oder als schwer lösliche Verbindungen schädigende Effekte auslösen. Hinsichtlich der Schadwirkung wird zwischen der akuten und chronischen Toxizität, der Reproduktionstoxizität, der Mutagenität und der Kanzerogenität unterschieden. Welchen toxischen Einfluss Metalle haben, ist von der Art des Elements, seinen physikochemischen Eigenschaften, der Bioverfügbarkeit,

der Dosis und der Expositionsform und -dauer abhängig. Hierbei spielt vor allem die Bioverfügbarkeit bzw. der resorbierte Anteil eines Metalls in den Zellen des Körpers eine entscheidende Rolle. Die Höhe der Bioverfügbarkeit kann u.a. durch unterschiedliche Löslichkeit und Lipophilie beeinflusst werden. Somit haben Metalle mit einer guten Löslichkeit eine erhöhte Bioverfügbarkeit und eine größere toxische Wirksamkeit als Verbindungen mit schlechteren löslichen Eigenschaften (Schäfer et al., 2004; Beyersmann und Hartwig, 2008).

Toxische Metallverbindungen lassen hinsichtlich ihrer Genotoxizität und Kanzerogenität vorwiegend 3 verschiedene Wirkungsmechanismen erkennen. Dazu zählen Induktion von oxidativem Stress, Hemmung von DNA-Reparatursystemen und Störung von Signaltransduktionsvorgängen (Beyersmann und Hartwig, 2008). Oxidativer Stress wird hauptsächlich durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen, welche in physiologischen und pathophysiologischen Abläufen von großer Bedeutung sind (Markant et al., 2005). Reaktive Sauerstoffspezies sind nicht nur in der Lage, direkt Zellmoleküle zu schädigen, sie haben auch einen beschleunigenden Einfluss auf die Apoptose. Zudem spielen sie eine Rolle bei der Aktivierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B), die an vielen regulatorischen Prozessen, wie beispielsweise der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und der Zellproliferation, beteiligt sind. Als reaktionsfreudigste Verbindung der reaktiven Sauerstoffspezies gilt das Hydroxylradikal. Dieses Radikal ist in der Lage, mit Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten zu reagieren und starke Zellschäden auszulösen. Die reaktiven Hydroxylradikale entstehen dabei u.a. durch metallkatalysierte Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen, an denen vor allem Eisen und Kupfer beteiligt sind (Markant et al., 2005; Beyersmann und Hartwig, 2008).

Arsen:

Das ubiquitär in der Natur vorkommende Arsen war schon vor und während der Antike der Menschheit bekannt. So sind beispielsweise die Arsensulfide Realgar (As_4S_4) und Auripigment (As_2S_3) zur kosmetischen Haarentfernung oder als Schminkmittel verwendet worden. Vor allem das Wissen über die hohe toxische Wirksamkeit von Arsen trioxid (Arsenik, As_2O_3) machte diese Arsenverbindung in der damaligen Zeit zu einem beliebten Mordgift. Heutzutage wird Arsen unter anderem als Legierungsbestandteil, als Holzschutzmittel, als Pestizid oder in der Halbleitertechnik verwendet (Schäfer et al., 2004).

Arsen zählt zu den Halbmetallen und ist in der 5. Hauptgruppe des Periodensystems zu finden. Vorwiegend entsteht anorganisches Arsen als Nebenprodukt bei der Aufarbeitung sulfidischer Zink-, Blei- und Kupfererze. Arsen liegt in den Oxidationsstufen -3, 0, +3 und +5 vor und ist in Abhängigkeit von seiner Wertigkeit unterschiedlich stark toxisch wirksam. Reines metallisches Arsen zeigt aufgrund seiner unlöslichen Eigenschaft nahezu keine toxischen Effekte. Im

Gegensatz dazu sind die gut löslichen As(III)- Verbindungen für ihre hohe Toxizität bekannt (Schäfer et al., 2004; Schwerdtle et al., 2011). Aus verschiedenen epidemiologischen Studien wurde deutlich, dass nach erfolgter Exposition mit anorganischen Arsenverbindungen eine Vielzahl unterschiedlicher Krebsarten ausgelöst werden können (Beyersmann und Hartwig, 2008). Die wichtigste anorganische dreiwertige Arsenverbindung ist das Arsenik oder Arsentrioxid (As_2O_3). Arsenik kann beim industriellen Ausschmelzen arsenhaltiger Erze und bei der Verbrennung arsenhaltiger Kohle entstehen. In der Natur ist das Arsenik entweder als monokliner Claudetit oder als kubischer Arsenolith (Arsenikblüte) auf verwitterten Arsenerzen nachzuweisen (Schwerdtle et al., 2011). Die minimal tödliche Dosis von Arsentrioxid beträgt beim Menschen bei einmaliger oraler Aufnahme ungefähr 1-3 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Nach Inhalation oder oraler Aufnahme von Arsen(III)- und Arsen(V)- Verbindungen erfolgt eine sehr schnelle Verteilung in alle Gewebe des menschlichen Körpers. Die Metabolisierung von As(III)- und As(V)-Verbindungen zu organischem Arsen findet in der Leber statt. Durch oxidative Methylierungs- und Reduktionsprozesse unter Anwesenheit großer Mengen von Glutathion entstehen die dreiwertigen oder fünfwertigen Hauptprodukte Monomethylarson (MMA)- und Dimethylarsinsäure (DMA). Nicht nur die anorganischen Arsenverbindungen sind gentoxisch. Verschiedene Studien belegen, dass die methylierten Metaboliten MMA(III) und DMA(II) sogar stärkere gentoxische Effekte auslösen (Schwerdtle et al., 2003; Kligerman et al., 2003; Schäfer et al., 2004; Fuhrmann et al., 2006). Die gentoxische Wirksamkeit von Arsenverbindungen kann auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Dazu zählen vor allem die Induktion von oxidativem Stress, die Inhibition des DNA-Reparatursystems und der Einfluss auf die Zellproliferation durch veränderte DNA Methylierungsmuster (Beyersmann und Hartwig, 2008).

Kupfer:

Mit der Entdeckung von Kupfer vor tausenden von Jahren ist dieses Metall für die Menschheit ein wichtiger Begleiter des täglichen Lebens geworden. Anfänglich lag die Verwendung des Kupfers in der Herstellung unterschiedlicher Werkstoffe und Schmuckstücke. Mit zunehmenden Kenntnissen begann die Anfertigung von Kupfer-Legierungen, von denen Bronze (mit Zinn) und Messing (mit Zink) zu den wohl bekanntesten zählen. Heutzutage wird mehr als die Hälfte des gewonnenen Kupfers für die Elektro-Industrie verwendet. Von großem Nutzen ist es ebenfalls im Münzwesen, bei der Dachdeckung und in der Metall verarbeitenden Industrie. Kupfer ist in der Natur ein weit verbreitetes Metall und überwiegend als Kupfer-Mineral und gelegentlich in reiner Form zu finden. Es steht als ein Übergangsmetall in der 1. Nebengruppe des Periodensystems und liegt in den Oxidationsstufen 0, +1, +2, +3 und selten +4 vor (Schäfer

et al., 2004). Die meist blauen oder grünen Kupfer(II)-Salze stellen dabei die stabilsten Verbindungen dar.

Quecksilber:

Das in der Natur eher selten vorkommende zinnweiße Quecksilber zählte schon im antiken Zeitalter zu den Metallen mit der größten Popularität. Das Quecksilbersulfid, welches auch unter dem Namen Zinnober bekannt und vor allem in vulkanaktiven Gegenden zu finden ist, war aufgrund seines roten Aussehens ein beliebtes Farbpigment. Anfang des 16. Jahrhunderts ist Quecksilber sogar durch Paracelsus als Heilmittel in Cremes gegen Syphilis erfolgreich eingesetzt worden. Dafür versetzte er Sublimat (HgCl_2) oder Kalomel (Hg_2Cl_2) mit Ammoniak und erhielt Präzipitate, die er zu Salben verarbeitete (Schunk et al., 1999). Heutzutage wird Quecksilber vielfältig in Technik und Wirtschaft eingesetzt, wobei der Einsatz dieses Metalls eher einen rückläufigen Trend zeigt. Große Mengen an Quecksilber wurden für die Chloralkali-Elektrolyse als Kathodenmaterial verwendet (Schäfer et al., 2004). Der Hauptteil dieses Metalls wird jedoch in der Elektroindustrie beim Instrumente - und Apparatebau verbraucht. Im medizinischen Bereich kommt Quecksilber in Verbindungen als Antiseptikum und in der Zahnmedizin in Form von Amalgamen in der Füllungstherapie zum Einsatz. Quecksilber liegt in den Oxidationsstufen 0, +1 und +2 vor und ist als einziges Metall bei Raumtemperatur flüssig. Aufgrund seines hohen Dampfdrucks verflüchtigt sich Quecksilber schon bei Raumtemperatur. In Quecksilber lassen sich zahlreiche Metalle - mit Ausnahme von Eisen - lösen, wodurch verschiedene Legierungen unterschiedlicher Konsistenz (fest, plastisch oder flüssig) gebildet werden, die namentlich als Amalgame bekannt sind. In der Natur ist Quecksilber meist in sulfidischen Erzen anzutreffen. Reines Quecksilber in Form von Tröpfchen ist eher selten zu finden. Jährlich reichern sich mehrere tausend Tonnen Quecksilber im Wasser der Erde und in der Atmosphäre an. Die Ursachen dieser Quecksilberbelastung liegen dabei im Vulkanismus, in der Verwitterung, in der natürlichen Freisetzung aus der Erdkruste, in den Weltmeeren und darüber hinaus in den vom Menschen verursachten Quellen (Schäfer et al., 2004; Glied et al., 2006; Sitzmann et al., 2011). Durch den Abbau von Kohle oder Metallen kann Quecksilber freigesetzt werden und somit in die Erde, in die Luft oder ins Wasser gelangen. Insgesamt hat die Verdreifachung der Emissionen durch den Menschen, deren Hauptteil auf die Verbrennung fossiler Energieträger zurückzuführen ist, zu einer erhöhten Freisetzung von Quecksilber in die Umwelt geführt (UNEP 2011).

1.3 Superfamilie der „ATP-binding cassette“ (ABC) Transporter

Die so genannten ATP-binding cassette Proteine, auch ABC-Transporter genannt, bilden die größte Familie von Transmembranproteinen, die sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten identifiziert werden konnten. 1976 gelang es Juliano & Ling, das P-Glykoprotein in Ovarialzellen chinesischer Hamster als erstes Mitglied der ABC Superfamilie nachzuweisen. Dieses Protein wird vom MDR1 Gen codiert und galt für einen langen Zeitraum als alleinige Ursache für das Auftreten von Mehrfachresistenzen (Juliano et al., 1976; Dean et al., 2001; Deeley et al., 2006). P-Glykoprotein transportiert viele hydrophobe Substrate und Zytostatika, wie Etoposid, Doxorubicin und Vinblastin (van der Deen et al., 2005; Deeley et al., 2006). Aktuell sind 51 ABC-Transportergene im Menschen nachgewiesen worden (Dean et al., 2001; Unadkat et al., 2004; Deeley et al., 2006). Die Superfamilie ist in 7 Untergruppen (ABCA-ABCG; Tab. 2) aufgeteilt und in Membranen von normalem Gewebe und von Tumorzellen lokalisiert. Sie übernehmen zusammen wichtige Aufgaben in der Absorption, der Verteilung und der Elimination einer Vielzahl unterschiedlicher Endo- und Xenobiotika sowie ihrer Metabolite (Haimeur et al., 2004; Unadkat et al., 2004).

Tab. 2 ABC Superfamilie

Familie	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCE	ABCF	ABCG
Mitglieder	12	11	13	4	1	3	5
Alias	ABC1,	MDR	MRP	ALD	OABP	GCN20	White

(Dean et al., 2002)

Die Mehrheit der ABC-Transporter sind unidirektional und transportieren unter ATP-Hydrolyse Phospholipide, Ionen, Peptide, Steroide, Polysaccharide, Aminosäuren, Gallensäuren, Arzneimittel und andere Xenobiotika durch Zellmembranen und intrazelluläre Membranen wie die vom Endoplasmatischen Retikulum, von Peroxisomen und Mitochondrien (Dean et al., 2001; Efferth et al., 2006). Die ABC Pumpen liegen entweder als Voll- oder Halbtransporter vor. Die funktionelle Einheit der ABC Transportproteine setzt sich aus der in der Plasmamembran lokalisierten Membranverankerungsdomäne (MSD membrane spanning domains) und der im Zytoplasma gelegenen Nukleotidbindenden Domäne (NBD nucleotid binding domains) zusammen, wobei die Volltransporter aus 2 MSD und 2 NBD und die Halbtransporter jeweils nur aus einer MSD und einer NBD aufgebaut sind. Jede Membranverankerungsdomäne (MSD) durchspannt die Zellmembran in der Regel mit 6 transmembranen Helizes, die in ihrer Anzahl zwischen 5 und 10 schwanken können (Deeley et al., 2006). Alle Nukleotidbindenden Domänen enthalten die für die ATP Bindung und

Hydrolyse wichtigen Walker A und Walker B Motive, zwischen denen die charakteristische C Signatur der ABC Transporter liegt. Mit dieser Signatur unterscheiden sie sich somit von anderen ATP bindenden Proteinen (Dean et al., 2001).

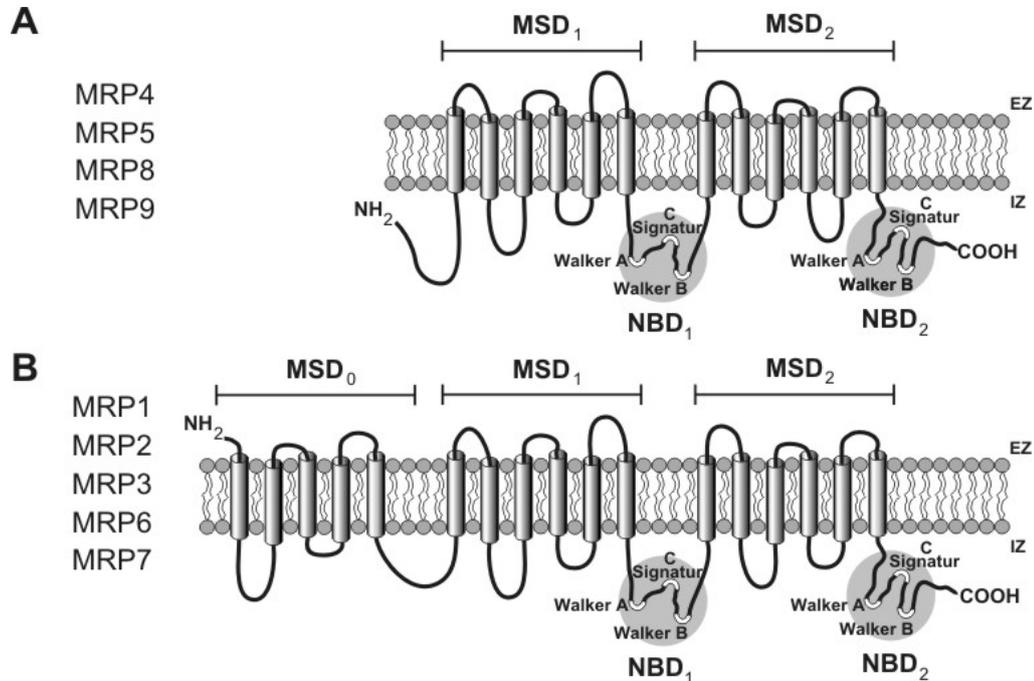


Abb. 2 Struktureller Aufbau der ABC Transporter am Beispiel der MRP Familie aus der Untergruppe C. Darstellung „kurzer“ (A) und „langer“ (B) MRPs; EZ: Extrazellularraum; IZ: Intrazellularraum (nach Deeley et al., 2006)

1.4 „Multidrug Resistance-Associated Proteine“ (MRP) Familie der Untergruppe ABCC

Die Unterfamilie ABCC ist mit ihren 13 Mitgliedern eine der größten innerhalb der ABC Superfamilie und setzt sich aus 10 MRP-Transportern, einem CFTR Protein (ABCC7) und 2 SUR Rezeptoren (ABCC8-9) zusammen, wobei vor allem die MRP Familie für die „multidrug resistance“ in Tumorzellen eine wesentliche Rolle spielt (Dean et al., 2002; Unadkat et al., 2004). Die ABCC Mitglieder gehören zu den Volltransportern und werden aufgrund unterschiedlicher Anzahl ihrer Membranverankerungsdomänen (MSDs) bzw. transmembranen Helizes in kurze und lange Transporter eingeteilt. Zu den kurzen ABCC Proteinen mit 2 MSDs, wie sie typischerweise in der ABC Proteinstruktur vorkommen, zählen das CFTR, MRP 4, 5, 8 und 10. Die langen ABCC Transporter mit MRP 1, 2, 3, 6, 7 und den SUR Rezeptoren besitzen eine zusätzliche N-terminale Domäne (MSD0), welche die Membran mit 4 bis 5 α Helizes durchspannt (Deeley et al., 2006). Was die ABCC Mitglieder von den übrigen ABC Transportern abhebt, ist die Tatsache, dass sich die beiden Nukleotidbindenden Domänen

(NBDs) aufgrund verschiedener Aminosäuresequenzen innerhalb und außerhalb der Motive Walker A, Walker B und der C Signatur voneinander unterscheiden. Im Vergleich zu dieser so genannten „NBD Asymmetrie“ zeigen die anderen ABC Transporter eher große Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Domänen (Deeley et al., 2006; Bakos et al., 2007).

Gelangen toxische Verbindungen oder synthetisch hergestellte Substanzen wie Chemotherapeutika, die meist lipophilen Charakter haben, in den menschlichen Organismus, wird mit Hilfe der Biotransformation eine Akkumulation dieser Stoffe im Körper verhindert. Dabei werden in der Regel die lipophilen Substanzen in Phase I der Biotransformation durch das Cytochrom P450 oxidiert und in Phase II an endogene, überwiegend stark wasserlösliche Stoffe, wie Glutathion (GSH), Sulfat oder Glucuronid, gebunden. Die nun hydrophilen Konjugate sind nicht in der Lage, die Zelle mittels Diffusion zu verlassen, und benötigen zum Durchdringen der Lipiddoppelschicht der Zellmembran bestimmte Transportproteine, die den Austritt aus der Zelle ermöglichen (Borst et al., 2002). Da das bereits oben erwähnte P-Glykoprotein/MDR1 eher nicht-ionische Substrate mit meist hydrophoben Eigenschaften transportiert, müssen andere Transporter existieren, die diese Aufgabe übernehmen. 1992 entdeckten Cole et al. in der humanen Lungentumorzelllinie H69AR eine ubiquitär im menschlichen Organismus exprimierte Glutathion-X-Konjugat Pumpe, den MRP1 (ABCC1) Transporter. Dieses Protein ist, wie oben geschildert, Mitglied der Unterfamilie ABCC. Die bis heute erforschten MRP Transporter (MRP1 bis MRP10) sind alle Anionenpumpen und unterscheiden sich nicht nur in der Substratspezifität, sondern auch in der Lokalisation in Geweben und in Membranen polarisierter Zellen (Borst et al., 2002).

Das MRP1 Gen ist auf dem Chromosom 16p13.1 lokalisiert und in polarisierten Zellen meist in der basolateralen Membran, aber auch in der apikalen Membran positioniert (van der Deen et al., 2005; Glaeser et al., 2008). Hohe Expressionsraten zeigen sich vor allem in der Lunge, im Hoden, in der Niere, im Herzen und in der Plazenta. In der Leber eines erwachsenen Menschen ist MRP1 eher gering exprimiert, doch in proliferierenden Leberzellen und in der Leber Tumorzelllinie HepG2 konnten hohe Expressionsraten gefunden werden (Bakos et al., 2006; Deeley et al., 2006). MRP1 zeigt ein ähnliches Resistenzspektrum wie das P-Glykoprotein/MDR1, obwohl die beiden Proteine nur zu ca. 19 % strukturell übereinstimmen. Das erste in vitro nachgewiesene Substrat für den MRP1 Transporter war der Entzündungsmediator LTC₄ (Leukotriene C₄), der bis heute das bekannteste physiologische Substrat mit der höchsten Affinität für MRP1 ist. Inzwischen weiß man, dass MRP1 für den Transport einer Vielzahl unterschiedlicher xeno- und endobiotischer Konjugate von Glutathion (GSH), Sulfat und Glucuronid sowie für die in der Chemotherapie eingesetzten Anthracycline (Epirubicin, Doxorubicin, Idarubicin, Daunorubicin), Epipodophyllotoxine (Etoposid, Teniposid) und Vinkaalkaloide (Vincristin, Vinblastin, Vindesin, Vinorelbin) verantwortlich ist.

Aber auch GSH-Komplexe von Natriumarsenit, Natriumarsenat und Kalium-Antimon-Tartrat werden vom MRP1 Protein transportiert (Deeley et al., 2006).

Eine dem MRP1 Transporter sehr ähnliche Substratspezifität zeigt das zweite Mitglied der MRP Familie. Das MRP2-Gen (ABCC2), welches auch unter dem Namen cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter) bekannt ist, wurde im Jahre 1996 entdeckt. Aufgrund der Tatsache, dass beide Transporter Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) transportieren, wird angenommen, dass sie eine wichtige Aufgabe am Zellschutz gegen oxidativen Stress übernehmen. Das MRP2 Gen ist auf dem Chromosom 10q.24.2 lokalisiert und konnte als einziges MRP Mitglied immer wieder in den apikalen Membranen polarisierter Zellen nachgewiesen werden. Die höchsten MRP2 Expressionsraten sind in den Zotten des proximalen Jejunums gefunden worden. Das Protein wird auch in der Leber, in der Niere, im Dünndarm, im Kolon, in der Gallenblase, in der Plazenta und in der Lunge exprimiert (van der Deen et al., 2005; Deeley et al., 2006; Glaeser et al., 2008). MRP2 übernimmt im Vergleich zu MRP1 auch noch wichtige Funktionen bei der hepatobiliären Ausscheidung. Hierbei transportiert MRP2 konjugierte Gallensäuren, Glutathion-S-Konjugate, Glutathiondisulfid und weitere anionische amphiphile Verbindungen. Fehlt dieser Transporter infolge von Mutationen, so kommt es zur Ausbildung des Dubin-Johnson-Syndroms, das mit einer Hyperbilirubinämie verbunden ist (Deeley et al., 2006; Jedlitschky et al., 2006).

Das engste Homolog zu MRP1 ist der 1997 identifizierte MRP3 Transporter (ABCC3), der wie MRP1 meist in der basolateralen Membran polarisierter Epithelzellen anzutreffen ist. Das MRP3 Gen ist auf dem Chromosom 17q.21.33 lokalisiert und wird vor allem in Nebenniere, Pankreas, Darm, Gallenblase und Plazenta exprimiert. Geringere Expressionen zeigen sich in der Leber, in den Nieren und in der Prostata. Der MRP3 Transporter ist zwar der engste Verwandte von MRP1, doch in Bezug auf die Substratspezifität unterstützt er nicht den Transport von Glutathion und vieler GSH-Konjugate. Dadurch können Zellen mit einem hohen MRP3 Proteinanteil keine Resistenzen gegen Zytostatika, die an den Transport von GSH gebunden sind, ausbilden. Davon ausgeschlossen sind aber Etoposide und Teniposide (Borst et al., 2002; van der Deen et al., 2005; Deeley et al., 2006). Vielmehr ist MRP3 ein wichtiger Transporter für konjugierte Gallensalze und die von MRP1 und MRP2 nicht transportierten einwertigen Gallensalze, wie Cholsäure, Taurocholsäure und Glykocholsäure. Somit spielt MRP3 eine wesentliche Rolle im Schutz der Leber gegen eine Ansammlung schädigender Endo- und Xenobiotika (Deeley et al., 2006).

1997 sind die Gene MRP4 (ABCC4) und MRP5 (ABCC5, MOAT C) zum ersten Mal beschrieben worden. Das MRP4 Gen ist auf dem Chromosom 13q.32.1 und das MRP5 Gen auf dem Chromosom 3q27.1 lokalisiert. Das genaue Expressionsmuster von MRP4 und MRP5 ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Mehr oder weniger hohe Expressionen vom MRP4 Gen

zeigen sich im Ovar, im Hoden, in den Nebennieren, in der Lunge, im Dünndarm und in etwas höheren Mengen in der Niere und in der Prostata (Borst et al., 2002; van der Deen et al., 2005; Deeley et al., 2006). Untersuchungen an unterschiedlichen Gewebetypen konnten belegen, dass MRP5 ubiquitär expremiert wird. Die höchsten Expressionswerte wurden dabei im Skelettmuskel und im Gehirn nachgewiesen (Kool et al., 1997; Belinsky et al., 1998; McAleer et al., 1999; Zhang et al., 2000). Die Proteine MRP4 und MRP5 befinden sich abhängig von der Gewebeart entweder in den apikalen oder basolateralen Membranen polarisierter Zellen. Beide Transporter sind wie MRP1, 2- und 3 organische Anionenpumpen. Doch sie sind zudem in der Lage, Nukleoside, Nukleotid-Analoga und zyklische Nukleotide durch Membranen zu befördern (Deeley et al., 2006).

Das 6. Mitglied der MRP Familie ist das MRP6 Gen (ABCC6). Es ist wie MRP1 auf dem Chromosom 16.13.1 lokalisiert und wird hauptsächlich in der Leber und in der Niere expremiert. Trotz gleichen Ursprungs hat MRP6 nicht mehr Ähnlichkeit mit MRP1 als die Transporter MRP2 oder MRP3. In vitro Studien haben gezeigt, dass MRP6 eine Reihe von GSH-konjugierten organischen Anionen, wie LTC₄, S-(2,4-Dinitrophenyl)-glutathion und N-Ethylmaleimid-S-glutathion (NEM-GS), wie auch den Endothelin Rezeptorantagonisten BQ-123 transportiert. Zudem sind niedrige Resistenzentwicklungen gegenüber verschiedenen Epidophyllotoxinen und Anthrazyklinen beobachtet worden (van der Deen et al., 2005; Deeley et al., 2006).

Die bisher jüngsten enteckten MRP verwandten Gene sind die Transporter MRP7 (ABCC10), MRP8 (ABCC11), MRP9 (ABCC12) und MRP10 (ABCC13). Sie machen die MRP Familie nach heutigem Forschungsstand komplett, wobei das Wissen über diese Transporter im Vergleich zu den anderen MRP-Mitgliedern noch sehr begrenzt ist.

Das MRP7 Gen, welches auf dem Chromosom 6p.21.1 lokalisiert ist, konnte zwar in vielen Geweben gefunden werden, doch die Expressionsraten blieben dabei sehr gering. Aktuell ist bekannt, dass der MRP7 Transporter in vitro E₂17βG (Estradiol-17-β-D-Glucuronide) und in geringem Ausmaß LTC₄ transportiert, aber im Vergleich zu MRP1, MRP2 und MRP3 mit einer niedrigeren Affinität. MRP7 scheint als einziger MRP Transporter Resistenzen gegenüber Taxanen, wie Paclitaxel und Docetaxel, zu vermitteln, die in der Chemotherapie gegen Brustkrebs, Eierstockkrebs und gegen NSCLC (non small cell lung cancer) eingesetzt werden. Aufgrund dieser Tatsache ist das Interesse auch an diesem Transporter sehr groß (Deeley et al., 2006; Glaeser et al., 2008).

MRP8 und MRP9 zeigen mit ungefähr 49 % große Ähnlichkeiten. Zudem sind beide Gene auf dem Chromosom 16q.12.1 lokalisiert. MRP8 transportiert wie MRP4 und MRP5 zyklische Nukleotide sowie Glutathionkonjugate, Glucoronide, Sulfat-Konjugate, einwertige

Gallensäuren, Folsäure und das Folsäure Analogon Methotrexat. Die Substratspezifität von MRP9 ist bis heute noch unklar.

Das auf Chromosom 21q.11.2 lokalisierte MRP10 Gen (ABCC13) ist das letzte Mitglied der MRP Familie. Dieses Gen codiert laut aktueller Forschung für keinen funktionellen ABC Transporter (Deeley et al., 2006; Kruh et al., 2007).

1.5 Der „Ubiquitously Expressed Mammalian ABC-Halftransporter“ (UMAT)

Der Transporter UMAT (ubiquitously expressed mammalian ABC-halftransporter) oder ABCB6 ist das 6. Mitglied der Unterfamilie ABCB der ABC Superfamilie und ist auf dem Chromosom 2q.33-36 lokalisiert. Da UMAT nur aus einer Membranverankerungsdomäne (MSD) und einer Nukleotidbindenden Domäne (NBD) besteht, gehört er zu den Halbtransportern der ABC Superfamilie. Es wird angenommen, dass UMAT in der inneren und in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung mitochondrialer Funktionen spielt. Wahrscheinlich ist er für die Aufrechterhaltung der Eisen-Homöostase verantwortlich (Hirsch-Ernst et al., 1998; Kurashima-Ito et al., 2006).

1.6 Zielstellung

Schwermetalle, wie Arsen, Kupfer und Quecksilber, können in der Luft der Umwelt, aber auch an bestimmten Arbeitsplätzen auftreten. Die Inhalation stellt somit einen Expositionsweg gegenüber Schwermetallen dar. Da Arsen unter anderem im Zigarettenrauch enthalten ist, trägt auch das Rauchen zu einer Belastung des Menschen bei (Paschke et al., 2002). Studien in der Stadt Erfurt konnten nachweisen, dass der Abrieb von Bremsbelägen und Reifen zu einer erhöhten Luftkonzentration von Kupfer und Zink in Form von Staubpartikeln führt (Cyrus et al., 2003). Kupfer und Quecksilber sind unter anderem in Amalgamfüllungen enthalten. Hauptsächlich beim Füllen und Entfernen von Amalgam wird Quecksilber in Form von Dampf, als Ionen oder feinen Partikeln vom Körper aufgenommen (WHO 2007). Da Metalle von Natur aus nicht biodegradierbar und somit persistent sind, können sie nur durch Transporter eliminiert oder dauerhaft in Zellen an Proteine gebunden abgelagert werden. Da auch die ATP abhängigen ABC Transporter an der Elimination von Metallen beteiligt sein können und der Metallstress zu einer Induktion der Transporter führen kann, soll dieser Aspekt in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass einige Transporter der MRP-Familie am Transport unterschiedlicher Metallkomplexe beteiligt sind, wobei die Datenlage diesbezüglich noch lückenhaft ist (Wortelboer et al., 2008, Leslie et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit soll die Expression der Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP) 1-5 und zusätzlich die des Ubiquitously Expressed Mammalian ABC Half-Transporter (UMAT) an der H322-Zellkultur untersucht werden. Die vorliegende Arbeit soll zeigen, inwiefern der Metallstress unter Arsenit, Kupfer und Quecksilber ein möglicher Faktor zur Induktion der Expression der genannten Gene darstellt.

Zellkulturen sind leicht zugängliche Modellsysteme, die sehr häufig für Forschungszwecke eingesetzt werden, um Informationen über Stoffwechselforgänge, Signaltransduktion als auch Protein- oder Genexpression zu sammeln. Für alle Versuchsreihen sind in der vorliegenden Arbeit adherent wachsende Kulturen der humanen Lungentumorzelllinie H322 eingesetzt worden. Da die H322-Zellen die Fähigkeit zur Kontakthemmung verloren haben wachsen sie trotz Konfluenz immer weiter. Aufgrund der Tatsache, dass verschiedene Konfluenzbedingungen die Qualität und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinflussen können, beschäftigt sich der erste Teil der Arbeit mit dieser Thematik. Hierbei soll geklärt werden, welchen Einfluss die Konfluenzen (80 %, 100 % und 100 % + 3d) mit und ohne die Metallinkubation (für 72 h) mit As(III), Cu(II) und Hg(II) auf die Expression von MRP 1-5 und UMAT haben. Im zweiten Teil der Arbeit soll der Langzeiteffekt von Hg(II) für 28 Tage auf die Genexpression der genannten Transportproteine geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsgüter

Brutschrank	Function Line	Heraeus-Instrument, Langenselbold
Digitalkamera	Coolpix 5000	Nikon, Japan
Reaktionsgefäße	2 ml, 0,5 ml...	Roth, Karlsruhe
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer		Roth, Karlsruhe
Mikroskop	Nikon	Japan (Zeiss, Jena)
Kühlschrank		Hans-S. Schröder GmbH Hamburg
Kühlzentrifuge		Biofuge fresco Heraeus-Instrument
Pipetten		Eppendorf
Pipetus		Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Real-Time PCR	Rotor-Gene 2000	Corbett Research, Australia
Serologische Pipetten		TPP, Trasadingen
Spektralphotometer	DU 7500	Beckman, München
Sterilbank	Hera-safe	Heraeus-Instruments, Gera
Wasserbad	GFL 1083	Technik, Burgwedel
24 Well		TPP, Trasadingen
Zentrifugenröhrchen	15 ml	TPP, Trasadingen

2.1.2 Chemikalien

MTT-Assay	Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
	MTT-Reagenz	Gibco-Lifescience, Berlin
	Isopropanol	Roth, Karlsruhe
	PBS	Biochrome, Berlin

Zellkultur	DMEM Trockensubstanz	Gibco, Berlin
	Fetales Kälberserum	Promo Cell, Heidelberg
	Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
	PBS Instamed	Biochrom, Berlin
	Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin
RNA-Isolation	TRItdity G	AppliChem GmbH, Darmstadt

1-Brom-3-chlor-propan	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol, Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
DEPC-Wasser	

2.2 Zellkultur

2.2.1 Tumorzelllinie H322

Für alle Versuchsreihen in der vorliegenden Arbeit ist eine Monolayerkultur aus H322-Zellen verwendet worden. Freundlicherweise hat Professor Wiebel vom Helmholtz-Zentrum München, Institut für Toxikologie, die Zellen zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um nicht zilienträgende Clara Zellen mit einer endogenen Mutation im Tumorsuppressorgen p53, die von einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC-Non small cell lung cancer) abstammen (Schuller et al., 1987).

2.2.2 Kultivierung, Passagieren und Durchführung der Kurz- und Langzeitexperimente

Um die Anwesenheit von Mycoplasmen in den Zellkulturen auszuschließen, sind regelmäßig Tests durchgeführt worden. Die Zellen sind in Kulturflaschen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert worden. Der Austausch des Kulturmediums erfolgte dreimal in der Woche (Montag-Mittwoch-Freitag). Vor jedem Mediumwechsel sind die Zellen unter dem Mikroskop hinsichtlich der Vitalität, der Zellmorphologie und eventueller Kontaminationen betrachtet worden. Wenn die Zellkultur nach 7-10 Tagen Wachstum eine Konfluenz von ungefähr 80-90 % erreicht hatte, war der nächste Schritt die Subkultivierung (Passagieren). Um die Wirkung von Trypsin nicht zu beeinträchtigen, wurde das Zellmedium sorgfältig abgesaugt und die Zellen mit 37 °C warmer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, phosphate buffered saline; pH 7,4) behutsam umspült. Im Anschluss daran ist der Zellrasen mit 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS-Lösung) für 3-5 min bei 37 °C inkubiert worden. Danach erfolgte die Zugabe von PBS im gleichen Mengenverhältnis wie die Trypsin-Lösung und die Überführung in ein steriles Zentrifugenröhrchen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei RT mit 900 U/min für 5 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes sind die Zellen in frischem Medium resuspendiert worden. Der nächste Schritt war die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal Zählkammer. Bei einer Zelldichte von 20000-50000 Zellen/ml Medium sind die Zellen abhängig von den weiterführenden Experimenten in Kulturschalen oder Kulturplatten ausgesät worden, um sie für die Versuchsreihen einzusetzen.

Für die Kurzzeitexperimente mit Arsenit, Cu(II) und Hg(II) sind die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 40 %, 80 % und 100 % mit 2,5 µl und 5 µl der Testsubstanz behandelt worden. Nach Ende der Inkubation von 72 h wurden die Kulturen bei einem Wachstum von 80 %, 100 % und 100 % + 3 Tage mit der TRItidy-Methode geerntet und anschließend bei -80 °C eingefroren. Beim Langzeitversuch mit Hg(II) sind die gezüchteten H322-Zellen am 1. Tag auf drei 6-Well-Kulturplatten (MTT-Well, Erhaltungs-Well und PCR-Well) und eine 24-Well-Kulturplatte umgesetzt worden. Die Beimpfung mit 2,5 und 5 µM Hg(II) erfolgte sofort nach der Passage und in den darauf folgenden Tagen bei jedem Mediumwechsel. Sobald die Zellen ein konfluentes Wachstum von 80 % erreicht hatten, wurde eine erneute Subkultivierung auf jeweils 3 neue 6-Well-Platten (MTT-Well, Erhaltungs-Well und PCR-Well) und 3 neue 24-Well-Platten (Kontroll-Well und 2 Hg-Inkubations-Wells mit 2,5 und 5 µM Hg(II)) vorgenommen. Dieser Ablauf wiederholte sich am 14. und am 21. Inkubationstag. Wobei am 21. Tag des Langzeitversuchs eine zusätzliche 6-Well-Platte für den Konfluenztest mit Zellen ausgesät wurde, so dass insgesamt 3 PCR-6-Well-Platten für die Untersuchungen der Expression unter Einfluss der Konfluenz zur Verfügung standen. Die letzte Subkultivierung der Zellen auf 24-Well-Platten fand für den Vitalitätstest am 28. Tag statt.

2.2.3 Vitalitätstest: MTT-Assay

Die in dieser Arbeit eingesetzten Testsubstanzen Arsenit, Cu(II) und Hg(II) wurden zu Beginn der Experimente mit Hilfe des MTT-Assays einer Cytotoxizitätsprüfung unterzogen, um den subtoxischen Konzentrationsbereich für jedes Metallsalz zu ermitteln. Der Vitalitätstest lieferte notwendige Informationen über die Wirkung der Metallsalze in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Lebensfähigkeit der H322-Zellen. Bei diesem Test wird der zu den Tetrazoliumsätzen gehörende schwach gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) durch intrazelluläre Dehydrogenasen vitaler Zellen zum dunkelblauen, wasserunlöslichen Formazan umgewandelt. In dieser Form verbleibt das Formazan in den lebenden Zellen und kann nach erfolgter Zell-Lyse freigesetzt und photometrisch bestimmt werden. Die Zellen sind für diesen Versuch mit einer Zelldichte von 50000/ml Medium in 24-Well-Kulturplatten ausgesät worden. Nachdem die Zellen nach drei Tagen Wachstum eine Konfluenz von 70 % erreichten, erfolgte nach dem Mediumwechsel die Beimpfung der Metallsalze in den jeweiligen Konzentrationen. Bei den Versuchen mit dem MRP-Inhibitor MK571 ist den Zellen die Substanz mit dem Medium verabreicht worden. Die Zugabe der Metallsalze erfolgte 3 h später. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde das Medium durch Umdrehen der 24-Well-Platten entfernt und die Zellen vorsichtig mit 37 °C warmen PBS (500µl/Well) gespült. Im Anschluss daran wurde jedes Well mit 250 µl MTT-

Gebrauchslösung (MTT-Stammlösung und PBS im Verhältnis 1:4) behandelt und nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C in einem Hybridisierungssofen erneut mit 37 °C warmen PBS (500µl/Well) gewaschen. Zur Lyse der Zellen und der damit verbundenen Freisetzung des Formazans ist jedes Well für 1 min im zugedeckten Zustand mit 1 ml Isopropanol/Ameisensäure-Gemisch (Verhältnis 19:1) versetzt worden. Am Ende der Einwirkzeit wurde die Absorption des Formazans bei 560 nm im Beckmann-Photometer gegen den Blindwert von Isopropanol/Ameisensäure ermittelt. Aus den so erhaltenen Messdaten wurden die relativen Vitalitäten der mit Arsenit, Cu(II) oder Hg(II) inkubierten Zellen, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen, errechnet, um Aussagen über die zytotoxischen Effekte der Testsubstanzen machen zu können.

2.3 Real time PCR zur Ermittlung der Genexpression von MRP-Transportern

2.3.1 RNA Isolation

Die Gewinnung der RNA aus den vorbehandelten Zellkulturen nach Ende der Inkubationszeit, erfolgte mit der etablierten Methode nach Chomczynski (1993) mit TRIityd G. Das Prinzip beruht auf einer Trennung zwischen der RNA und den übrigen Zellbestandteilen durch eine saure Guanidinthiocyanat-Phenol-Extraktion. Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums aus den 6-Well-Kulturplatten erfolgte pro Well eine Spülung mit 2 ml warmen PBS (37 °C) und die Zugabe von 1 ml TRIityd G. Die gelösten Zellbestandteile wurden anschließend mit 1000 µl Pipetten in 1,7 ml Tubes überführt und bei -80 °C zur Lagerung eingefroren. Im weiteren Verlauf der Isolation sind die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 100 µl 1-Brom-Chlorpropan pro Tube versetzt worden. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 15 s per Hand geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zum Erreichen der Phasentrennung sind die Proben in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge für 15 min bei 11000 U/min zentrifugiert worden. Die so entstandene RNA-haltige wässrige obere Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,9 ml Tube pipettiert und gleich darauf mit 500 µl Isopropanol versetzt. Es folgte ein Schütteln für 15 s mit der Hand und eine 15-minütige Inkubationszeit auf Eis. Danach wurden die Reaktionsgefäße in der Zentrifuge erneut bei 11000 U/min für 15 min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der erhaltende Überstand entfernt und die RNA mit 1 ml 70 % Ethanol (Ethanol/DEPC) durch 15 s schütteln mit der Hand gewaschen. Nach erfolgter 10-minütiger Zentrifugation bei 9000 U/min bei 4 °C wurde der Überstand wieder entfernt und die RNA diesmal mit 1 ml 100 % Ethanol durch 15 s Schütteln per Hand gereinigt. Die Tubes sind wieder für 10 min bei 4 °C bei 9000 U/min zentrifugiert worden. Unter dem Abzug ist der Überstand abgenommen und die RNA im umgedrehten Reaktionsgefäß auf dem Papier für ca. 5

min getrocknet worden. Nach der Zugabe von 20 µl DEPC-Wasser und einer Ruhezeit von 30 min auf Eis wurde die gelöste RNA bei -80 °C eingefroren.

2.3.2 RNA Gehaltsbestimmung mittels Spektrometer

Die RNA ist im Verhältnis 1:200 mit 3 mM NaH₂PO₄-Puffer (pH 8,5) in DEPC-Wasser verdünnt worden. In einer Quarzküvette wurde die Absorption der RNA-Lösung bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und zusätzlich bei 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) gemessen, um eine Proteinverunreinigung auszuschließen. Bei der Berechnung des RNA-Gehalts lag bei einer Absorption von 1 OD der Gehalt bei 40 ng/µl. Anschließend ist der Quotient aus den gemessenen OD bei 260 nm und 280 nm gebildet worden, um die Reinheit der RNA-Lösung beurteilen zu können. Der Quotient sollte dabei einen Wert zwischen 1,7 und 2,0 haben, damit die RNA für die folgenden Reaktionen weiter verwendet werden konnte.

2.3.3 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese sind 2 µg RNA verwendet worden. Zu Beginn wurden die RNA-Proben und die zusätzlich benötigten Reagenzien aus dem Gefrierschrank auf Eis aufgetaut. Ein Volumen der RNA-Lösung entsprechend einer RNA-Menge von 2 µg ist anschließend mit DEPC-Wasser auf 7 µl aufgefüllt worden. Die angesetzten Proben sind mit einem Mix aus

DNase (1 u/µl)	2 µl
10x Puffer (DNase)	1 µl

im Mastercycler für 30 min bei 37 °C behandelt worden. Ein Reaktionsstopp wurde durch die Zugabe von 1 µl DNase-Stopp-Lösung und 10-minütiges Erhitzen bei 65 °C erreicht. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 1 µl Random Primer und einer Hitzeeinwirkung von 70 °C für 5 min. In der Zwischenzeit ist der zweite Mix aus

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

für die weitere Synthese hergestellt worden. Die Probelösungen sind jeweils mit 13 µl des vorbereiteten Ansatzes versetzt und im nächsten Schritt für 1 h bei 37 °C (Synthese) und für 5 min bei 95 °C (Abbruch der Synthese) im Mastercycler erhitzt worden.

2.3.4 Real-time PCR

Zur weiteren Untersuchung der gewonnenen cDNA (aus 2 µg RNA) wurde die etablierte Methode der Real-time PCR bzw. der semi-quantitativen Echtzeit-PCR (Rotor-Gene 2000, Corbett Research, Australia) angewendet. Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, eine relative Quantifizierung der untersuchten Gene MRP1-5 und UMAT vorzunehmen. Hierbei erfolgte die Detektion der vervielfältigten DNA-Produkte mit dem unspezifischen Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Dieser Farbstoff zeigt in ungebundener Form eine relativ geringe Fluoreszenz (Anregungswellenlänge: 470 nm, Emissionswellenlänge: 585 nm). Sobald eine Bindung an doppelsträngige DNA stattgefunden hat, fängt SYBR Green an zu fluoreszieren, wobei die Fluoreszenz-Lichtstärke proportional zur DNA-Menge ist (Bustin et al., 2000; Wrba et al., 2007). Die Ermittlung der PCR-Messdaten erfolgte mit Hilfe der Software Rotor Gene 4.6.94 (Corbett Research, Australia). Auch bei dieser Methode sind die Reagenzien auf Eis pipettiert worden. Von jeder cDNA-Probe (25 µl) eines Versuches ist 10 µl entnommen worden. Diese unverdünnte cDNA wurde als Standard I zusammengefasst. Zum Erstellen der Eichgerade wurde für diesen Standard I eine Konzentration von 10^6 Kopien festgelegt und eine Verdünnungsreihe hergestellt:

Standard I	unverdünnt	10^6 Kopien
Standard II	4 µl Standard I + 4 µl H ₂ O*	5×10^5 Kopien
Standard III	1 µl Standard I + 9 µl H ₂ O	10^5 Kopien
Standard IV	1 µl Standard II + 9 µl H ₂ O	5×10^4 Kopien
Standard V	1 µl Standard III + 9 µl H ₂ O	10^4 Kopien

*H₂O von Fermentas

Zu den restlichen 15 µl cDNA ist jeweils 60 µl DEPC-Wasser (Verhältnis 1:4) zugefügt worden. Im nächsten Schritt wurde ein Mastermix aus

DEPC-Wasser	6,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
SYBR-Green I (1:3000 Verdünnung)	1 µl

Primer (10 μ M jeder Primer)	1,5 μ l
2 x PCR-Mastermix	12,5 μ l

vorbereitet, von dem jedes Reaktionsgefäß jeweils 22,5 μ l erhalten hat. Zu dem Mastermix sind entweder 2,5 μ l verdünnte cDNA, 2,5 μ l der Standards oder 2,5 μ l DEPC-Wasser als Blindwert zugefügt worden. Jedes zu untersuchende Reaktionsgefäß hatte demnach ein Endvolumen von 25 μ l. Die PCR erfolgte in Doppelbestimmung und wurde für jedes untersuchte Gen im Real-time Thermocycler nach folgendem Schema durchgeführt:

1. DNA-Denaturierung: 2 min 95 °C
- es folgten 45 Zyklen:*
2. DNA-Denaturierung: 30 s 95 °C
 3. Anlagerung des
Primers: 30 s Annealing-Temperatur
 4. Polymerisation: 30 s 72 °C
 5. Fluoreszenzmessung: 10 s Messtemperatur
 6. Endpolymerisation 4 min 72 °C

Nach Ablauf dieses Programms wurde der Schmelzpunkt T_m des PCR-Produktes bestimmt, um die Integrität des untersuchten Genprodukts zu beurteilen. Dafür wurde die Temperatur kontinuierlich erhöht und gleichzeitig die Stärke der Fluoreszenz gemessen. Wird die Schmelztemperatur T_m des untersuchten Gens erreicht, lösen sich die SYBR Green Moleküle von der DNA und die Leuchtkraft der Fluoreszenz nimmt rapide ab. Die Ergebnisse konnten weiter ausgewertet werden, wenn der Schmelzpunkt der PCR-Probe mit dem des sequenzierten Zielprodukts übereinstimmte. Zur weiteren Quantifizierung des PCR-Produkts wurde der threshold-cycle C_t oder Schwellenwertzyklus herangezogen, da zu diesem Zeitpunkt noch ein exponentielles Wachstum bestand. Dieser Schwellenwertzyklus entspricht der Anzahl an Zyklen, bei der sich das Fluoreszenzsignal von der Probe erstmalig signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt (Gibson et al., 1996). Die C_t -Werte wurden gegen den Logarithmus der Konzentrationen der eingesetzten Standards auf einer Eichgerade eingetragen. Mit dieser Standardkurve war es möglich, die entsprechende virtuelle Kopienzahl zu bestimmen. Um Messabweichungen zu minimieren, wurde die Expression der untersuchten Gene MRP1-5 und UMAT in Relation zu einem adäquaten Referenzgen (GAPDH und 18s RNA) gestellt. GAPDH und 18s RNA übernehmen hierbei die Funktion eines internen Standards, der idealerweise unter Stresssituationen ein konstantes Expressionsniveau aufzeigen

sollte. Im Anschluss wurde die Änderung der Expression im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle weiter bestimmt.

Tab. 3 PCR-Primersequenzen

Primer	Sequenz (5'→3')	Produktgröße (bp)	Annealingtemperatur	Mess-temperatur
MRP1	F: TACATGAAGGCCATCGGACTC R: AGACGCTCAGCCGGACTTT	160	57 °C	83 °C
MRP2	F: GTGTTTCCACAGAGCGGCTAG R: GCATGGCTGATATCAAGGAG	234	56 °C	84 °C
MRP3	F: CTCAATGTGGCAGACATCGG R: GGGAGCTCACAAACGTGTG	178	55 °C	85 °C
MRP4	F: ACCACAGGCCAGATAGTCAA R: GGGCAGGAGAATGATTAGAAC	180	55 °C	81 °C
MRP5	F: CGCATCGCACACGTAAAC R: TGGACAATAACACGCAGTCAC	163	57 °C	82 °C
UMAT	F: GGGTGCTGCGGTATGTG R: AATCTCGCCAGGTAGACTGTT	149	56 °C	85 °C
GAPDH	F: GAAGATGGTGATGGGATTTTC R: GAAGGTGAAGGTCGGAGT	226	60 °C	82 °C
18S-rRNA	F: GTTGGTGGAGCGATTTGTCTG R: GGGCAGGGACTTAATCAACGC	348	60 °C	88 °C

2.4 Statistische Auswertung

Die Tabellenkalkulation und die graphische Datenverarbeitung erfolgte mit Hilfe der Softwaresysteme Microsoft Excel und Sigma Plot 10. Die statistische Auswertung der ermittelten Daten ist mit dem Programm GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt worden. Für die Vitalitätstests wurde der t-Test verwendet, um die Signifikanz zu prüfen. Die Ergebnisse der Real-time PCR wurden mit dem Programm GraphPad InStat 3.05 mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA-Analysis of variance) und dem anschließenden Tukey-Kramer Test auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen untersucht. Mit Hilfe der one-way ANOVA werden die Mittelwerte nicht nur zweier, sondern mehrerer Gruppen miteinander verglichen. Dieses Verfahren stellt somit eine Erweiterung des t-Tests dar. Für die vorliegende Arbeit wurde die one-way ANOVA angewendet, um die Konfluenzunterschiede (80 %, 100 % und 100 % + 3d) und die Metallwirkung von Arsenit, Kupfer und Quecksilber (0 µM, 2,5 µM und 5 µM) untereinander auf Signifikanz zu untersuchen. Die Hauptaufgabe in der ANOVA besteht in der Zerlegung der Streuung (Varianz). Hierbei wird die Gesamtstreuung in eine Streuung zwischen den Gruppen und in eine Streuung innerhalb der Gruppen zerlegt. Das Verhältnis zwischen den beiden Größen wird als F-Wert angegeben. Im Unterschied zum t-Test zeigt die ANOVA mit einem signifikanten F-Wert nur an, ob sich die Mittelwerte zwischen den Gruppen signifikant

unterscheiden. Sie zeigt aber nicht, welche Mittelwerte das sind. Um die genauen Gruppen zu identifizieren, die sich signifikant voneinander unterscheiden, sind Post-Hoc-Tests zur Berechnung notwendig (Grinnell et al., 2010). Mit dem Tukey-Kramer Post-Hoc-Test wird ein multipler Mittelwertvergleich durchgeführt, um zu ermitteln welche Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden. Bei Paarvergleichen zeichnet sich der Tukey-Kramer Test durch seine hohe Trennschärfe aus, wodurch er anderen Tests überlegen ist (Rüger, 2002). Alle Ergebnisse dieser Arbeit werden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error of the means) dargestellt. Die verschiedenen Signifikanzniveaus wurden als $* / \star p < 0,05$, $** / \star\star p < 0,01$ und $*** / \star\star\star p < 0,001$ unterschieden.

3 Ergebnisse

3.1 Nutzung humaner Lungentumorzellen

Die Grundlage aller in dieser Arbeit vorgestellten Experimente bildeten Kulturen der humanen Lungentumorzelllinie H322. Diese adhärent wachsende Monolayerkultur diente der Untersuchung von Effekten von Stresssituationen, wie Inkubation mit den Metallsalzen Arsenit, Cu(II) und Hg(II) bei unterschiedlicher Konfluenz. Das Hauptaugenmerk lag dabei vor allem in der Bestimmung der mRNA-Expression der Gene MRP1-5 und UMAT. Der Aufbau der Testreihen gliedert sich in 4 Kurzzeitversuche über 72 Stunden und in einen Langzeitversuch mit einer Gesamtinkubationsdauer von 28 Tagen. Bei den Kurzzeitversuchen ist die Wirkung der Konfluenzen 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage mit und ohne Zugabe von Arsenit, Cu(II) und Hg(II) analysiert worden. In dem sich anschließenden Langzeitversuch wurde der Effekt von Hg(II) auf die H322-Zellen untersucht. Abschließend ist auch hier der Einfluss der Konfluenzen 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage auf die mit Hg(II) vorbehandelten Zellen getestet worden.

3.2 Der Vitalitätstest: MTT-Assay

Um sicher zu gehen, dass die Testkonzentrationen 2,5 und 5 μM der Metallsalze Arsenit, Cu(II) und Hg(II) in einem subtoxischen Konzentrationsbereich liegen, wurde vor Beginn jeder Versuchsreihe ein Vitalitätstest durchgeführt. Der MTT-Assay ist dabei zur Testung der in-vitro-Toxizität der eingesetzten Metalle in der H322-Zellkultur herangezogen worden. Mit den ermittelten Daten konnte die Zellvitalität bei unterschiedlichen Metallkonzentrationen bestimmt werden. Die ermittelten Werte beziehen sich alle auf die unbehandelte Kontrolle mit einer gleich 100 % gesetzten Vitalität. Die Grenze vom toxischen zum subtoxischen Bereich wurde bei einer Vitalität von 80 % festgelegt. Parallel zur Messung der alleinigen Metallzytotoxizität ist die Wirkung von MK571 - einem Inhibitor der MRP-Transporter 1-5 (Haimeur et al., 2004; Deeley et al., 2006) - bei zeitgleicher Anwesenheit der Metalle auf die Vitalität der Lungentumorzellen untersucht worden.

Im Vitalitätstest mit Arsenit (siehe Abb. 3 A) wurden die Konzentrationen von 2,5 - 50 μM Arsenit gewählt. Für den MTT-Assay mit Kupfer (siehe Abb. 3 B) sind die Testkonzentrationen 5 - 200 μM Cu(II) eingesetzt worden. Im Versuch mit Quecksilber (siehe Abb. 3 C) wurde die aufsteigende Konzentrationsreihe von 2,5 - 80 μM angewendet.

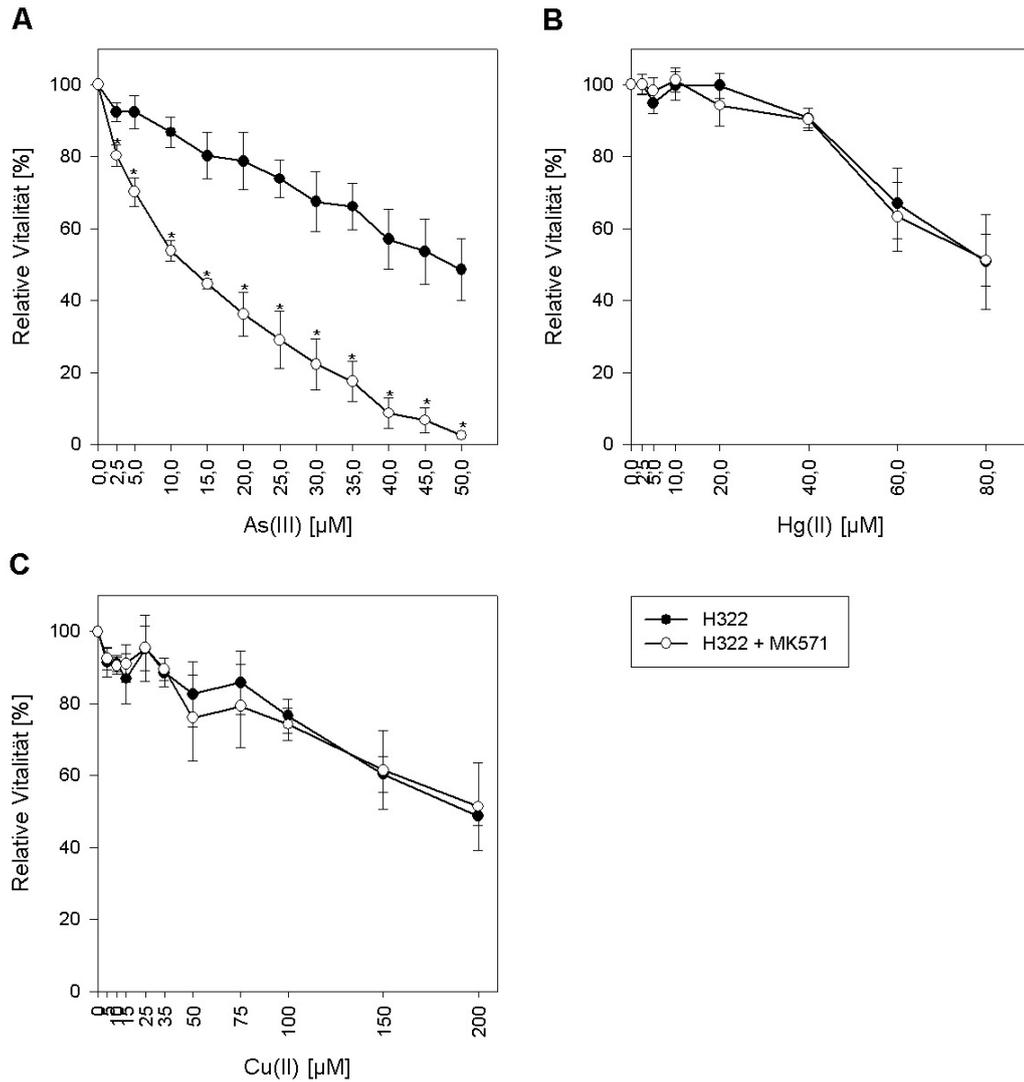


Abb. 3 MTT-Assay mit den ermittelten relativen Vitalitäten von H322-Zellen nach Inkubation mit A Arsenit, B Cu(II) und C Hg(II) jeweils mit und ohne den MRP Inhibitor MK571. Die Zellkulturen sind 24 h vor Durchführung des Vitalitätstests mit der zugehörigen Verdünnungsreihe von Arsenit 2,5 - 50 µM, Cu(II) 5 - 200 µM und Hg(II) 2,5 - 80 µM behandelt worden. Die Zugabe des MRP Inhibitors MK571 erfolgte 3 h vor der Metallinkubation. Die Vitalität un behandelter Kontrollen wurde 100 % gesetzt. (Mittelwert ± Standardabweichung; ★p < 0,05 Signifikanz zur H322-Zellkultur ohne Vorbehandlung mit MK571; N = 3)

In jedem Diagramm (A-C) der Abb. 3 ist mit steigender Konzentration eine abnehmende Vitalität der Zellen zu beobachten, wobei jeder Versuch einen unterschiedlichen subtoxischen Konzentrationsbereich erkennen lässt. Beim Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Behandlung mit dem MRP Inhibitor MK571 ist nur im Versuch mit Arsenit (Versuch A) ein signifikanter Effekt zu verzeichnen. Daraus könnte geschlossen werden, dass vorhandene MRP-

Transporter (1-5) am Schutz der Zellen vor der toxischen Wirkung von Arsenit beteiligt sind. Die Experimente mit Cu(II) und Hg(II) (Abb. 3 B und C) lassen keine signifikanten Unterschiede mit und ohne MK571 erkennen, so dass die Transporter MRP 1-5 auf keine nennenswerte Schutzfunktion gegenüber den toxischen Effekten von Cu(II) und Hg(II) hindeuten. Im MTT-Assay mit Arsenit (Abb. 3 A) ist ab einer Konzentration von 5 μM Arsenit mit und ohne MK571 ein signifikant divergierender Kurvenverlauf zu beobachten. Zudem wird beim Vergleich der drei Vitalitätstests sichtbar, dass der toxische Grenzbereich mit Arsenit schon bei viel niedrigeren Konzentrationen erreicht wird als bei den Versuchen mit Kupfer und Quecksilber. Bei Betrachtung von Versuch A zeigt sich schon bei alleiniger Inkubation mit 15 μM Arsenit eine Reduktion der Vitalität um 20 %. Mit der Kombination von MK571 erhöht sich die zytotoxische Wirkung von Arsenit signifikant, so dass ab 5 μM Arsenit eine Vitalitätsabnahme um 30 % erreicht wird. Im Vergleich dazu sinkt die Vitalität der H322-Zellen im MTT-Assay mit Kupfer erst nach Zugabe von 100 μM unter 80 %. Die mit MK571 behandelten Zellen zeigen ab 50 μM Cu(II) eine Reduktion der Vitalität um 24 %. Beim Experiment mit Hg(II) liegt die toxische Grenze mit und ohne MK571 zwischen 40 μM und 60 μM Hg(II) (Abb. 3 C). So ist die Vitalität ab 40 μM um 10 % und ab 60 μM um 35 % gesunken. Auf der Basis dieser Ergebnisse ist sichergestellt worden, dass die in den folgenden Experimenten eingesetzten Testkonzentrationen von 2,5 und 5 μM Arsenit, Cu(II) und Hg(II) ohne die zusätzliche Inkubation mit dem MRP Inhibitor MK571 in einem subtoxischen Bereich liegen.

3.3 Einfluss unterschiedlicher Konfluenzen mit und ohne Inkubation mit den Metallsalzen Arsenit, Cu(II) und Hg(II) auf die mRNA- Expression von MRP1-5 und UMAT in der humanen Lungentumorzelllinie H322

Das Interesse der folgenden Experimente lag darin, die Wirkungen der Konfluenzen 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage mit und ohne die Metalle Arsenit, Cu(II) und Hg(II) auf die m-RNA Expression der Gene MRP1-5 und UMAT zu untersuchen.

Wahl des Referenzgens:

Um die Transkriptmengen der Zielgene richtig quantifizieren zu können war es notwendig, die Ergebnisse auf ein stabiles bzw. sowohl bei unterschiedlichen Konfluenzen als auch bei Metallinkubationen nicht reguliertes Referenzgen zu beziehen. Bei dieser so genannten relativen Quantifizierung standen die untersuchten Gene 18S RNA und GAPDH zur Auswahl. Die Ergebnisse (Abb. 4 und 5) zeigen, dass die Expression von 18S RNA in H322-Zellen unter den oben erwähnten experimentellen Bedingungen deutlich stabiler ist, als die von GAPDH. Aus

diesem Grund bildeten die ermittelten Expressionswerte von 18S RNA die Berechnungsgrundlage für die Messdaten der mRNA-Gehalte in allen durchgeführten Experimenten.

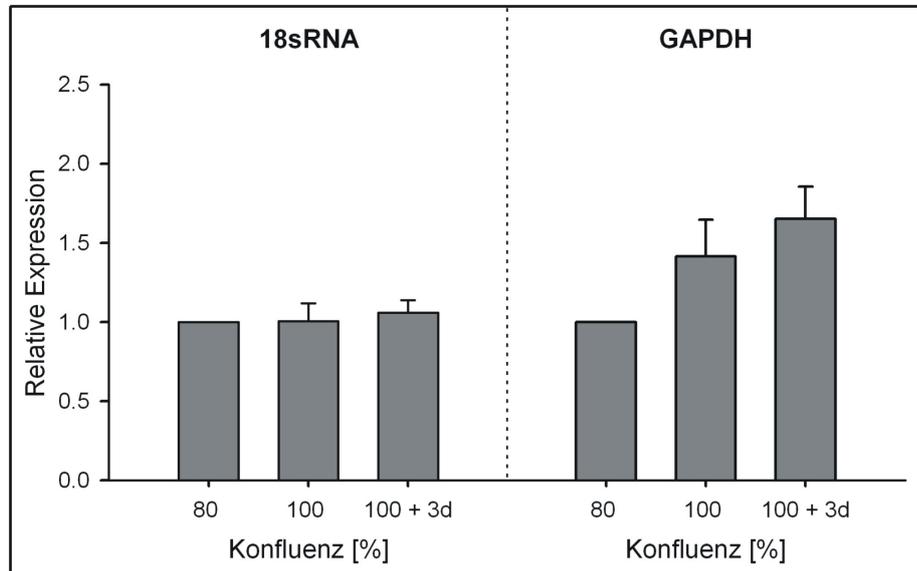


Abb. 4 Relative mRNA-Expression von 18S RNA und GAPDH in H322-Zellen im Konfluenzversuch ohne Metallinkubation bei Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % + 3 d.

(Mittelwert \pm Standardabweichung mit Bezug auf die unbehandelte Zellkultur mit 80 % Konfluenz; 18S RNA in unbehandelten Zellen bei 80 % Konfluenz = $1 \pm 0,08$; GAPDH in unbehandelten Zellen bei 80 % Konfluenz = $1 \pm 0,22$; n = 8)

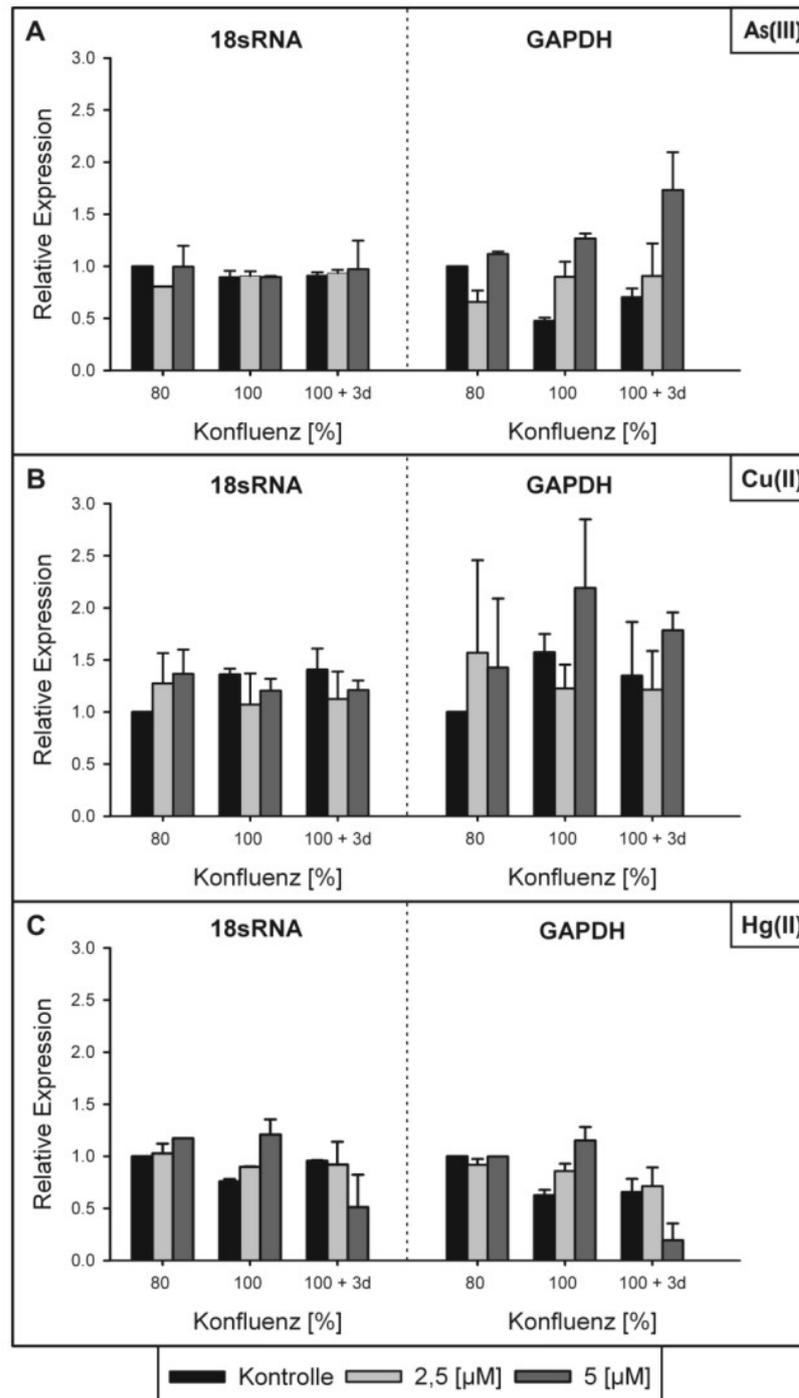


Abb. 5 Relative mRNA- Expression von 18S RNA und GAPDH in H322-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit 2,5 und 5 µM Arsenit, Cu(II) und Hg(II) bei Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % + 3 d. Die Zellen sind 72 Stunden vor Erreichen der untersuchten Konfluenz mit A 2,5 µM und 5µM Arsenit, B 2,5 µM und 5µM Cu(II) und C 2,5 µM und 5µM Hg(II) behandelt worden. Die Expressionen der 18S RNA oder GAPDH in den Kontrollen mit 80 % Konfluenz ist gleich 1 gesetzt und Bezugswert der anderen Werte. (in A: bei 18S RNA = $1 \pm 0,24$ und bei GAPDH = $1 \pm 0,09$; in B: bei 18S RNA = $1 \pm 0,02$ und GAPDH = $1 \pm 0,31$; in C: bei 18S RNA = $1 \pm 0,00$ und GAPDH = $1 \pm 0,12$; Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 4)

3.3.1 Effekt unterschiedlicher Konfluenz in H322-Zellen ohne Metallinkubation auf die mRNA-Expression von MRP1-5 und UMAT

Die in diesem Experiment vorgestellten Ergebnisse zeigen den Einfluss der Konfluenz bei 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage auf die mRNA-Expression der Zielgene MRP1-5 und UMAT. Nach dem Anwachsen der Zellen bis zur gewünschten Konfluenz sind die Transkriptmengen der Transportergene mittels semiquantitativer PCR bestimmt worden (vgl. Abb. 6).

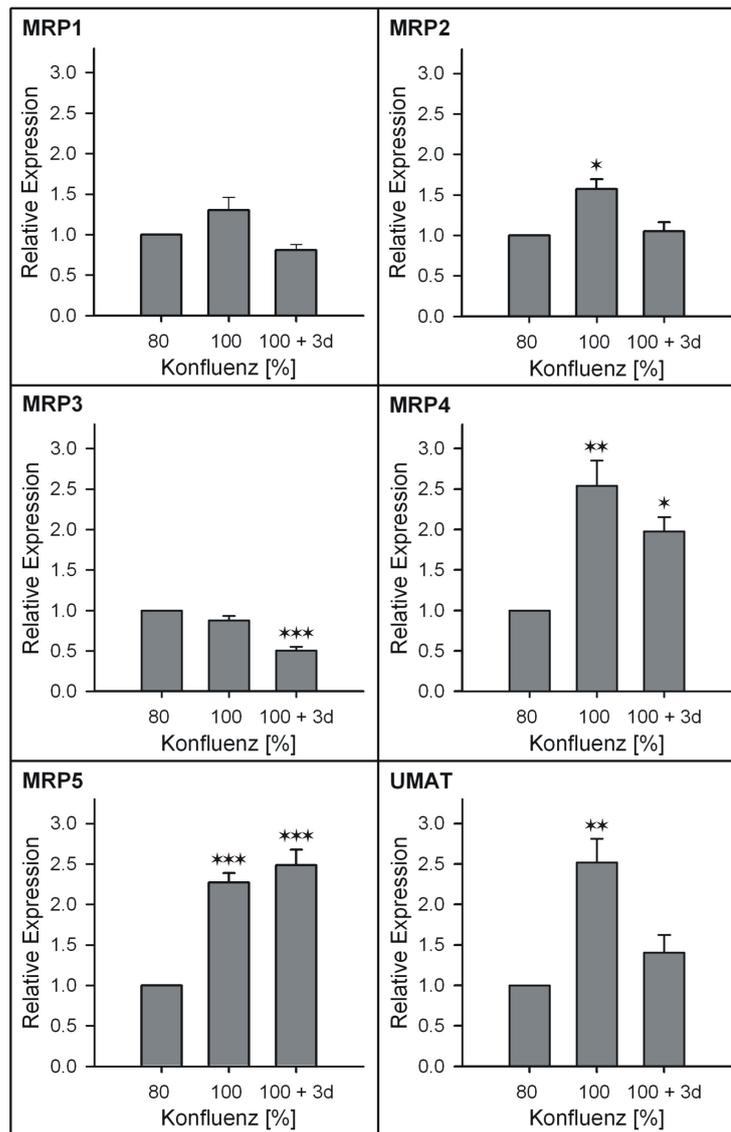


Abb. 6 Relative mRNA- Expression von MRP1-5 und UMAT bei Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % + 3 Tage ohne Schwermetallinkubation. Die Expression des jeweiligen Zielgens in der Kontrolle mit 80 % Konfluenz ist gleich 1 gesetzt und Bezugswert der anderen Werte. (Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$; $n = 8$; Referenzgen: 18S RNA)

Die in Abb. 6 graphisch dargestellten mRNA-Mengen der untersuchten ABC-Transporter zeigen bei jedem Gen - mit Ausnahme von MRP1 - signifikante Unterschiede zwischen konfluenten Zellkulturen im Vergleich zur Zellkultur mit 80 % Konfluenz bezüglich der Transkriptmengen. Bei MRP1 besteht nur zwischen der Expression in 100 % und 100 % + 3 d konfluenten H322-Zellen ein signifikanter Unterschied, bei dem letztere einen auf das 0,6fache reduzierten mRNA-Gehalt aufweisen. Bei Betrachtung der Expression von MRP2 ist im Vergleich zu 80 % konfluenten Zellen ein signifikanter Expressionsanstieg auf das 1,6fache in der Kultur mit 100 % Konfluenz zu verzeichnen. Beim MRP3-Transporter ist die Transkriptmenge in der 100 % + 3 d konfluenten Zellkultur im Vergleich zur Konfluenz mit 80 % auf das 0,5fache signifikant reduziert. Beim Zielgen MRP4 ist mit Bezug auf die 80 % konfluenten Zellen die Transkriptmenge in der Kultur mit 100 % Konfluenz auf das 2,5fache und in den 100 % + 3 d konfluenten Zellen auf das 2fache signifikant erhöht. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich beim mRNA-Gehalt von MRP5, welcher im Vergleich zur 80 %igen Konfluenz bei 100 % auf das 2,3fache und bei 100 % + 3 d auf das 2,5fache signifikant erhöht ist. UMAT lässt eine signifikante Induktion bei 100 % auf das 2,5fache im Vergleich zur Kultur mit 80 % Konfluenz erkennen. Bei der Gegenüberstellung der Transkriptmengen in 100 % konfluenten Zellen und in der Kultur mit Konfluenz 100 % + 3 Tage zeigt sich bei der zuletzt genannten Zellkultur eine signifikante Repression auf das 0,6fache. Zudem ist in Abb. 6 bei den Genen MRP1, MRP2, MRP4 und UMAT in Richtung 100 % Konfluenz eine Induktion zu beobachten, die nach weiterem Zellwachstum wieder absinkt. Beim Vergleich der Transkriptmenge zwischen MRP3 und MRP5 ist eine gegenläufige Entwicklung erkennbar. Hierbei zeigt sich in Richtung der höheren Konfluenz beim MRP3-Gen eine Repression und beim MRP5 eine Expressionssteigerung.

Diese Ergebnisse belegen, dass unterschiedliche Konfluenzen (80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage) der H322-Zellkultur die Expression der Gene MRP2-5 und UMAT signifikant verändern. Bei 100 % Konfluenz zeigen MRP2, MRP4 und UMAT den höchsten mRNA-Gehalt. Mit zunehmender Konfluenz wird MRP5 induziert, MRP3 hingegen wird deutlich reprimiert.

3.3.2 Wirkung von Arsenit in H322-Zellen bei unterschiedlicher Konfluenz

Die in diesem Abschnitt untersuchten Zielgene zeigen nicht nur Expressionseffekte in H322-Zellen mit unterschiedlicher Konfluenz (80 %, 100 % und 100 % +3 d), sondern zusätzlich Behandlungseffekte mit 2,5 μ M und 5 μ M Arsenit nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden. Die erhobenen Daten sind mit Hilfe semiquantitativer PCR bestimmt worden (vgl. Abb. 7).

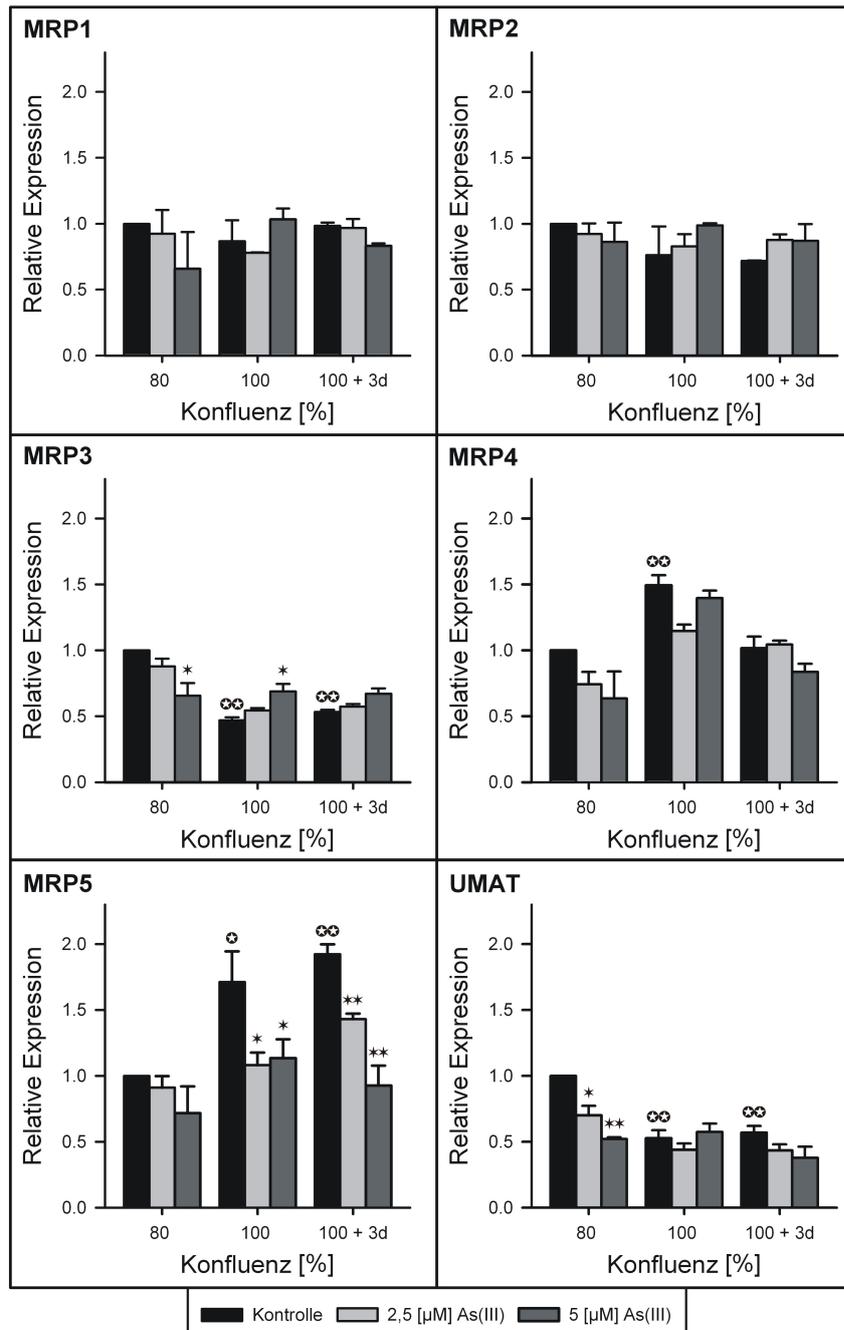


Abb. 7 Relative mRNA-Expression von MRP1-5 und UMAT in H322-Zellen nach 72h Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Arsenit bei Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % + 3 Tage. Die Expression des jeweiligen Zielgens in der Kontrolle mit 80 % Konfluenz ist gleich 1 gesetzt und Bezugswert der anderen Werte. (Mittelwert \pm Standardabweichung; \odot $p < 0,05$ und $\odot\odot$ $p < 0,01$ mit Bezug auf die unbehandelten Kontrollen; * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ mit Bezug auf die unbehandelte Kontrolle der gleichen Konfluenzgruppe; $n = 4$; Referenzen: 18S RNA)

Bei Betrachtung der Effekte auf die Expression in den unbehandelten Kontrollen in Abhängigkeit von der Konfluenz (80 %, 100 % und 100 % + 3 Tage), zeigen sich signifikante Änderungen bei den Zielgenen MRP3-5 und UMAT. Bei MRP1 und 2 ist kein signifikanter Einfluss festzustellen. Bei MRP3 ist die Transkriptmenge der Kontrollkultur bei Konfluenz 100 % und 100 % + 3 Tage im Vergleich zur mRNA-Menge der 80 % konfluenten Kontrolle signifikant auf das 0,5fache reduziert. MRP4 zeigt nur in der Kultur mit 100 % Konfluenz eine signifikante Induktion auf das 1,5fache gegenüber den Zellen mit 80 % Konfluenz. Ein ähnlicher Verlauf ist bei der Expression von MRP5 ebenfalls in den unbehandelten H322-Zellen zu sehen. Im Vergleich zur Kontrollkultur mit 80 % Konfluenz ist die Transkriptmenge bei 100 % auf das 1,7fache und zusätzlich bei 100 % + 3 Tage auf das 1,9fache signifikant erhöht. Die mRNA-Menge von UMAT lässt eine starke Ähnlichkeit zur MRP3-Expression erkennen. Hierbei ist mit Bezug auf die 80 % konfluenten Zellen eine signifikante Repression bei Konfluenz 100 % auf das 0,5fache und bei 100 % + 3 Tage auf das 0,6 fache zu verzeichnen.

Werden die Behandlungseffekte nach 72 Stunden Inkubation mit 2,5 und 5 μM Arsenit auf die mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Konfluenz näher betrachtet, so lassen sich nur bei den Genen MRP3, MRP5 und UMAT signifikante Veränderungen beobachten. Die Transkriptmenge von MRP3 wird nur bei 80 % und 100 % konfluenten Zellen durch die Behandlung mit Arsenit deutlich beeinflusst. Hierbei sinkt die Expression bei Konfluenz 80 % nach Inkubation mit 5 μM Arsenit signifikant auf das 0,7fache und steigt bei Konfluenz 100 % mit 5 μM Arsenit auf das 1,5fache. Bei MRP5 lassen sich erst ab Konfluenz 100 % und 100 % + 3 d signifikante Behandlungseffekte erkennen. Die mRNA-Menge ist bei 100 % konfluenten Zellen mit 2,5 μM Arsenit auf das 0,6fache und mit 5 μM auf das 0,7fache signifikant vermindert. Die Expression der 100 % + 3 d konfluenten Zellen sinkt signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach Inkubation mit 2,5 μM auf das 0,7fache und mit 5 μM auf das 0,5fache. Den gleichen Behandlungseffekt zeigt die mRNA-Menge von UMAT bei Konfluenz 80 %. Hierbei ist die Expression mit 2,5 μM Arsenit auf das 0,7fache und mit 5 μM Arsenit auf das 0,5fache signifikant vermindert. Die Konfluenzen 100 % und 100 % + 3 Tage haben keinen signifikanten Behandlungseinfluss mit Arsenit gezeigt.

Der MTT-Assay mit Arsenit und MK571 unterstützt die Vermutung, dass die Transporter MRP 1-5 am Schutz vor den toxischen Einflüssen von Arsenit beteiligt sind. Im Konfluenzversuch mit Arsenit zeigt aber nur der MRP3-Transporter bei 100 % Konfluenz mit 5 μM Arsenit eine erhöhte Expression. MRP1, MRP2, MRP4, MRP5 und UMAT werden in keinem der Konfluenzstadien induziert.

3.3.3 Wirkung von Cu(II) in H322-Zellen bei unterschiedlicher Konfluenz

Die hier präsentierten Ergebnisse basieren, wie weiter oben beschrieben, auf der Untersuchung der Expressionsänderung von MRP1-5 und UMAT in Abhängigkeit von der Konfluenz (80 %, 100 % und 100 % + 3 d) mit der gleichzeitigen Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Cu(II). Die gewonnenen Messdaten sind mittels semiquantitativer PCR bestimmt worden (vgl. Abb. 8).

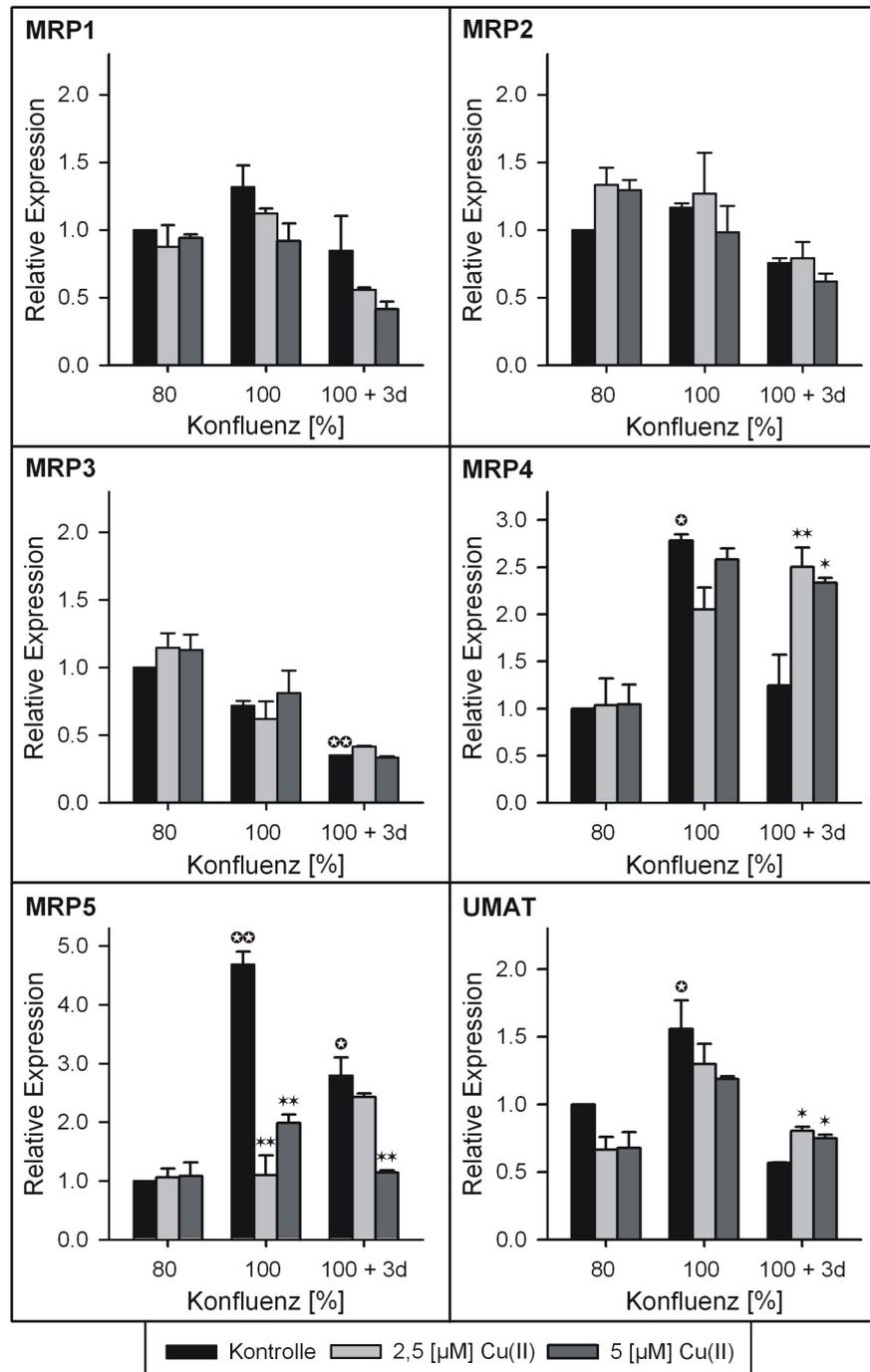


Abb. 8 Relative mRNA-Expression von MRP1-5 und UMAT in humanen H322-Lungentumorzellen nach 72h Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Cu(II) bei Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % + 3 Tage. Die Expression des jeweiligen Zielgens in der Kontrolle mit

80 % Konfluenz ist 1 gesetzt und bildet den Bezugswert der anderen Werte. (Mittelwert \pm Standardabweichung; $\odot p < 0,05$ und $\odot\odot p < 0,01$ mit Bezug auf die unbehandelten Kontrollen; $\star p < 0,05$ und $\star\star p < 0,01$ mit Bezug auf die unbehandelte Kontrolle der gleichen Konfluenzgruppe; n = 4; Referenzgen: 18S RNA)

Bei der Betrachtung der relativen Expression un behandelter Zellkulturen mit Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % + 3 d lassen sich signifikante Effekte bei den Genen MRP3 bis MRP5 und UMAT erkennen. Bei MRP1 und MRP2 zeigen sich keine signifikanten Veränderungen. Der mRNA-Gehalt von MRP3 in der Kontrollkultur mit Konfluenz 100 % + 3 Tage ist im Vergleich zu 80 % konfluenten Zellen auf das 0,3fache signifikant reduziert. Die Expression der 100 % konfluenten Kontrolle ist nicht signifikant moduliert. Bei MRP4 ist nur bei Zellen mit 100 % Konfluenz ein signifikanter Effekt in der Expression mit Bezug auf 80 % konfluente Zellen zu erkennen. Hierbei erhöht sich die Transkriptmenge signifikant auf das 2,8fache. Eine ähnliche Entwicklung der Expression ist bei MRP5 zu sehen. So erhöht sich im Gegensatz zur 80 % konfluenten Kultur der mRNA-Gehalt der un behandelten Zellen mit 100 % Konfluenz signifikant auf das 4,7fache. Aber auch die Kontrolle mit Konfluenz 100 % + 3 Tage zeigt eine signifikante Expressionssteigerung auf das 3fache. Bei dem untersuchten Zielgen UMAT ist wie bei MRP4 eine signifikante Steigerung der Expression nur in der 100 % konfluenten Kontrollkultur zu sehen, wobei hier eine Zunahme auf das 1,6fache vorliegt. Bei der Kontrolle mit 100 % + 3 Tage ist kein signifikanter Effekt zu verzeichnen.

Im Hinblick auf den konzentrationsabhängigen Einfluss von Cu(II) auf die Transkriptmengen der ABC Transporter bei unterschiedlicher Konfluenz lassen sich nur bei MRP4, MRP5 und UMAT signifikante Veränderungen erkennen. Die Gene MRP1 bis MRP3 zeigen keine signifikanten Cu(II)-abhängigen Expressionseffekte. Wird die mRNA-Menge von MRP4 näher beleuchtet, ist nur bei der Kultur mit Konfluenz 100 % + 3 Tage ein signifikanter Effekt im Vergleich zur un behandelten Kontrolle zu verzeichnen. Hierbei steigt die Expression in 2,5 μ M Cu(II) behandelten Zellen auf das 2fache und in 5 μ M Cu(II) inkubierten Kulturen auf das 1,9fache signifikant. Im Gegensatz dazu zeigt MRP5 in H322-Zellen eine signifikante Expressionssenkung in Cu(II) behandelten Kulturen mit der Konfluenz 100 % und 100 % + 3 Tage im Vergleich zu ihren Kontrollen. So sinkt die Transkriptmenge signifikant in der 100 % konfluenten Kultur in 2,5 μ M Cu(II) behandelten Zellen auf das 0,2fache und in 5 μ M Cu(II) inkubierten Kulturen auf das 0,4fache. Bei den Zellkulturen mit der Konfluenz 100 % + 3 d zeigt sich nur ein signifikanter Effekt in 5 μ M Cu(II) inkubierten Zellen, bei denen die Expression im Vergleich zur Kontrolle auf das 0,4fache reduziert ist. Eine signifikante Cu(II) abhängige Expressionsänderung beim Zielgen UMAT ist nur bei H322-Zellen mit der Konfluenz 100 % + 3 Tage zu beobachten. Bei dieser Konfluenz zeigt sich eine Steigerung der

mRNA-Menge in 2,5 μM Cu(II) behandelten Zellen auf das 1,4fache und in 5 μM Cu(II) inkubierten Zellen auf das 1,3fache.

Enge Wachstumsbedingungen (Konfluenz 100 % + 3 Tage) führten in Gegenwart von 2,5 und 5 μM Cu(II) zu einer signifikanten Induktion der Gene MRP4 und UMAT. MRP 5 hingegen wurde ab 100 % Konfluenz in Anwesenheit von Cu(II) deutlich reprimiert. Somit könnten MRP4 und UMAT an der Elimination von Cu(II) beteiligt sein.

3.3.4 Wirkung von Hg(II) in H322-Zellen bei unterschiedlicher Konfluenz

Die folgenden Untersuchungsergebnisse in diesem Kapitel zeigen den Effekt von Hg(II) in den Testkonzentrationen 2,5 μM und 5 μM auf die Expression der ABC Transporter MRP1-5 und UMAT in Abhängigkeit von der Konfluenz (80 %, 100 % und 100 % + 3 d) in H322-Zellen. Die Werte sind mit Hilfe semiquantitativer PCR erhoben worden (vgl. Abb. 9).

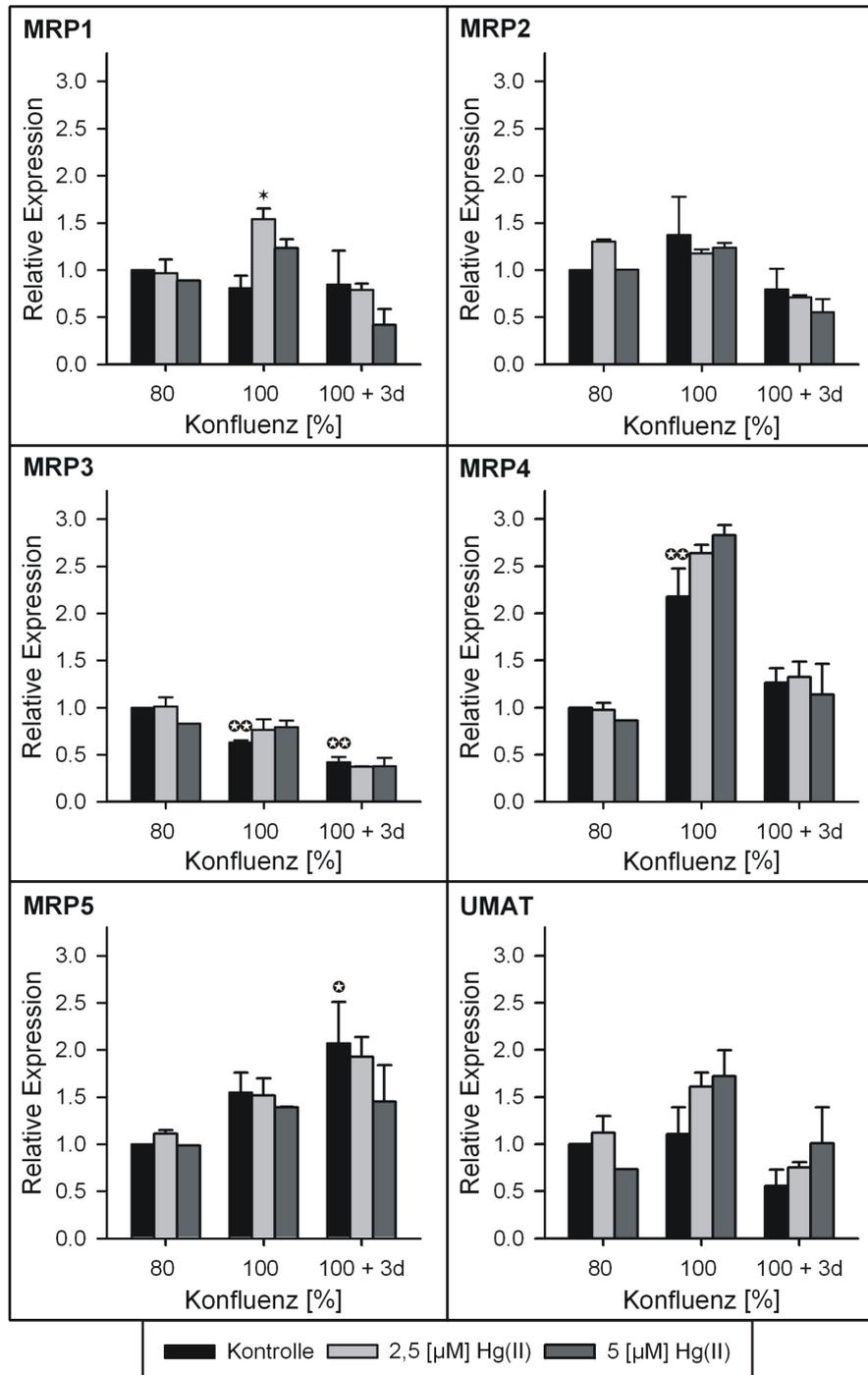


Abb. 9 Relative mRNA-Expression von MRP1-5 und UMAT in humanen H322-Lungentumorzellen nach 72 h Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II) bei Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % + 3 Tage. Die unbehandelte Kontrolle mit 80 % Konfluenz ist gleich 1 gesetzt und Bezugswert für die anderen Werte (Mittelwert \pm Standardabweichung; \oplus $p < 0,05$ und $\oplus\oplus$ $p < 0,01$ mit Bezug auf die unbehandelten Kontrollen; * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ mit Bezug auf die unbehandelte Kontrolle der gleichen Konfluenzgruppe; $n = 4$; Referenzgen: 18S RNA)

Werden hier zuerst die Konfluenzeffekte der Kontrollen bezüglich der Expression betrachtet, lassen sich signifikante Veränderungen bei den Genen MRP3 bis MRP5 erkennen. Bei MRP1, MRP2 und UMAT ist kein signifikanter Effekt nachweisbar. Bei MRP3 ist im Vergleich zur 80 % konfluenten Kontrollkultur in den unbehandelten Zellen mit 100 % Konfluenz eine signifikante Senkung der Expression auf das 0,6fache und bei den unbehandelten Zellen mit Konfluenz 100 % + 3 Tage auf das 0,4fache zu verzeichnen. MRP4 zeigt in der 100 % konfluenten unbehandelten Kultur eine signifikante Expressionssteigerung auf das 2,1fache im Vergleich zur Kontrolle mit 80 % Konfluenz. Die Ergebnisse der Zellen mit Konfluenz 100 % + 3 d deuten auf keine signifikanten Änderungen hin. Das Gen MRP5 zeigt nur bei der unbehandelten Kultur mit der Konfluenz 100 % + 3 Tage eine signifikante Erhöhung der mRNA-Menge auf das 2,1fache im Vergleich zur Kontrolle mit 80 % Konfluenz. Die 100 % konfluente Kontrolle zeigt keine signifikante Veränderung.

Bei Betrachtung der Expressionseffekte nach Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II) in Abhängigkeit von der Konfluenz ist nur bei MRP1 eine signifikante Änderung zu sehen. Die anderen Zielgene MRP3 bis MRP5 und UMAT lassen keinen signifikanten Behandlungseffekt mit Hg(II) erkennen. Im Fall von MRP1 ist bei in 2,5 μM Hg(II) behandelten Zellen mit 100 % Konfluenz die Transkriptmenge signifikant auf das 1,9fache erhöht. Die Kultur mit 100 % + 3 Tage Konfluenz zeigt keine signifikanten Effekte nach Inkubation mit Hg(II).

Die gesteigerte Transkriptmenge des MRP1-Gens bei 2,5 μM Hg(II) in den Kulturen mit 100 % Konfluenz deutet auf einen möglichen Transport von Hg(II) durch dieses Protein hin. Wohingegen MRP2-5 und UMAT nicht am Schutz der Zellen vor Hg(II) beteiligt zu sein scheinen.

3.4 Der Effekt von Hg(II) und der Konfluenz im Langzeitversuch in H322-Zellen

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse basieren auf der Untersuchung der Langzeitwirkung von 2,5 und 5 μM Hg(II) auf die Vitalität, die Morphologie und die mRNA-Expression der Gene MRP1-5 und UMAT in der H322-Zellkultur. Zudem wurde der Einfluss der Konfluenzen 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage der mit Hg(II) vorbehandelten Kulturen auf die mRNA-Expression der oben genannten Zielgene überprüft. Der Inkubationszeitraum von 2,5 und 5 μM Hg(II) betrug bei der Testung der Zellvitalität mittels MTT-Assay 42 Tage und bei den Untersuchungen hinsichtlich der Zellmorphologie und der mRNA-Expression 28 bis 34 Tage (vgl. Abb. 10). Die vorher in einer Zellkulturflasche gezüchteten H322-Zellen sind am 1. Tag des Langzeitversuchs auf drei 6-Well-Kulturplatten (MTT-Well, Erhaltungs-Well und PCR-Well) und eine 24-Well-Kulturplatte umgesetzt worden. Die Behandlung mit 2,5 und 5 μM Hg(II) erfolgte sofort nach der Passage und in den darauf folgenden Tagen bei jedem

3.4.1 Vitalitätstest

Die über einen Zeitraum von 42 Tagen mit 2,5 und 5 μM Hg(II) gestressten H322-Zellen sind in unregelmäßigen Zeitabständen auf ihre Vitalität mit der Hg(II) Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 2,5 bis 80 μM mittels MTT- Assay getestet worden (vgl. Abb. 11). Aufgrund der Tatsache, dass der Vitalitätstest erst ab einer Konfluenz von etwa 70 % durchgeführt werden sollte, lag die Ursache für die Inkontinuität der Messintervalle in der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in den 24er Wells. Zudem wurden am Ende dieser Testreihe, also nach 42 Tagen Hg(II) Behandlung, die zytotoxischen Effekte von Hg(II) in Kombination mit dem MRP Inhibitor MK571 analysiert (vgl. Abb. 12). Die durchgeführten Vitalitätstests sollten klären, ob die mit 2,5 und 5 μM Hg(II) gestressten H322-Zellen während des Experiments eine Toleranz gegenüber dem Schwermetall entwickeln.

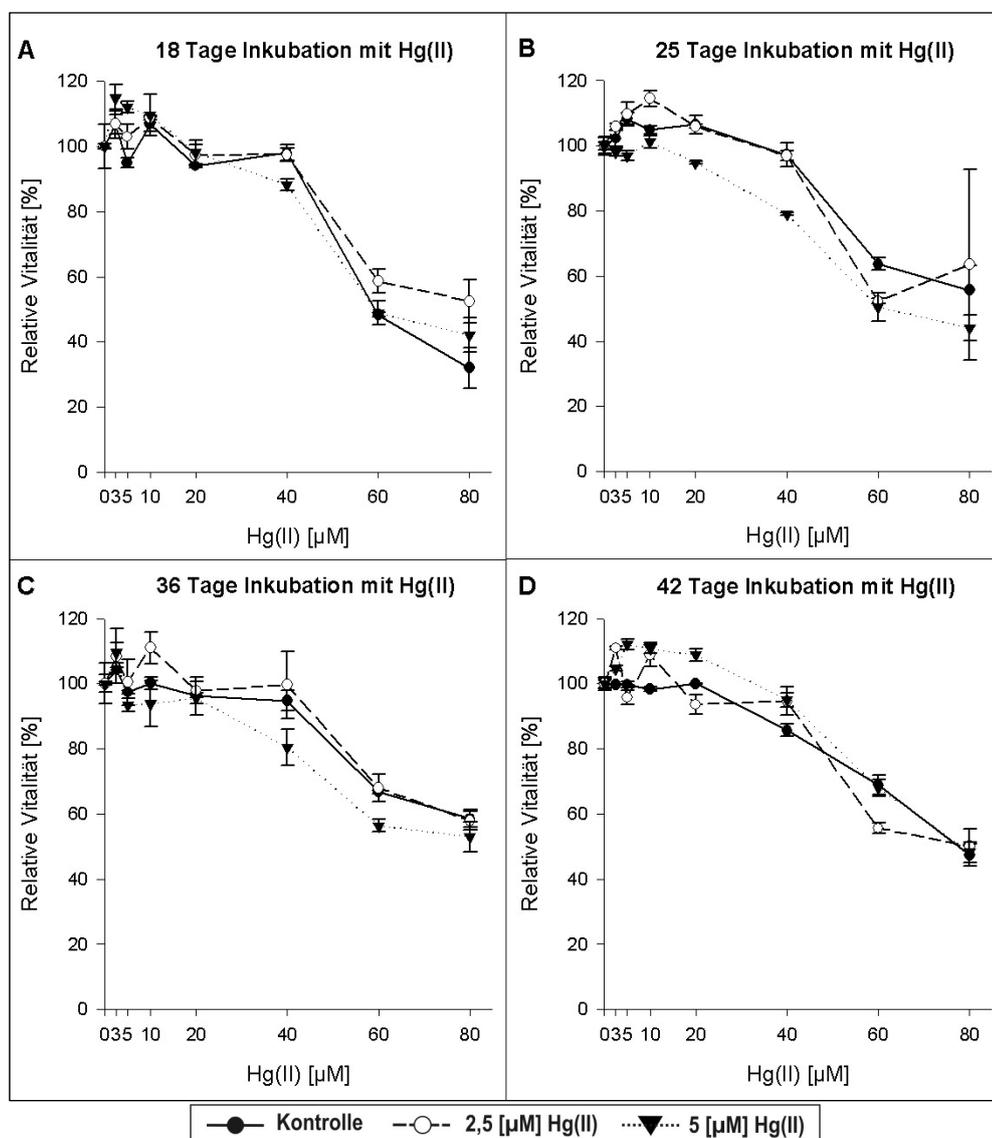


Abb. 11 Vitalitätsprüfung der in einem Zeitraum von 42 Tagen mit 2,5 und 5 μM Hg(II) vorbehandelten H322-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 2,5 - 80 μM Hg(II).

A 18 Tage Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II), **B** 25 Tage Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II), **C** 36 Tage Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II), **D** 42 Tage Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II). Die Vitalität unbehandelter Kontrollen wurde 100 % gesetzt. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 3)

Die Vitalitäten der mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II) behandelten H322- Zellen über einen Zeitraum von 42 Tagen weisen im Vergleich zu den Kontrollen keinen signifikanten Effekt auf. Demnach ist auch keine Resistenzentwicklung festzustellen. Bei Betrachtung der Versuche A und D (vgl. Abb. 11) wird deutlich, dass der toxische Grenzbereich, bei dem die Vitalität unter 80 % gemindert wird, zwischen 40 und 60 μM liegt. In den Versuchen B und C ist nach 25 und 36 Tagen Inkubation mit 5 μM Hg(II) eine im Vergleich zur Kontrolle leicht verminderte Toleranz der Zellen gegenüber Hg(II) zu erkennen. Hierbei zeigen die Zellen im Versuch B nach einer 25 Tage langen Inkubation mit 5 μM Hg(II) ab 40 μM Hg(II) eine Verminderung der Vitalität um 20 %. Im Vergleich dazu haben die Zellen der Kontrollkultur und die mit 2,5 μM vorbehandelten Zellen bei 40 μM Hg(II) noch eine Vitalität von 97 %. Ein ähnliches Ergebnis lässt sich beim MTT-Assay der 36 Tage behandelten H322-Zellen erkennen (vgl. Abb. 11 C). Auch die mit 5 μM Hg(II) gestressten Zellen haben bei 40 μM Hg(II) eine Vitalitätssenkung um 20 %. Die Kontrollkultur und die vorbehandelten Zellen mit 2,5 μM Hg(II) haben bei dieser Konzentration die toxische Grenze noch nicht erreicht. So ist ab 40 μM Hg(II) in der Kontrolle noch eine 95 % ige Vitalität und in den mit 2,5 μM Hg(II) inkubierten Tumorzellen sogar eine Vitalität von 99 % zu beobachten.

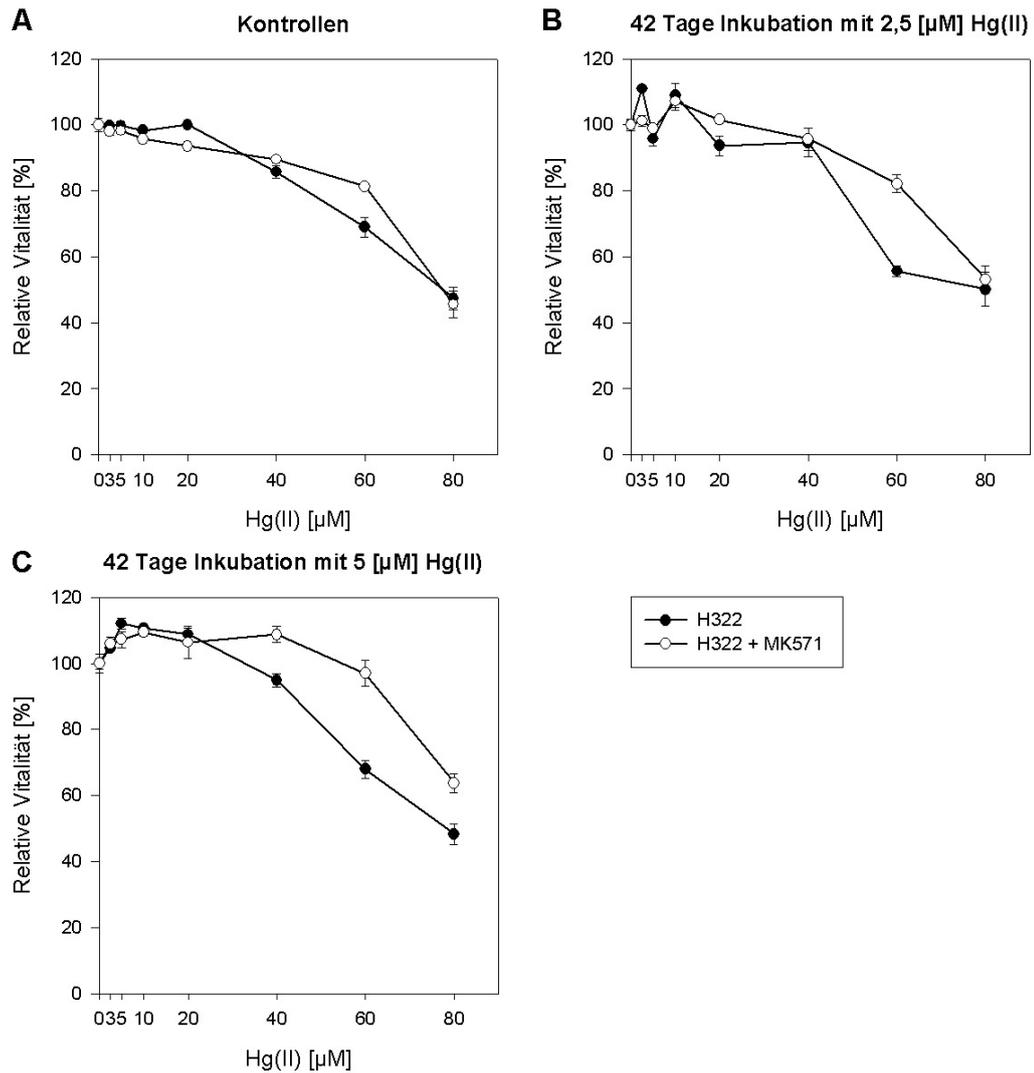


Abb. 12 Vitalitätsprüfung der 42 Tage mit 2,5 und 5 μM Hg(II) inkubierten H322-Zellen mit 2,5 bis 80 μM Hg(II) mit und ohne den MRP Inhibitor MK571. Die zusätzliche Beimpfung mit MK571 erfolgte jeweils 3 h vor der Zugabe von Hg(II). Die Vitalität un behandelter Kontrollen der H322-Zellen ist 100 % gesetzt. **A** Kontrolle mit und ohne MK571, **B** 42 Tage Inkubation mit 2,5 μM Hg(II) mit und ohne MK571, **C** 42 Tage Inkubation mit 5 μM Hg(II) mit und ohne MK571. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 3)

Wird der Einfluss von MK571 bei Zellen nach einer 42 Tage langen Hg(II)-Inkubation betrachtet, so sind bei diesen Untersuchungen keine signifikanten Effekte mit und ohne Anwesenheit des MRP Inhibitors MK571 festzustellen. Auch in diesem Versuch befindet sich die subtoxische Grenze zwischen 40 und 60 μM Hg(II) und lässt zudem keine veränderte cytotoxische Wirkung von Hg(II) mit und ohne Inhibitor erkennen. Im Versuch A (vgl. Abb. 12) ist ab 40 μM Hg(II) bei der Kontrolle ohne Inhibitor eine Reduktion der Vitalität um 11 % und mit Inhibitor eine Abnahme der Vitalität um 14 % zu verzeichnen. Der Versuch B (vgl.

Abb. 12) zeigt bei 2,5 μM Hg(II) vorbehandelten Zellen ohne MK571 eine Abnahme der Vitalität ab 40 μM Hg(II) um 4 % und mit Inhibitor eine Reduktion der Vitalität um 5 %. Die mit 5 μM Hg(II) inkubierten H322-Zellen im Versuch C (vgl. Abb. 12) haben ohne MK571 bei 40 μM Hg(II) eine um 6 % reduzierte und mit Inhibitor eine um 8 % erhöhte Vitalität.

3.4.2 Einfluss von Hg(II) auf die Zellmorphologie in H322-Zellen

Im Rahmen des 28 Tage Langzeitversuchs sind in Abständen von 7 Tagen lichtmikroskopische Fotos von den mit Hg(II) inkubierten H322-Zellen und ihren Kontrollen gemacht worden. Hierbei sollte der Effekt von Hg(II) in den Konzentrationen 2,5 und 5 μM nach unterschiedlich langer Einwirkzeit auf die Zellmorphologie der H322-Zellkultur untersucht werden. Alle lichtmikroskopischen Bilder zeigen die H322-Monolayerkultur mit ihrem typischen polygonalen Aussehen. Beim Vergleich der mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II) inkubierten Zellen mit ihren Kontrollen, ist in allen histologischen Präparaten eine Reduzierung der Zelldichte mit steigender Konzentration zu beobachten (vgl. Abb. 13-16). In Richtung steigender Inkubationszeit mit Hg(II) ist auch eine Abnahme der Zelldichte festzustellen (vgl. Abb. 13 C bis 15 C). Zudem zeigen die behandelten Zellen weniger deutliche Zellgrenzen und ein vergrößertes Zellvolumen. Bei Betrachtung der Membranen und Zellkerne sind keine Auffälligkeiten zu sehen. Ab dem 7. Behandlungstag mit Hg(II) sind in den 5 μM inkubierten H322-Zellen jeweils bei 10- und 40facher Vergrößerung intrazelluläre Vesikel zu erkennen (Abbildung 13-16 C/C*). Diese intrazellulären Vesikel werden auch ab dem 14. Inkubationstag mit Hg(II) in den mit 2,5 μM Hg(II) behandelten Kulturen sichtbar (Abb. 13-16 B/B*).

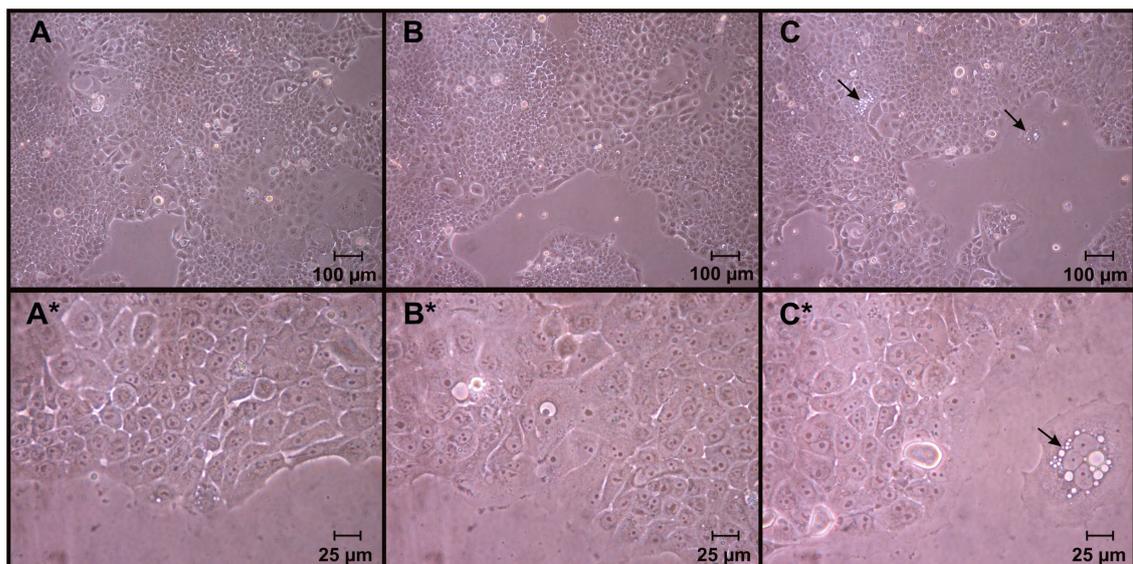


Abb. 13 H322-Zellen nach 7 Tagen Hg(II) Inkubation (A-Kontrolle; B- mit 2,5 μM Hg(II); C- mit 5 μM Hg(II)) phasenkontrastmikroskopisch bei 10facher (A-C) und 40facher (A*-C*) Vergrößerung untersucht (intrazelluläre Vesikel sind mit Pfeilen \rightarrow gekennzeichnet).

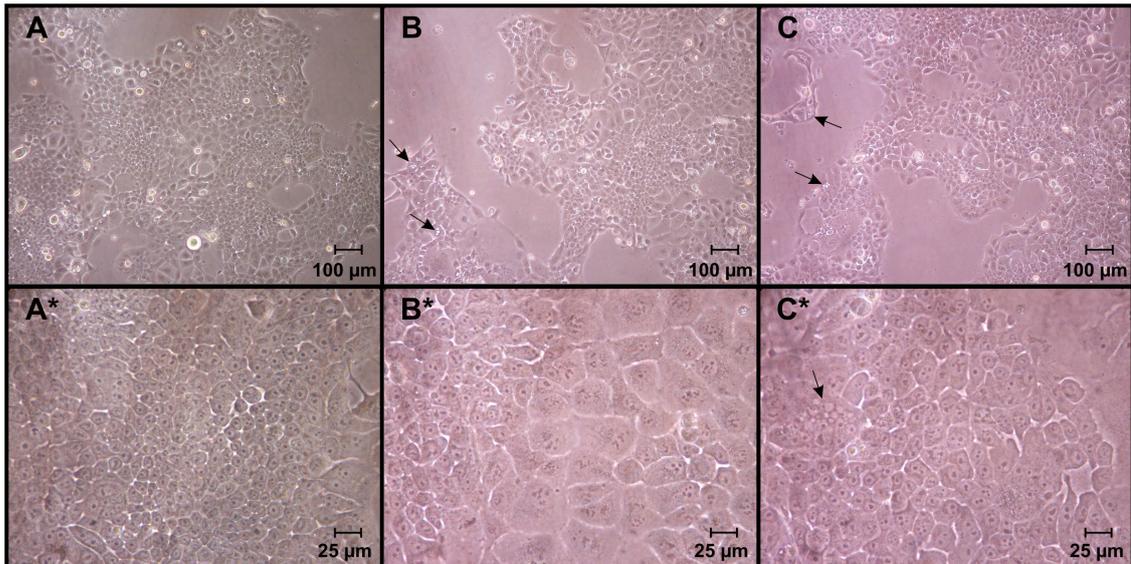


Abb. 14 H322-Zellen in 6 Well Kulturplatten kultiviert und nach 14 Tagen Hg(II) Inkubation (A-Kontrolle; B- mit 2,5 µM Hg(II); C- mit 5 µM Hg(II)) phasenkontrastmikroskopisch bei 10facher (A-C) und 40facher (A*-C*) Vergrößerung untersucht (intrazelluläre Vesikel sind mit Pfeilen → gekennzeichnet).

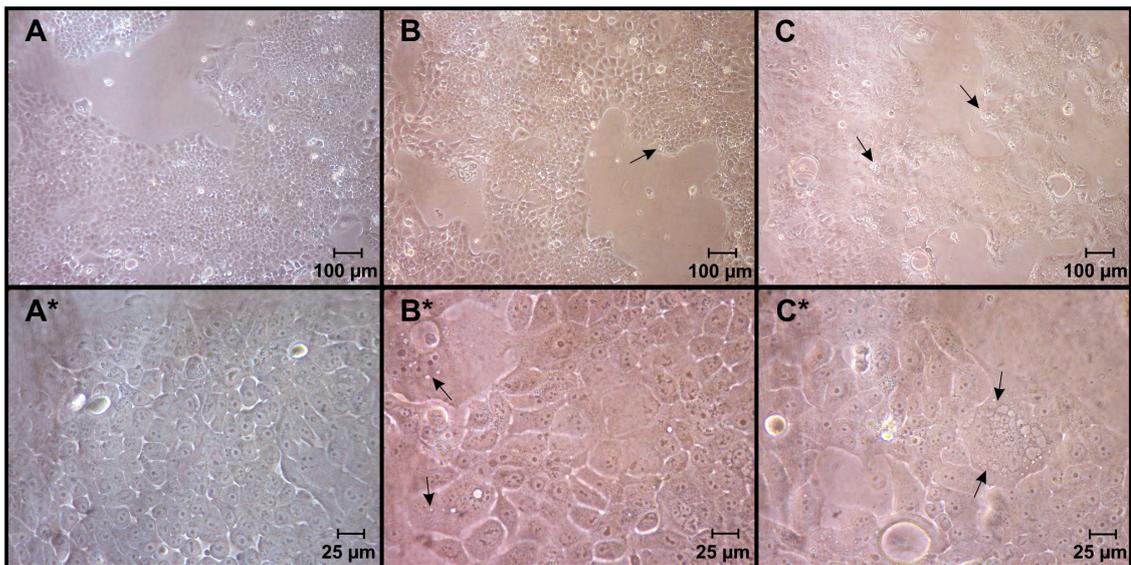


Abb. 15 H322-Zellen in 6 Well Kulturplatten kultiviert und nach 21 Tagen Hg(II) Inkubation (A-Kontrolle; B- mit 2,5 µM Hg(II); C- mit 5 µM Hg(II)) phasenkontrastmikroskopisch bei 10facher (A-C) und 40facher (A*-C*) Vergrößerung untersucht (intrazelluläre Vesikel sind mit Pfeilen → gekennzeichnet).

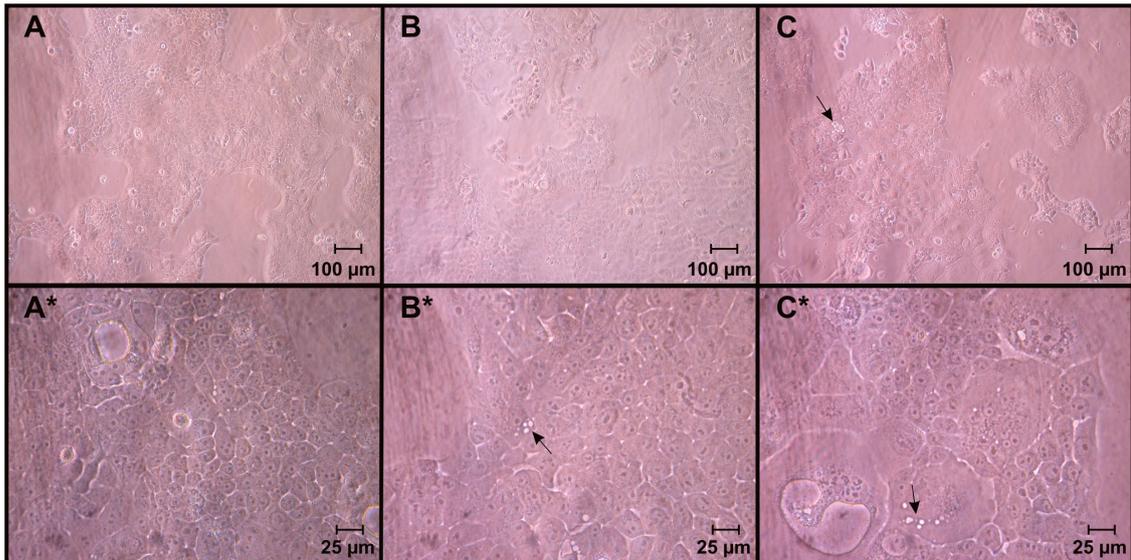


Abb. 16 H322-Zellen in 6 Well Kulturplatten kultiviert und nach 28 Tagen Hg(II) Inkubation (A-Kontrolle; B- mit 2,5 μM Hg(II); C- mit 5 μM Hg(II)) phasenkontrastmikroskopisch bei 10facher (A-C) und 40facher (A*-C*) Vergrößerung untersucht (intrazelluläre Vesikel sind mit Pfeilen → gekennzeichnet).

Wahl des Referenzgens:

Die ermittelten mRNA-Mengen vom 28 Tage Versuch mussten ebenfalls, wie unter 3.3 beschrieben, auf ein nicht reguliertes Referenzgen bezogen werden. Die Entscheidung zwischen den untersuchten Genen 18S RNA und GAPDH fiel beim 28 Tage Versuch auf das deutlich weniger regulierte Housekeeping-Gen 18S RNA (vgl. Abb. 17). Beim Konfluenzversuch hingegen zeigte 18S RNA in Bezug auf die Konfluenz keine Stabilität. So fiel die Wahl in diesem Versuch auf das stabilere Referenzgen GAPDH (vgl. Abb. 18).

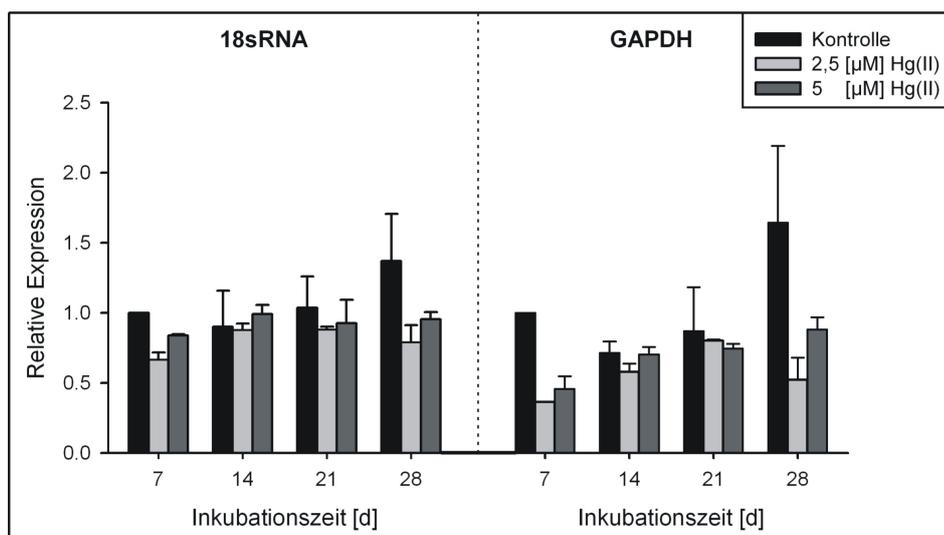


Abb. 17 Relative mRNA-Expression von 18S RNA und GAPDH in H322-Zellen über einen Inkubationszeitraum von 28 Tagen mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II). Die Kontrolle am 7. Tag

ist gleich 1 gesetzt (18S RNA/Kontrolle bei 7d = $1 \pm 0,06$; GAPDH/ Kontrolle bei 7 d = $1 \pm 0,06$; Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 4).

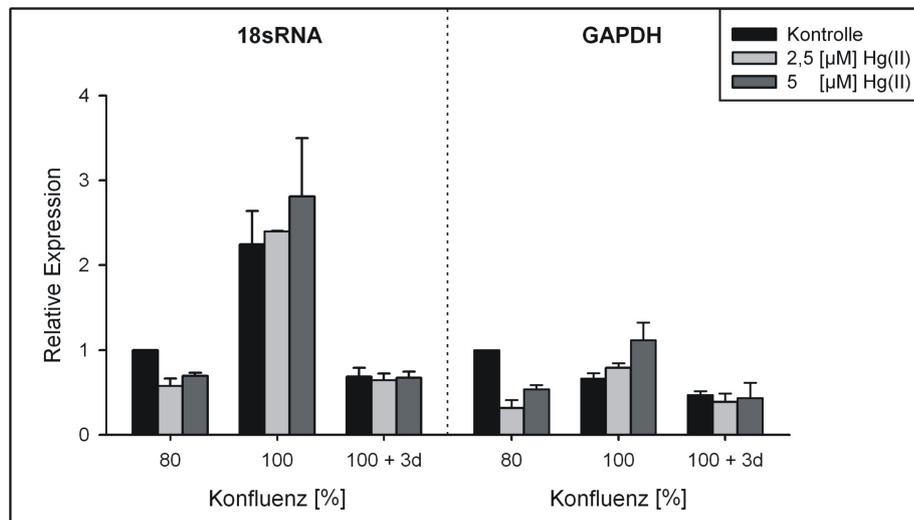


Abb. 18 Relative mRNA-Expression von 18S RNA und GAPDH in H322-Zellen nach 28 - 34 Tagen Inkubation mit 2,5 µM und 5 µM Hg(II) in Abhängigkeit von der Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % plus 3 d. Die Kontrolle mit 80 % Konfluenz ist gleich 1 gesetzt (18S RNA/Kontrolle bei 7d = $1 \pm 0,24$.; GAPDH/ Kontrolle bei 7d = $1 \pm 0,33$; Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 4).

3.4.3 Expression von MRP1 bis MRP5 und UMAT in H322-Zellen nach 28 Tagen Inkubation mit 2,5 und 5 µM Hg(II)

Die folgenden dargestellten Ergebnisse beruhen auf der Untersuchung der Expression der Zielgene MRP1-5 und UMAT in H322-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit 2,5 µM und 5 µM Hg(II) in einem Zeitraum von 28 Tagen. Die Versuche sind an H322-Zellen mit einem subkonfluenten Wachstumsstadium von 80 % durchgeführt worden. Zu Beginn wird die Entwicklung der Expression der ABC Transporter in den Kontrollen näher betrachtet (vgl. Abb. 19). Anschließend wird der Langzeiteffekt von Hg(II) dargestellt und erläutert (vgl. Abb. 20). Die Messdaten sind mittels semiquantitativer PCR erhoben worden.

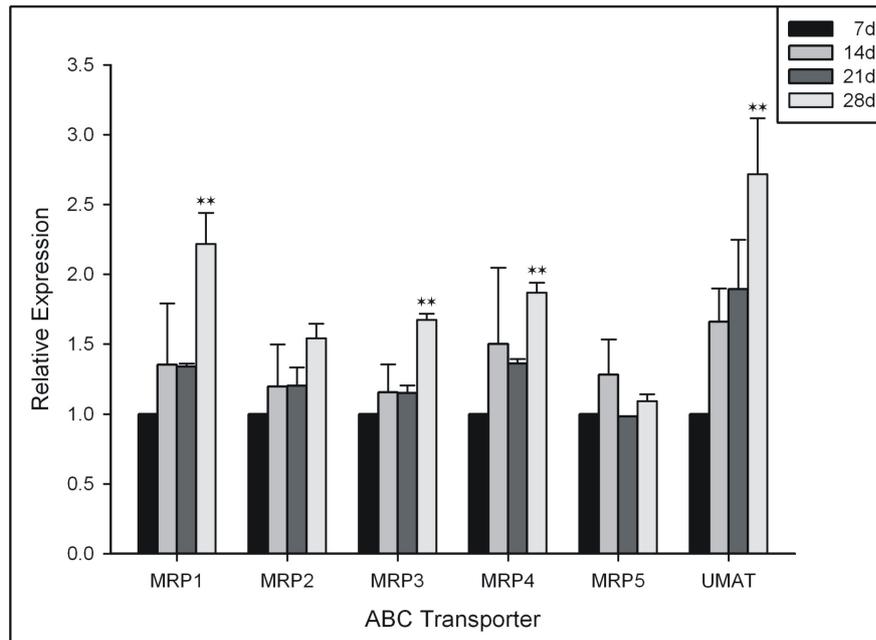


Abb. 19 Relative mRNA-Expression von MRP1-5 und UMAT in unbehandelten H322-Zellen in einem Zeitraum von 28 Tagen. (Mittelwert \pm Standardabweichung mit Bezug auf die 7d Kontrolle; ** $p < 0,01$; $n = 4$, Referenzgen 18sRNA)

Bei Betrachtung der mRNA-Mengen der ABC-Transporter in unbehandelten H322-Zellen, ist bei fast jedem Zielgen eine Zunahme der Expression in Richtung 28 Tage zu erkennen. Signifikante Expressionseffekte zeigen sich aber nur bei den Genen MRP1, MRP3, MRP4 und UMAT. So steigt bei MRP1 die Transkriptmenge im Vergleich zur 7 Tage Kontrolle auf das 2,2 fache und bei MRP3 auf das 1,7fache signifikant an. Eine signifikante Expressionserhöhung ist bei MRP4 auf das 1,9fache und bei UMAT auf das 2,7fache - im Vergleich zur 7 Tage Kontrolle - zu erkennen.

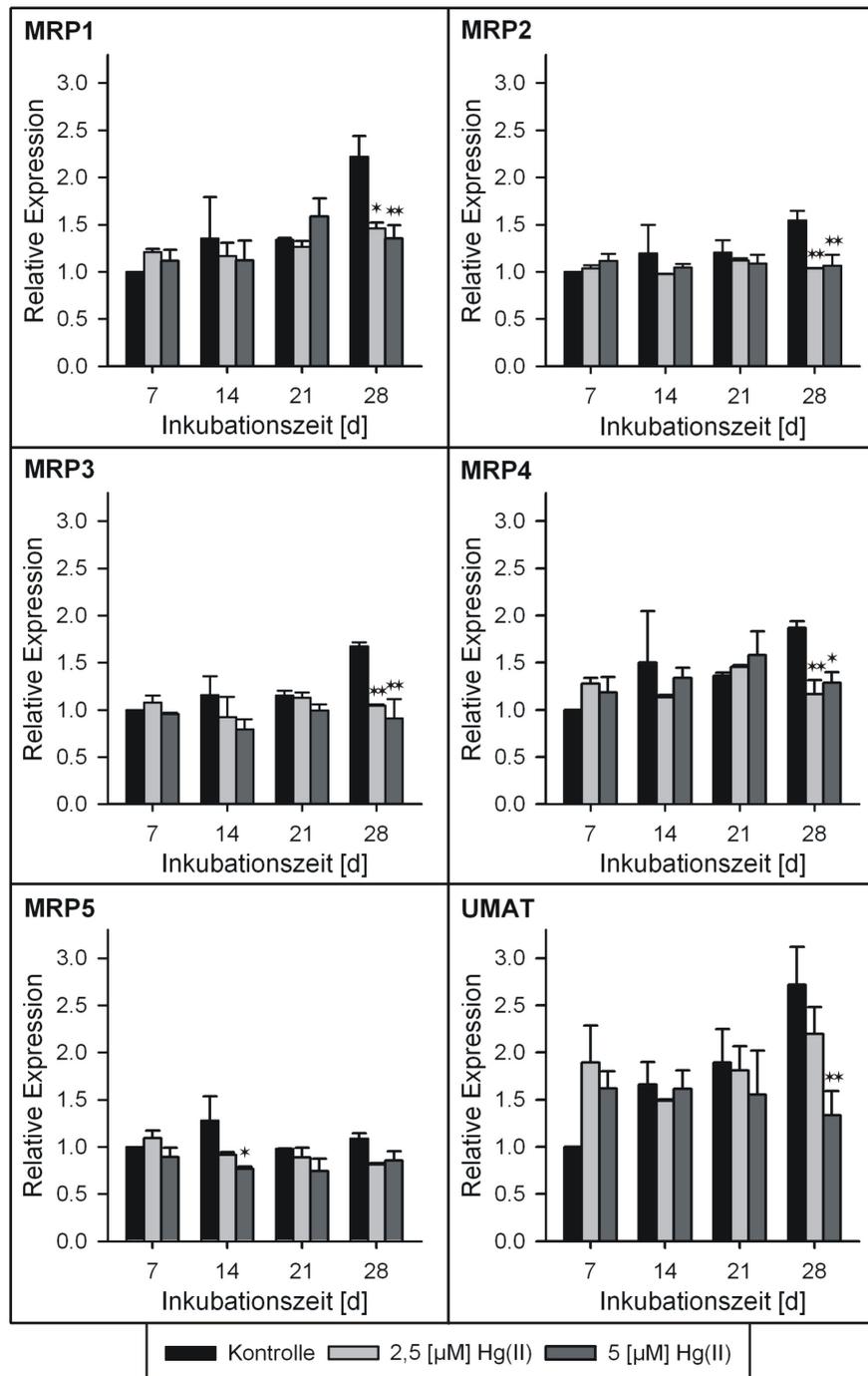


Abb. 20 Relative mRNA-Expression von MRP1 bis MRP5 und UMAT in H322-Zellen nach 28 Tagen Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II). Die Kontrollen vom 7. Tag sind 1 gesetzt. (Mittelwert \pm Standardabweichung; *p < 0,05 und **p < 0,01 mit Bezug auf die Kontrolle der gleichen Inkubationszeit; n = 4; Referenzgen: 18S RNA)

Im Hinblick auf die Langzeitwirkung von Hg(II) in H322-Zellen lassen sich signifikante Effekte bei jedem Zielgen feststellen, wobei sich diese mit Ausnahme von MRP5 ab 28 Tagen

Inkubationszeit erkennen lassen. MRP1 zeigt bei 28 Tagen Inkubationszeit eine signifikante Abnahme der Expression bei 2,5 μM Hg(II) auf das 0,7fache und bei 5 μM Hg(II) auf das 0,6fache im Vergleich zur Kontrolle. An den anderen Tagen sind keine signifikanten Einflüsse durch Hg(II) zu beobachten. MRP2 lässt auch nur ab 28 Tagen Behandlung mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II) eine signifikante Änderung der mRNA-Menge erkennen. Hierbei sinkt die Transkriptmenge signifikant bei beiden Konzentrationen auf das 0,7fache mit Bezug auf die 28 Tage Kontrolle. Bei MRP3 zeigt sich nach 28 Tagen in mit Hg(II) inkubierten H322-Zellen eine signifikante Reduktion der mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle. Sie sinkt in mit 2,5 μM Hg(II) inkubierten Zellen auf das 0,6fache und bei 5 μM Hg(II) auf das 0,5fache. Bei den anderen Zeitintervallen zeigt sich keine signifikante Wirkung von Hg(II) auf die untersuchten Zellen. Bei MRP4 ist ab der Inkubationsdauer von 28 Tagen eine signifikante Abnahme der Expression in 2,5 μM Hg(II) behandelten Zellen auf das 0,6fache und in der 5 μM Hg(II) inkubierten Kultur auf das 0,7fache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen. Auch hier zeigen die anderen Zeitintervalle keine signifikanten Veränderungen. Das Zielgen MRP5 lässt nur ab 14 Tagen Hg(II) Inkubationszeit einen signifikanten Einfluss erkennen. Hierbei sinkt die Transkriptmenge in mit 5 μM Hg(II) behandelten H322-Zellen signifikant auf das 0,7fache, verglichen mit ihrer Kontrolle. An den anderen Tagen ist kein signifikanter Hg(II)-Effekt zu sehen. UMAT zeigt in der nach 28 Tagen mit 5 μM Hg(II) inkubierten Zellkultur eine signifikante Reduzierung des mRNA-Gehalts auf das 0,5fache mit Bezug auf ihre Kontrolle.

Die ermittelten Ergebnisse zeigen eine signifikante Repression von MRP1-5 und UMAT. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass keines dieser Gene am Transport von Hg(II) beteiligt ist.

3.4.4 Effekt unterschiedlicher Konfluenz auf die Expression von MRP1 bis MRP5 und UMAT in den mit Hg(II) vorbehandelten H322-Zellen

In diesem Experiment wurde der Einfluss der Konfluenz bei 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage auf die Expression von MRP1-5 und UMAT in H322-Zellen nach einer Inkubationszeit von 28 bis 34 Tagen mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II) untersucht (vgl. Abb. 21). Die Ergebnisse sind mit Hilfe semiquantitativer PCR bestimmt worden.

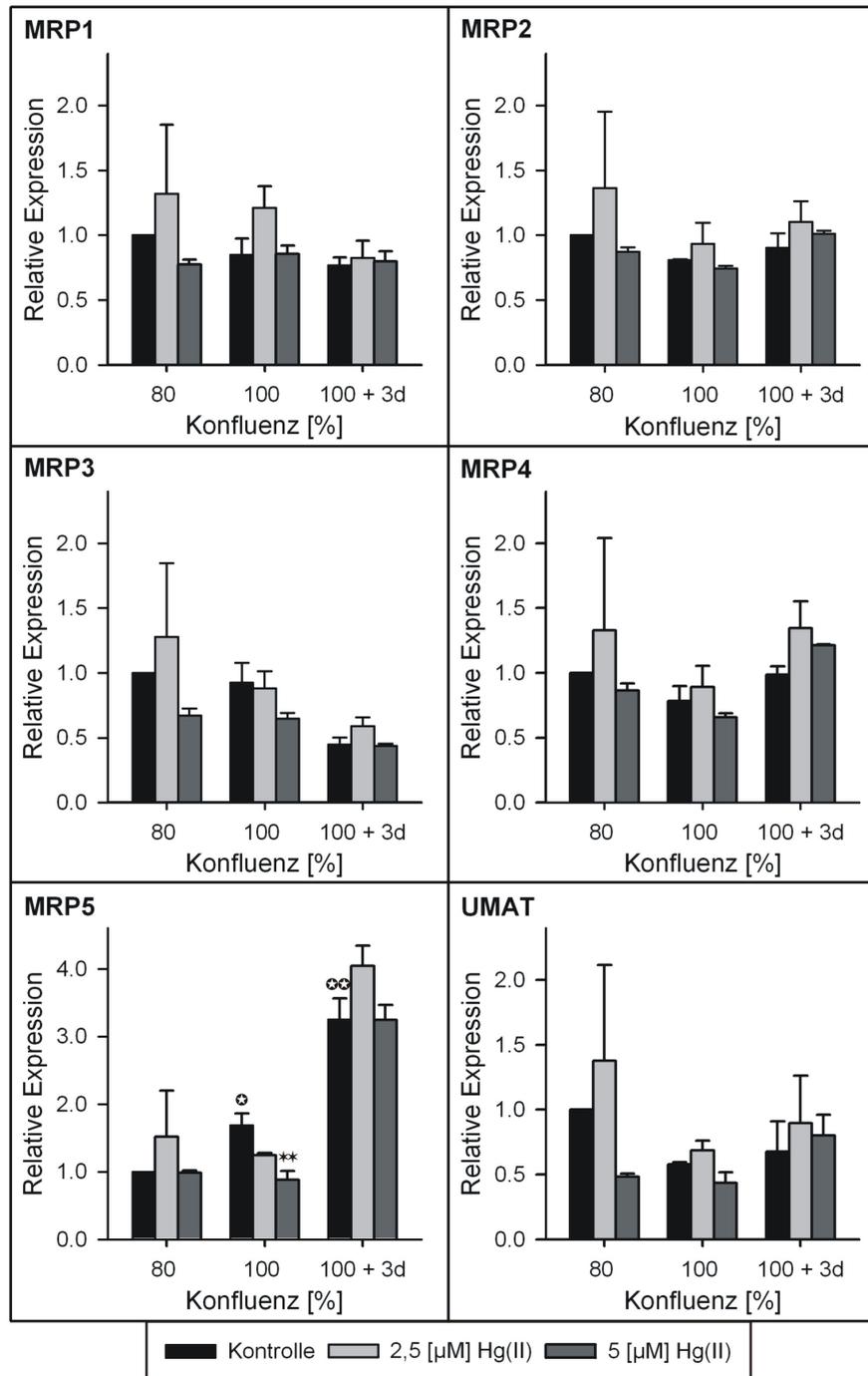


Abb. 21 Relative mRNA-Expression von MRP1-5 und UMAT in H322-Zellen nach 28 - 34 Tagen Inkubation mit 2,5 μM und 5 μM Hg(II) in Abhängigkeit von der Konfluenz bei 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage. Die Kontrolle mit 80 % Konfluenz ist gleich 1 gesetzt. (Mittelwert \pm Standardabweichung; \oplus $p < 0,05$ und $\oplus\oplus$ $p < 0,01$ mit Bezug auf die unbehandelten Kontrollen; $*$ $p < 0,05$ und $**$ $p < 0,01$ mit Bezug auf die unbehandelte Kontrolle der gleichen Konfluenzgruppe; $n = 4$; Referenzen: GAPDH)

Wird zuerst die Expression der Zielgene in den Kontrollen betrachtet, so ist nur bei MRP5 ein signifikanter Konfluenzeffekt erkennbar. Bei diesem Gen ist im Vergleich zur Kontrolle mit 80 % Konfluenz eine dosisabhängige Steigerung der Transkriptmenge bei 100 % konfluenten Zellen auf das 1,7fache und bei der 100 % + 3 d konfluenten Kultur auf das 3,2fache zu beobachten.

Bei Begutachtung des Einflusses von 2,5 μM und 5 μM Hg(II) auf die mRNA-Menge der ABC-Transporter in Abhängigkeit von der Konfluenz bei 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage, lässt sich wieder nur bei MRP5 ein signifikanter Effekt feststellen. Alle anderen Zielgene zeigen keine signifikante Wirkung von Hg(II) auf die Transkriptmenge. Im Fall von MRP5 ist nur bei 100 % konfluenten H322-Zellen eine Expressionsänderung nachweisbar. Hierbei reduziert sie sich in 2,5 μM Hg(II) inkubierten Zellen auf das 0,7fache und in der mit 5 μM Hg(II) behandelten Kultur auf das 0,5fache im Vergleich zu ihrer Kontrolle.

Die unterschiedlichen Konfluenzen mit und ohne die Anwesenheit von Hg(II) haben in diesem Versuch nur beim MRP5-Gen zu signifikanten Änderungen geführt. Ohne Hg(II) wird MRP5 mit steigender Konfluenz signifikant induziert. Bei 100 % Konfluenz mit 5 μM Hg(II) wird das MRP5-Gen signifikant reprimiert.

4 Diskussion

4.1 Kulturen der humanen Lungentumorzelllinie H322

Die in der Atemluft enthaltenen Xenobiotika haben einen maßgeblichen Anteil bei der Entstehung von pathologischen Veränderungen des Respirationstraktes. Das Ausmaß der Schädigung hängt dabei von der Art, der Expositionsdauer und der Konzentration des inhalierten Schadstoffes ab (Kooijman et al., 2007). Kommt es zu einer malignen Entartung der Lungenschleimhaut, richtet sich die Wahl der Therapieart nach der vorherrschenden Form, der Aggressivität, der Wachstumsgeschwindigkeit und der Ausbreitung des Tumors. In den meisten Fällen ist die durchgeführte Behandlung mit einer adjuvanten Chemotherapie verbunden. Die dabei eingesetzten Antineoplastika sollen das Zellwachstum und die Zellteilung schnell wachsender Tumorzellen hemmen und die Krebszellen auf diesem Wege erfolgreich zerstören. Es existieren aber Tumore, die entweder schon vor Therapiebeginn eine Unempfindlichkeit gegenüber den verwendeten Zytostatika aufweisen oder während der Behandlung Resistenzen ausbilden. Solche vorhandenen oder erworbenen Zytostatikaresistenzen werden durch eine Vielzahl von Mechanismen bestimmt. Dazu gehören unter anderem die vermehrte Expression von Enzymen und Enzymsystemen, die an der Inaktivierung von Zytostatika, der DNA-Reparatur oder dem Arzneimittelefflux beteiligt sind. Einen wesentlichen Anteil beim Transport verschiedener Substanzen aus der Zelle haben die Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRPs). Sie könnten somit eine große Rolle bei der Entwicklung von Mehrfachresistenzen spielen. Durch eine erhöhte Expression dieser Proteine könnte die Wirkung von Chemotherapeutika abgeschwächt oder sogar ganz verhindert werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist noch nicht für alle MRP-Isoformen eindeutig geklärt, welche Faktoren ihre Expression beeinflussen und welche physiologischen Funktionen sie haben (Deeley et al. 2006).

Aufgrund der Annahme, dass erhöhte Expressionen der MRP-Transportproteine einen Anteil an der Resistenzentwicklung haben können, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Einflüsse auf die Expression der Gene MRP1-5 und UMAT untersucht. Einige Schwermetalle bedingen unterschiedliche genotoxische Effekte, die unter anderem zu Apoptose und zu veränderten Transkriptionsmustern führen können. In den durchgeführten Experimenten ist analysiert worden, welchen Effekt die Schwermetalle Arsen, Kupfer und Quecksilber auf die Expression von MRP1-5 und UMAT haben.

Für alle Versuchsreihen ist dafür eine Monolayerkultur aus H322-Zellen verwendet worden. Die H322-Zellkultur gehört zu den humanen Lungentumorzelllinien, die von Gazdare et al. speziell für die Krebsforschung entwickelt worden ist. Sie stammt aus einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) von einem 52 Jahre alten Mann. Dabei handelt es sich um CLARA-Zellen (schleimproduzierende Zellen der Bronchiolen), bei denen das

Tumorsuppressorgen p53 mutiert ist, welches eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielt (Hay et al., 1996).

Die Zellkultur ist in den letzten Jahrzehnten zu einem bedeutenden Instrument für die Forschung und Entwicklung vor allem in den Bereichen Medizin und Biologie geworden. Sie ist ein leicht zugängliches System zur Gewinnung von aufschlussreichen Informationen über Stoffwechselfvorgänge, die Signaltransduktion sowie die Protein- und Genexpression. Die gestiegene Anwendung von Zellkulturen für Forschungszwecke hat es zudem möglich gemacht, die Anzahl der Tierversuche drastisch zu senken (Boxberger et al., 2006).

Während für die Gewinnung von nicht immortalisierten primären Zellkulturen Einzelzellen oder ganze Gewebe aus einem lebenden Organismus entnommen werden und damit nur in begrenztem Umfang verfügbar sind, stehen mit der hier verwendeten Tumorzelllinie Zellen fast unbegrenzt zur Verfügung. Damit lässt sich die Wirkungsweise von Testsubstanzen direkt an menschlichen Zellen als Modellsystem untersuchen. Doch die in-vitro Versuche mit den Tumorzelllinien sind mit dem Nachteil behaftet, dass diese Zellen infolge der Entdifferenzierung beispielsweise Veränderungen in ihrem Genom oder Stoffwechsel im Vergleich zu der ursprünglichen Zelle aufweisen. So können z.B. durch das mutierte p53-Gen in der Lungentumorzelllinie H322 Untersuchungen mit diesen immortalisierten Zellen nicht mehr die genauen in-vivo Verhältnisse etwa bei der Induktion der Apoptose wiedergeben. Zudem ist für alle Zellkulturen, die für in-vitro Experimente eingesetzt werden, zu beachten, dass die Zellklone nicht unbedingt eine einheitliche biologische Population darstellen (Lindl et al., 2002). Somit besteht die Möglichkeit, dass sich die Zellen von Passage zu Passage nach einem unbekanntem Selektionsmuster ändern und unterschiedliche Testergebnisse zur Folge haben (Lindl et al., 2002). Je nach Zelltyp, Einsatzzellichte und Kulturbedingungen kann das Zellwachstum in 5 Proliferationsphasen unterteilt werden (Wobus et al., 2003). In der Anlaufphase oder lag-Phase passen sich die Zellen an die neuen Kulturbedingungen an, bevor sie sich in der exponentiellen (logarithmischen) Wachstumsphase vermehren. Anschließend reduziert sich das Wachstum in der Verzögerungsphase bis zum Erreichen der stationären Phase. In diesem Stadium werden die nichttransformierten Zellen konfluent und es kommt zu einer Kontaktinhibition. Proliferation und Apoptose befinden sich in diesem Zeitraum im Einklang. Die Zellen sind in der Lage über einige Wochen in dieser Phase zu verharren, ehe sie aufgrund der Anreicherung toxischer Substanzen in die Absterbephase wechseln (Wobus et al., 2003). In der Mitosephase (M-Phase) findet die Zellteilung statt. Danach befindet sich die Zelle in der Interphase, die sich in die postmitotische G₁-Phase (engl. Gap; Lücke Abstand) in die DNA-Synthese oder S-Phase und in die prämitotische G₂-Phase gliedert, bis der Zyklus wieder von vorne beginnt. Nach der Mitose können die Zellen in eine Ruhephase übergehen, der

sogenannten G₀-Phase, aus der die Zellen aber wieder in den Zellzyklus eintreten können (Ganten et al., 2003).

Um eine ausreichende Sicherung der Qualität, der Aussagekraft, der Vergleichbarkeit und der Reproduzierbarkeit von in vitro Untersuchungen zu gewährleisten, ist eine sachgemäße Handhabung der Zellkultur zwingend erforderlich. So können zum Beispiel zu enge Wachstumsbedingungen, Kontaminationen und Substratmangel unerwünschte Effekte, wie Apoptose, veränderte Stoffwechselfvorgänge sowie Sensibilitätsunterschiede gegenüber den Testsubstanzen, hervorrufen (Lindl et al., 2002; Langdon et al. 2004).

Hinsichtlich dieser Betrachtungen hat sich in der vorliegenden Arbeit ein Teil der durchgeführten Experimente darauf konzentriert, den Einfluss unterschiedlicher Konfluenzen auf die Expression von MRP1-5 und UMAT in der H322-Zellkultur zu beobachten. Dafür sind zunächst in unbehandelten Zellen die mRNA-Mengen dieser Transporter bei Konfluenz 80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage untersucht worden. Die dabei ermittelten Ergebnisse zeigten bei allen Genen signifikante Änderungen in Abhängigkeit von der Konfluenz (vgl. Abb. 6, Seite 30). Bei MRP2, MRP4, MRP5 und UMAT ist bei einem 100 % konfluenten Wachstum im Vergleich zur Zellkultur mit 80 % Konfluenz eine signifikante Induktion zu erkennen. Da eine zunehmende Wachstumsdichte zu einer Ansammlung von toxischen Stoffwechselprodukten führen kann (Wobus und Mertsching, 2007), könnte dies der Grund für die erhöhte Expression der oben genannten Gene sein. Hierbei wäre zu klären, wie stark welche Substanzen vermehrt aus der Zelle geschleust werden und welche Transporter dafür verantwortlich sind. Aufgrund der Tatsache, dass GSH und GSSG an vielen Entgiftungsreaktionen beteiligt sind und sowohl MRP1, MRP2, MRP4 und MRP5 GSH, GSSG und Glutathion-Konjugate verschiedener Substanzen transportieren (Deeley et al., 2006), wären Untersuchungen bezüglich des GSH-Gehalts bei unterschiedlicher Konfluenz zur weiteren Charakterisierung dieses Modellsystems von großem Interesse. Da MRP3 mit geringer Affinität GSH bzw. GSH-Konjugate transportiert und eher am Transport konjugierter Gallensalze beteiligt ist (Kool et al., 1999), könnte dieser Aspekt die starke Repression mit zunehmender Konfluenz erklären. Auf welchem Weg die Expression dieser Gene beeinflusst wird, ist in diesen Experimenten nicht festzustellen. Ein möglicher Regulationsweg könnte über verschiedene MAPK (mitogen-activated protein kinase) gehen. MAP-Kinasen sind an wichtigen zellulären Regulationsmechanismen beteiligt, die über den Zelltod und das Überleben einer Zelle mitentscheiden (Fanger et al., 2000; Mizutani 2009). Untersuchungen von Kim et al. haben gezeigt, dass Hg(II) die p38 MAPKinase aktiviert, wodurch die Expression von MRP1 induziert wird (Kim et al., 2005). Somit sollten weitere Experimente zur Untersuchung der Expression unterschiedlicher MAPKs in Betracht gezogen werden, die mittels Western Blot durchgeführt werden könnten. Aber auch der sekundäre Botenstoff cAMP ist in der Lage, die Genexpression zu regulieren (Pimentel, 1994). Daher

benötigt eine mögliche Modulation seines Gehalts in den Zellen auch weiterer Untersuchungen. Durch die Komplexbildung von cAMP mit einem Aktivatorprotein wie z.B. dem CAP (cyclisches AMP-bindendes Protein) kann die Transkription bestimmter Gene wie auch der MRP-Gene, stimuliert werden (Hirsch-Kauffmann und Schweiger, 2006).

Bei einem Wachstum auf 100 % plus 3 Tage kommt es im Unterschied zur 100 % konfluenten Kultur zu einer signifikanten Repression der Gene MRP1, MRP2, MRP4 und UMAT. Bei der Betrachtung von MRP5 in Richtung der höheren Konfluenz zeigt sich eine starke Induktion, die möglicherweise durch Akkumulation toxischer Substanzen hervorgerufen worden ist. Da MRP5 unter anderem eine hohe Affinität zu den cyclischen Nukleotiden cAMP und cGMP aufweist, die als second Messenger den Zellstoffwechsel beeinflussen, scheint dieser Transporter bei der stärkeren Wachstumsdichte ein sehr wichtiges Transportprotein zu sein (Deeley et al., 2006). Auch hier können MAPKs und cAMP eine Rolle bei der Regulation der Expression spielen. Da in der vorliegenden Arbeit die Expression von MRP-Transportern nur auf RNA-Ebene bestimmt wurde, wären weiterführende Untersuchungen zur Expression auf Proteinebene - etwa mittels Western Blot - interessant. Bis dato gibt es keine vergleichbaren Studien, die den Effekt der Konfluenz auf die Expression der untersuchten MRP-Transporter oder anderer Transporter untersucht haben. So könnten weitere Experimente einen Beitrag dazu leisten, die Konfluenzeffekte in den Zellkulturen näher zu analysieren und damit sowohl einen Beitrag zur Charakterisierung dieser wichtigen Modellsysteme als auch zur Aufklärung der Regulation der Expression von MRP-Transportern liefern. Da Zellkulturen proliferierende Systeme darstellen, ebenso wie Tumore, könnten solche Erkenntnisse möglicherweise letztendlich auch auf die Verhältnisse in Tumoren übertragen werden und damit helfen, Strategien zur Überwindung MRP-vermittelter Resistenzen zu entwickeln.

4.2 Effekte von Arsenit

Aus einer Reihe von Studien geht hervor, dass die intrazelluläre Anwesenheit von Arsenit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), vor allem von Superoxidradikalanionen ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in unterschiedlichen Zellsystemen erhöht und somit eine große Gefahr für viele zelluläre Bestandteile darstellt. Die ROS sind in der Lage, die Peroxidation von Lipiden zu induzieren, DNA- und Proteinschäden hervorzurufen und mit Radikalfängern wie Glutathion (GSH) zu reagieren und durch Verminderung der zellulären GSH-Vorräte das Redox-Gleichgewicht in den Zellen zu stören. Zudem können ROS bestimmte Signalkaskaden aktivieren und somit auf unterschiedliche regulatorische Prozesse Einfluss nehmen. Zu diesen Kaskaden zählen z.B. die Mitogen-aktivierten Proteinkinase und die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B (Shi et al., 2004; Leonard et al., 2004).

Laut Einstufung nach dem weltweit harmonisierten System (GHS), entsprechend der Verordnung (EG) 1272/2008, kann Arsentrioxid nicht nur schwere gesundheitliche Schäden hervorrufen, sondern auch Ursache für Krebserkrankungen sein. Seit längerem ist jedoch bekannt, dass Arsenit auch eine therapeutische Wirkung hat. So kann die Behandlung von Patienten mit akuter promyelozytischer Leukämie (APL) mit Arsentrioxid zu einer vollständigen Remission führen (Chen et al., 2001; Ling et al., 2002). Aber auch andere Arsenverbindungen, wie das Arsensulfid (As_4S_4), haben therapeutische Effekte an APL erkrankten Patienten gezeigt (Lehman et al., 2001). Eine mögliche Ursache solcher Remissionserfolge kann - laut in-vitro Untersuchungen an APL Zelllinien mit APL/RA Proteinen - der durch Arsenit ausgelöste programmierte Zelltod sein (Ling et al., 2002). Die von Arsenit ausgehende zytotoxische Wirkung und Apoptose scheinen dabei nicht über den p53-abhängigen Signalweg gesteuert zu sein. Dies belegen die von Ling et al. durchgeführten Untersuchungen, bei denen keine Unterschiede zwischen den getesteten humanen Tumorzelllinien mit und ohne mutiertem p53-Gen festzustellen waren (Ling et al., 2002).

Zu Beginn der Versuchsreihe ist mit dem MTT-Test die Vitalität der H322-Zellkultur unter verschiedenen Konzentrationen von Arsenit bestimmt worden. Nach einer 24 h Inkubation mit 15 μM Arsenit ist die relative Vitalität der H322-Kultur auf 80 % gesunken (vgl. Abb. 3, Seite 26). Ling et al. hat nach Inkubation mit Arsenit für 72 h an diversen humanen Tumorzelllinien eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) zwischen 3-14 μM Arsenit ermittelt (Ling et al., 2002). Die höchste Empfindlichkeit für Arsenit haben die Ovarialtumorzellen A2780 (IC_{50} : 2,8 μM) und die Brustkrebszellen MCF-7 (IC_{50} : 2,8 μM) gezeigt. Die Tumorzelllinien H520, H322 und H460 mit IC_{50} -Werten mehr als 10 μM waren deutlich weniger sensitiv (Ling et al., 2002). Zudem belegen Untersuchungen an der humanen Lungentumorzelllinie A549 und A549/R (mit einer Resistenz gegenüber diversen Chemotherapeutika wie z.B. Vincristin) mit und ohne Sauerstoffmangel, dass durch eine 48 h Behandlung mit Arsenit bei 5, 10 und 15 μM eine deutliche Wachstumsinhibition und eine gesteigerte Apoptoserate hervorgerufen werden konnte (Qu et al., 2009).

Der MRP vermittelte Transport unterschiedlicher Xeno- und Endobiotika stellt nicht nur für die gesunde Zelle, sondern auch für Tumorzellen einen Weg der Detoxifizierung dar. Es gibt eine Vielzahl von Inhibitoren, die diesen Transportweg über die MRP-Proteine verhindern und somit einer Entgiftung entgegenwirken. Ein wichtiger und häufig eingesetzter Vertreter solcher Inhibitoren ist der LTD₄ Rezeptorantagonist MK571. Mit einer unterschiedlichen Wirksamkeit und Intensität inhibiert MK571 die MRP-Transporterisoformentypen 1 bis 5, wodurch verminderte Toleranzen gegenüber verschiedenen Substanzen erreicht werden können (Haimeur et al., 2004; Deeley et al., 2006). So wurde auch in dieser Arbeit die hemmende Eigenschaft von MK571 auf

MRP1 bis 5 genutzt, um zu zeigen, dass diese Proteine eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Toleranzentwicklung gegenüber Arsenit spielen.

Die Vorbehandlung der H322-Zellen mit MK571 erhöhte die Empfindlichkeit gegenüber Arsenit signifikant. So zeigt sich schon bei einer Konzentration von 2,5 μM eine um 20 % verminderte Vitalität (vgl. Abb. 3, Seite 26). Die Vermutung liegt somit nahe, dass ein oder mehrere MRP-Transporter an der Detoxifikation von Arsenit beteiligt sind. Ähnliche Toleranzeffekte werden in Experimenten mit der MRP1-überexprimierenden humanen Lungentumorzelllinie GLC4/SB30 deutlich. Dabei wurde durch MK571 die Sensibilität der GLC4/SB30-Zellen gegenüber Arsenit auf das 6,7 fache erhöht. Zudem ist in den GLC4/SB30-Zellen nach der Behandlung mit MK571 eine gesteigerte Akkumulation von Arsenit in diesen Zellen nachgewiesen worden (Vernhet et al., 2001).

Kommt es zu einer Exposition mit Arsen(III)- und As(V)-Verbindungen, erfolgt in der Leber die Metabolisierung zu organischem Arsen. Die dabei entstehenden Hauptprodukte Monomethylarsen (MMA)- und Dimethylarsinsäure (DMA) sind laut neuester Studien stärker genotoxisch wirksam als die anorganischen Arsenverbindungen (Schwerdtle et al., 2003; Kligerman et al., 2003). An TRL1215 Zellen der Rattenleber sind die Effekte mit den methylierten Arsenverbindungen Monomethylarsensäure (MMAs), Dimethylarsensäure (DMAs) und Trimethylarsenoxid (TMA₂O) nach einer Inkubation von 20 Wochen untersucht worden. Dabei zeigten die Zellen eine erhöhte Toleranz gegenüber Arsenit, Arsenat und DMAs sowie eine gesteigerte Glutathion-S-Transferase (GST) Aktivität und einen erhöhten Glutathion (GSH) Gehalt (Kojima et al., 2006). Zudem konnte eine vermehrte Expression von MRP1, MRP2, MRP3 und MDR nachgewiesen werden. Die chronisch mit den methylierten Arsenverbindungen behandelte Zellkultur ist zusätzlich mit Verapamil (Inhibitor für MRP Transporter und P-gp) und Probenecid (Inhibitor für MRP Transporter) behandelt worden. Diese beiden Substanzen führten zur Hemmung der MRP-Funktion und zu einer vermehrten Akkumulation von anorganischen Arsenverbindungen (Kojima et al., 2006). Liu et al. hatte ähnliche Ergebnisse an chronisch gestressten TRL1215 Zellen mit Arsenit erzielen können. So zeigte sich auch in diesen Zellen eine Steigerung des mRNA-Gehalts von MRP1 und MRP2 (Liu et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte nicht nur die Wirkung von Arsenit, sondern auch der Einfluss der Konfluenz auf die Genexpression der MRP-Transporter untersucht werden. Wie bereits weiter oben im Text beschrieben, können zu enge Wachstumsbedingungen unerwünschte Zelleffekte auslösen und unterschiedliche Ergebnisse hervorrufen. So wird auch in diesem Experiment der starke Einfluss der Konfluenz auf die Expression deutlich (vgl. Abb. 7, Seite 32). MRP1 und MRP2 zeigen im Vergleich zum ersten Konfluenzversuch keine signifikanten Effekte. Starke Streuungen könnten der Grund für diese Beobachtung sein. Hier wäre eine

Wiederholung des Experiments mit H322-Zellen denkbar. Ohne Arsenit werden in Richtung der höheren Konfluenz die Gene MRP3 und UMAT deutlich reprimiert und MRP5 induziert. MRP4 zeigt nur bei 100 % Konfluenz eine starke Zunahme des mRNA-Gehalts. Auch hier ist wieder zu sehen, dass MRP3 bei zunehmender Wachstumsdichte kein physiologisch wichtiger Transporter für die Zelle zu sein scheint. Im Gegensatz dazu wird MRP4, aber vor allem MRP5 bei den höheren Konfluenzen vermehrt gebraucht, um bestimmte Substanzen zu eliminieren. Wie weiter oben beschrieben, sollte geklärt werden, inwieweit sich der pH-Wert in den Kulturen ändert, welche toxischen Substanzen akkumulieren, ob es Effekte auf den zellulären GSH-Gehalt gibt und welche Regulationsmechanismen (MAPKs oder cAMP) auf die Genexpression einwirken.

MRP1-überexpmierende Zellen zeigen wie die humane Lungentumorzelllinie GLC4/SB30 bei Behandlung mit Arsenit eine verringerte Empfindlichkeit, verglichen mit den Wildtyp-Zellen GLC4 (Rappa et al., 1997). Im Vergleich dazu wird bei Zellen mit einem MRP1-Knockout eine erhöhte Sensitivität gegenüber Arsenverbindungen beobachtet (Rappa et al., 1997). Ein Grund dafür scheint darin zu liegen, dass in Anwesenheit von Glutathion Arsenkonjugate gebildet werden, die vom MRP1-Protein, welches eine hohe Affinität für GSH-Komplexe des Arsenit besitzt, aus der Zelle geschleust werden (Salerno et al., 2002; Deeley et al., 2006). Arsenit aktiviert über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) Signalkaskaden, wie z.B. die mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B, und kann auf diesem Weg die Genregulierung der MRP beeinflussen (Shi et al., 2004; Leonard et al., 2004). Zudem führt Arsenit zum Abbau von Glutathion oder zur Bindung von Cysteinresten in Proteinen, die Veränderungen im zellulären Redoxstatus und in der Genexpression zur Folge haben (Del Razo et al., 2001; Liu et al., 2001).

Die Versuche mit den H322-Zellen (vgl. Abb. 7, Seite 32) deuten auf keine eindeutige Mitwirkung von MRP1 und 2 am Transport von Arsenit in den untersuchten Zellen hin. Einer der Gründe könnte sein, dass die H322-Kultur kein geeignetes Modellsystem darstellt, um die genauen Effekte von Arsenit wiederzugeben. Daher wäre eine Wiederholung des Konfluenzversuchs mit Primärkulturen humaner Lungenzellen von großem Interesse. MRP3 hingegen wird bei Konfluenz 80 % signifikant mit 5 μ M Arsenit reprimiert und bei 100 % induziert. Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Beteiligung des MRP3-Transporters an der Detoxifizierung von Arsenit hin, sobald die Zellkultur eine Konfluenz von 100 % erreicht hat. Wie weiter oben im Text beschrieben, haben Untersuchungen an TRL 1215 Zellen mit den organischen Arsenverbindungen MMAs, DMAs und TMAOs zu einer vermehrten Expression von MRP3 geführt (Kojima et al., 2006). Ob diese Zellen in einem subkonfluenten oder konfluenten Zustand untersucht wurden, ist nicht beschrieben worden. Eine fünftägige Behandlung von Primärkulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen mit Arsenit führte

ebenfalls zu einer Induktion von MRP3 (Glahn et al., 2010). Bei MRP5 führte die Inkubation mit Arsenit bei den Konfluenzen 100 % und 100 % + 3 d zu einer deutlichen Repression. Demnach scheint MRP5 bei höheren Konfluenzen in Gegenwart von Arsenit nicht am Transport beteiligt zu sein. Im Gegensatz dazu belegen Untersuchungen an NHBE-Zellen mit Arsenit nach einer fünftägigen Behandlung eine Induktion der Gene MRP4 und MRP5 (Glahn et al., 2010). UMAT zeigt ebenfalls eine deutliche Repression mit 2,5 und 5 μ M Arsenit, die sich aber nur bei 80% Konfluenz bemerkbar macht. Von einem erhöhten Schutz der Tumorzellen vor Arsenit durch die Transporter MRP4, MRP5 und UMAT kann somit in diesem Experiment nicht ausgegangen werden. Daher wäre eine Wiederholung der Versuche mit primären Zellkulturen oder auch anderen Tumorzelllinien interessant, in denen weiterhin die Aktivität von MAPKs mittels Western Blot und der GSH-Gehalt untersucht werden sollten. Darüber hinaus sollte auch die Expression der Glutathion-S-Transferasen (GST) untersucht werden, da die GST an der Bildung des Komplexes von Arsenit mit GSH beteiligt ist (Leslie et al., 2004).

4.3 Effekte von Kupfer

Für den Menschen ist Kupfer ein essentielles Spurenelement und unterstützt als Bestandteil diverser Metalloenzyme unterschiedliche Enzym-Funktionen. So beteiligt sich Kupfer z.B. über die Cytochrom C-Oxidase an der oxidativen Phosphorylierung, über die Zn-Cu-Superoxid-Dismutase an der Entgiftung von freien Radikalen, über die Ferrooxidase I (Caeruloplasmin) und Ferrooxidase II (Lipoprotein) an der Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) und über die Thyrosin-Hydroxylase an der Biosynthese von Melanin. Ein Mangel oder ein Überfluss kann somit unterschiedliche Erkrankungsbilder hervorrufen, bei denen die Ursachen entweder im genetischen Hintergrund oder im Ernährungsverhalten zu finden sind (Schäfer et al., 2004). Laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) wird für einen durchschnittlichen Erwachsenen eine tägliche Dosis von ungefähr 1,5-4 mg empfohlen, die lediglich über den Nahrungsweg in den Körper gelangt (DGK 2010). Die Resorption von Kupfer erfolgt mit einem hohen Anteil von 30 bis 50 % im Gastrointestinaltrakt. Im Plasma wird es an Transportmoleküle, wie Albumin, Histidin oder Transcuprein, gebunden und zum größten Teil in die Leber transportiert. Von hier aus wird Kupfer unter Mitwirkung von Chaperonen (Transportproteine) und Metallothionein an Caeruloplasmin gebunden und in verschiedene Gewebe des Körpers transportiert. Ist die intrazelluläre Bindungskapazität ausgeschöpft, so entstehen freie Kupferionen, die zytotoxisch wirksam werden. Ein Überschuss an Kupfer wird mit der Ausscheidung über die Galle reguliert, in der es gebunden an Substanzen, wie Aminosäuren oder Glutathion, an das Verdauungssystem abgegeben wird (Schäfer et al., 2004). Im Vergleich zu anderen Metallen wird über akute oder chronisch toxische Wirkungen von Kupfer selten berichtet. Über teratogene, mutagene oder kanzerogene Effekte liegen keine

Hinweise vor. Bei einer akuten oralen oder inhalativen Aufnahme höherer Dosen Kupfer können Vergiftungserscheinungen ausgelöst werden. So entstehen beim Schmelzen oder Verarbeiten von Kupfer Dämpfe und Stäube, die eine akute Irritation der oberen Atemwege hervorrufen können. Übersteigt die oral aufgenommene Kupfermenge einen individuell kritischen Wert über 10 mg, kann der Körper auf dieses Überangebot mit Übelkeit, Erbrechen und Durchfall reagieren. Reicht die Zufuhr in den Gramm-Bereich hinein, kommt es zu schweren Leber - und Nierenschäden, zur Hämolyse oder zum Koma. Für Kupfer wird eine tödliche Dosis bei ca. 10 g angegeben. Auslöser für Kupferintoxikationen können unter anderem kontaminiertes Leitungswasser oder kupferhaltige Pestizide und Fungizide sein (Schäfer et al., 2004; Hartwig et al., 2011). Untersuchungen an Hep-2 Zellen haben gezeigt, dass ansteigende Dosen von CuO Nanopartikeln eine dosisabhängige Zytotoxizität auslösen, die vermutlich durch oxidativen Stress bedingt ist (Fahmy et al., 2009). In aktuellen Studien werden die Kupfer-Transporter ATP7A und ATP7B für viele Toleranzen verantwortlich gemacht. So zeigen ATP7A überexprimierende Zellen Resistenzen gegenüber Vincristin, Paclitaxel, Etoposid, Doxorubicin (Dox) und Mitoxantron. Die Kupfer-Transportmechanismen spielen demnach eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber unterschiedlichen Substanzen (Furukawa et al., 2008).

Die Experimente mit Cu(II) sollten in der vorliegenden Arbeit einen Einblick über den Einfluss erhöhter Cu(II)-Konzentrationen auf die Expression der MRP-Transporter 1 - 5 und UMAT in Lungentumorzellen bei unterschiedlichen Konfluenzen geben. Diese Transportproteine könnten auch an der Regulierung des Kupferhaushalts beteiligt sein.

Den Anfang der durchgeführten Untersuchungen bildete auch im Cu(II)-Versuch der MTT-Test. Hierbei hat die toxische Wirkung von Cu(II) auf die Vitalität der H322-Zellen mit und ohne den MRP Inhibitor MK571 keine signifikanten Ergebnisse ergeben (vgl. Abb. 3, Seite 26). Nach einer 24 h Inkubation mit 50 μM Cu(II) ist die Vitalität der Zellkultur lediglich auf 82 % reduziert. Demzufolge ist keine eindeutige Beteiligung der durch MK571 hemmbaren MRP Transporter am Metabolismus von Cu(II) zu erkennen. Vergleichbare Studien an H322-Zellen und zusätzlich an NHBE-Zellen haben ebenfalls keine Toleranzunterschiede in Gegenwart von MK571 aufgezeigt (Glahn et al., 2010). Diese Beobachtung wird zum Teil durch Vernhet et al. bestätigt, der vor allem das MRP1-Gen näher analysiert hat. Laut seinen Untersuchungen ist das MRP1-Protein kein Transporter für Cu(II). So zeigen die MRP1 überexprimierenden GLC4/SB30 Lungentumorzellen mit und ohne MK571 - im Vergleich zur GLC4 Kontrollkultur - keine veränderte Empfindlichkeit gegenüber Cu(II). Die IC_{50} lag nach 4 Tagen Inkubation mit Cu(II) in den GLC4 Zellen bei $175 \pm 51,0 \mu\text{M}$ und in den GLC4/SB30 bei $186 \pm 32,8 \mu\text{M}$ ohne einen signifikanten Unterschied (Vernhet et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit deuten die Expressionswerte von MRP1 ebenfalls auf keine Beteiligung am Transport von Cu(II) hin (vgl. Abb. 8, Seite 34). MRP2 und MRP3 sind durch die Behandlung mit Kupfer auch nicht beeinflusst worden, so dass eine Detoxifikation von Cu(II) durch diese Transporter in diesem Experiment ausgeschlossen werden kann. Glahn et al. hat ebenfalls an H322-Zellen keine Veränderung der Expression von MRP1-MRP3 in Gegenwart von Cu(II) beobachtet (Glahn et al., 2010). Konfluenzunterschiede scheinen keine große Wirkung auf die Expression von MRP1 und MRP2 zu haben. MRP3 hingegen wird in Richtung der höheren Konfluenz deutlich reprimiert. So wird in diesem Konfluenzversuch wieder einmal deutlich, dass der MRP3-Transporter mit zunehmender Wachstumsdichte für den Transport unterschiedlich anfallender Substanzen in den H322-Zellen nicht benötigt wird. Im Gegensatz dazu zeigen MRP4, MRP5 und UMAT bei Konfluenz 100 % und MRP5 noch bei 100 % + 3 d eine signifikante Induktion. In diesem Versuch wäre auch interessant zu klären, welche endogenen und exogenen Substanzen sich vermehrt anhäufen und welcher pH-Wert vorliegt, um genauere Rückschlüsse auf die erhöhten Expressionswerte ziehen zu können. In Gegenwart von Cu(II) kommt es in den H322-Zellen bei Konfluenz 100 % + 3 d zu einer deutlichen Induktion der Gene MRP4 und UMAT. Hier scheinen die beiden Transporter ab einer sehr hohen Zelldichte an der Kupferhomöostase beteiligt zu sein. Hinsichtlich des MRP4-Transporters liegen bis dato in Säugerzellen keinerlei Ergebnisse vor, die den Kupfertransport durch dieses Protein belegen. Studien konnten nachweisen, dass der MRP4-Transporter nicht nur in Säugerzellen, sondern auch in Pflanzenzellen vertreten ist (Klein et al., 2004). So zeigen Untersuchungen an Wurzeln und Trieben von einem Kupfer toleranten Birkenklon der *Betula pendula* (Hängebirke), dass MRP4 in diesem Klon deutlich stärker exprimiert wird als in weniger toleranten Klonen (Keinänen et al., 2007). Die Humane Kolonadenokarzinomzelllinie LoVo ohne das UMAT-Gen ist für die heterologe Expression des von der Ratte stammenden rABCB6-Gens eingesetzt worden, um die Toleranz gegenüber Cu(II), Co(II) und Zn(II) zu analysieren. Hierbei stellte sich heraus, dass die LoVo-Zelllinie mit dem UMAT-Gen eine erhöhte Toleranz in Anwesenheit von Cu(II) aufzeigte. Im Vergleich dazu konnte keine vergleichbare Toleranz gegenüber Co(II) oder Zn(II) festgestellt werden. Somit scheint der UMAT-Transporter einen möglichen Transportweg für Cu(II) darzustellen (Jalil et al., 2008). Zur weiteren Klärung des Kupfermetabolismus wären Untersuchungen der Gene ATP7A und ATP7B bezüglich ihrer Expression in Zellkulturen mit Kurz- und Langzeitwirkung bei unterschiedlicher Konfluenz von Interesse.

4.4 Effekte von Quecksilber

Quecksilber ist für den menschlichen Organismus nicht essentiell, sondern eher von toxikologischer Bedeutung. Die Toxizität wird dabei vor allem vom vorliegenden Verbindungstyp, vom Expositionsweg und von der Dosis bestimmt. Bei Betrachtung der chemischen Form kann Quecksilber im elementaren, im anorganischen und im organisch gebundenen Zustand vom Menschen aufgenommen werden. Gelangt metallisches Quecksilber über den oralen Pfad in den Körper, so zeigt sich eher ein geringes toxisches Potential. Aufgrund der Tatsache, dass elementares bzw. metallisches Quecksilber nur in geringem Ausmaß über die Haut oder den Magen-Darm-Trakt resorbiert wird, stellt sogar das Verschlucken oder der Hautkontakt größerer Mengen keine große Gefahr dar (Fuhrmann et al., 2006). Im Gegensatz dazu ist das Inhalieren von gasförmigem Quecksilber (Hg^0) mit einem großen gesundheitlichen Risiko verbunden und stellt am Arbeitsplatz die eigentliche Expositionsquelle dar (Torky und Foth, 2007). Die gasförmige Form ist angesichts des hohen Dampfdrucks von Quecksilber immer dort anzutreffen, wo sich metallisches Quecksilber befindet. Ist der Quecksilberdampf erst einmal eingeatmet worden, so werden circa 80 % in der Lunge resorbiert. Es dauert ungefähr 24 h, bis sich Hg^0 im gesamten Organismus verteilt hat. Diese Tatsache beruht auf den physikochemischen Eigenschaften von Quecksilberdampf, der sich durch eine hohe Lipophilie auszeichnet, was die Diffusion in unterschiedliche Gewebe ermöglicht. Intrazellulär erfolgt eine metabolische Oxidation von Hg^0 -Atomen zu Hg^{2+} -Ionen, wobei dieser Prozess in den Erythrozyten, der Leber und im Gehirn vorwiegend durch die Anwesenheit der Katalase ermöglicht wird. Die Hg(II) -Ionen werden über SH-Gruppen an Proteine gebunden und können dadurch Denaturierung und Enzyminhibition auslösen. In dieser ionisierten Form ist die Passage durch Membranen stark eingeschränkt. Dies hat bei einer dauerhaften Quecksilberdampfexposition eine intrazelluläre Akkumulation zur Folge (Fuhrmann et al., 2006; Schäfer et al., 2004). Hg(II) stellt hierbei die eigentliche toxische Wirkform dar (Torky und Foth, 2007).

Die minimale tödliche Dosis bei oraler Aufnahme beim Menschen beträgt für Hg(II) -Verbindungen 3-15 mg Hg/kg Körpergewicht und für Hg(I) -Salze 30-40 mg Hg/Kg Körpergewicht (Schäfer et al., 2004; Fuhrmann et al., 2006). In den entwickelten Ländern zählt der Gebrauch von Amalgam in Zahnfüllungen, neben der Aufnahme von organischen Hg-Verbindungen aus belastetem Fisch zu den Expositionsquellen für den menschlichen Organismus. Hauptsächlich beim Füllen und Entfernen der Amalgamfüllung wird Quecksilber in Form von Dampf - als Ionen - oder feinen Partikeln vom Körper aufgenommen (WHO 2007). Eine wesentliche Rolle bei der Entgiftung von Xenobiotika und auch von elementarem Quecksilber in Lungenzellen spielt das GSH-Redoxsystem (Rahman et al., 1999). Bei

Untersuchungen an Ratten die 10 Tage lang für 2 Stunden am Tag elementaren Quecksilberdampf (4 mg/m^3) inhalierten, ist in den Lungenzellen eine Aktivierung des GSH-Redoxsystems durch eine verstärkte Expression der Gene GST-pi, mGST1 und GR (Glutathion Reduktase) nachgewiesen worden (Liu et al., 2003). Studien mit HgCl_2 an MDCK Zellen (Madin-Darby canine kidney) haben ebenfalls eine gesteigerte Aktivität der Glutathion-S-Transferase aufgezeigt (Aleo et al., 2005). Die Glutathion-S-Transferase (GST) katalysiert die Kopplung von Quecksilber an den endogenen Baustein Glutathion, wodurch eine Elimination über die MRP-Transporter ermöglicht wird (Sugawara et al., 1998; Ballatori, 2002). Die von Liu und Kollegen beobachtete Induktion von GST, MRP1 und 2 durch Hg^0 bestätigen ihre Beteiligung an der Detoxifizierung von Quecksilber. Aber auch die verstärkte Expression von MDR1 und des organischen Kationen-Transporters OCT1 stellen mögliche Transportwege für Quecksilber dar, die aber bis heute noch nicht bewiesen sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Vitalitätstests im Konfluenz -und Langzeitversuch mit Hg(II) haben mit und ohne den MRP-Inhibitor MK571 keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit der Zellen erkennen lassen (vgl. Abb. 3 und Abb. 11, Seite 26/40). Auch im Langzeitversuch haben die H322-Zellen über einen Inkubationszeitraum von 42 Tagen ähnliche Ergebnisse ergeben. Es kam also nicht zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber Hg(II) (vgl. Abb. 12, Seite 42). Die MRP-Transporter scheinen in diesen Experimenten daher keinen Einfluss auf die Toxizität von Hg(II) in diesen Zellkulturen zu nehmen, obwohl Untersuchungen an anderen Zellen eine Beteiligung belegen können. So führte die Behandlung mit MK571 an MDCK-Zellen der Hundeniere nicht nur zu einer signifikanten Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Quecksilber, sondern auch zu einer verstärkten Akkumulation (Aleo et al., 2005). Demnach scheinen die Zellen der Hundeniere empfindlicher gegenüber Quecksilber zu sein, als die H322-Lungentumorzellen. Zudem reagierten MRP1-überexprimierende GLC4/SB30-Zellen nach der Behandlung mit MK571 um das 3fache empfindlicher auf Hg(II) , als ihre Kontrollen (Vernhet et al., 2000). Werden akute myeloische Leukemiezellen (AML-2/WT) für 4 Tage mit HgCl_2 inkubiert, weisen sie eine IC_{50} von $33.5 \pm 1,4 \mu\text{M}$ auf. Im Vergleich dazu haben die MRP1-überexprimierenden AML-2/DX100-Zellen mit einer IC_{50} von $83,8 \pm 2,4 \mu\text{M}$ Hg(II) eine deutlich höhere Resistenz als der Wildtyp AML-2/WT (Kim et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten somit auf eine Beteiligung des MRP1-Proteins an der Elimination von Hg(II) hin. Da die untersuchte H322-Zellkultur in dieser Arbeit keine deutlichen Reaktionen mit dem MRP-Inhibitor erkennen ließ, scheinen die MRP-Isoformen keinen Beitrag zum Schutz der Zellen zu leisten. Möglicherweise spielen dabei andere Transporter eine größere Rolle, die hier nicht untersucht worden sind. Aber auch ein erhöhter GSH-Spiegel oder eine verstärkte Aktivität der Glutathion-S-Transferase können eine verringerte Sensibilität gegenüber Quecksilber hervorrufen.

Während des 28 Tage Langzeitversuchs sind in Abständen von 7 Tagen mikroskopische Fotos gemacht worden, um die H322-Zellen auf morphologische Veränderungen in Gegenwart von Quecksilber zu untersuchen (vgl. Abb. 13-16, Seite 43-45). Die H322-Zellen ließen auf den Fotos nach den Behandlungstagen 7, 14, 21 und 28 eine Reduzierung der Zelldichte nach der Inkubation mit 2,5 und 5 μM Hg(II) feststellen. Zudem waren die Zellgrenzen der behandelten Zellen weniger deutlich zu erkennen und das Zellvolumen teilweise vergrößert. Zytoplasmatische Vesikel waren ab dem 7. Behandlungstag mit 5 μM Hg(II) in der H322-Zellkultur zu erkennen. Solche Vesikel sind u.a. für den Export von neu synthetisierten Proteinen aus dem Endoplasmatischen Retikulum in die Zellmembran verantwortlich. So können auch auf diesem Wege Transportproteine, wie die MRPs, zur Zellmembran transportiert werden, wo sie für den Efflux anfallender Endo- und Xenobiotika zur Verfügung stehen. Sie können aber auch zur Speicherung von toxischen Substanzen, wie intrazelluläre Abfallprodukte oder unterschiedliche Metallkomplexe, dienen. Auch dies könnte die vermehrte Ansammlung dieser Vesikel in den behandelten Zellen erklären. Aleo et al. untersuchte den Einfluss von HgCl_2 auf die Zellmorphologie an MDCK (Madin-Darby canine kidney) Zellen in den Konzentrationen 3 bis 30 μM für 72 h (Aleo et al., 2005). Bei Konzentrationen bis 10 μM zeigten die Zellen nur eine geringe Abnahme der Zelldichte. Bei 30 μM führte das Quecksilbersalz bereits nach 24 h zu einer 80 %igen Reduktion der Zelldichte. Die mikroskopische Untersuchung der MDCK-Zellen zeigte schon im nicht-toxischen Bereich von weniger als 10 μM HgCl_2 dosis- und zeitabhängige Veränderungen. Die behandelten Zellen ließen eine veränderte Struktur, ein vergrößertes Zellvolumen und zusätzlich zytoplasmatische Vesikel beobachten (Aleo et al., 2005). Um die genaue Funktion der Vesikel zu klären, wären weitere Untersuchungen interessant, die den Inhalt der Vesikel eindeutig bestimmen könnten.

Die weiter oben beschriebenen Vitalitätsuntersuchungen der H322-Zellkultur mit Hg(II) und MK571 haben keine Hinweise auf die Beteiligung der MRP-Transporter an der Elimination von Hg(II) gegeben. Dieses Ergebnis spiegelt sich zum größten Teil in den Expressionswerten der MRP-Transporter im Konfluenz- und Langzeitversuch mit Hg(II) wider. Wird zuerst nur der Einfluss der Konfluenz auf die Expression von MRP1-5 und UMAT betrachtet, so zeigen sich im Vergleich zu den anderen Konfluenzversuchen wieder einmal ähnliche Expressionsmuster (vgl. Abb. 9, Seite 37). MRP3 wird auch in diesem Versuch mit zunehmender Zelldichte signifikant reprimiert. Hier wird ersichtlich, dass MRP3 kein wichtiger Transporter für die wahrscheinlich vermehrt anfallenden Endo- und Xenobiotika ist. Eine deutliche Induktion zeigen die Gene MRP4 bei 100 % und MRP5 bei 100 % + 3 d, wie es bei den anderen Versuchen ebenfalls der Fall war. So kann man auch in diesem Experiment davon ausgehen, dass die Zelle in einem Milieu mit zunehmendem Nährstoffmangel vor allem die Transporter MRP4 und 5 einsetzt, um die akkumulierenden toxischen Substanzen zu eliminieren. Wie

weiter oben erwähnt, sollte geklärt werden, wie sich das Milieu in der Zelle und im Medium verändert, um die genauen Einflussfaktoren auf die Genexpression näher bestimmen zu können. Unter diesem Aspekt wäre die Überprüfung des pH-Wertes und des GSH-Spiegels von großem Interesse.

In Anwesenheit von Hg(II) wird nur das MRP1-Gen in der 100 % konfluenten Kultur mit 2,5 μM auf das 1,9fache induziert. Die Gene MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 und UMAT lassen nach der Inkubation mit Hg(II) keinen deutlichen Einfluss erkennen. Lediglich ist eine mäßige Induktion von MRP4 und UMAT bei 100 % Konfluenz zu beobachten, was auf eine Beteiligung am Transport von Hg(II) hinweisen könnte. In der Leukämiezelllinie AML-2 bewirkt die Inkubation mit 20 und 40 μM HgCl_2 für 48-72 h eine signifikante Zunahme der Expression vom MRP1-Gen (Kim et al., 2005). Die genauen zellulären Mechanismen, die zu einer Induktion von MRP1 führen, sind noch nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen an der Leukämiezelllinie AML-2 haben einen möglichen Regulationsweg festgestellt, der über die Aktivierung der p38 MAPK laufen soll. Hierbei initiiert Hg(II) die MRP1 Expression durch die Phosphorylierung der p38 MAPK. Dies wird vor allem nach der Behandlung mit dem p38 MAPK Inhibitor SB 203580 deutlich, bei der signifikant die MRP1-Induktion gehemmt wird (Kim et al., 2005).

Bei einer Wiederholung des Konfluenzversuchs mit Hg(II) könnten primäre Zellkulturen, wie z.B. die NHBE-Zellen, hinzugezogen werden oder andere Tumorzelllinien. Hierbei wäre interessant zu klären, inwiefern Hg(II) die p38 MAP-Kinase beeinflusst. Da aber auch andere MAPKs für die Genregulation in Frage kommen könnten, bedarf es auch hier weiterer Analysen. Die Untersuchungen könnten mittels Western-Blot durchgeführt werden. Aber auch die Erforschung der Expression von Glutathion-S-Transferasen und Glutathion-Reduktasen oder anderer Transporter, wie MDR1, ZnT1 und OCT1, könnte in Betracht gezogen werden, um den Beitrag des GSH-Redoxsystems und anderer Transportwege zur zellulären Resistenz gegenüber Hg(II) aufzuklären.

Im Konfluenzversuch nach 28-34 Tagen Inkubation mit Hg(II) zeigt nur das MRP5-Gen signifikante Effekte (vgl. Abb. 21, Seite 50). Bei Betrachtung der unbehandelten Kontrollen kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Expression von MRP5 bei 100 % und 100 % + 3 Tage. Bei 100 % Konfluenz wird MRP5 im Vergleich zur Kontrolle nach der Inkubation mit 5 μM Hg(II) reprimiert, so dass eine Mitwirkung an der Detoxifizierung von Hg(II) in diesen Zellen ausgeschlossen werden kann. Im Vergleich zu den anderen Konfluenzversuchen wird nur das MRP5 Gen deutlich reguliert und die Ergebnisse zeigen viel stärkere Streuungen. Die zunehmende Seneszenz der Zellen könnte dabei eine Rolle spielen. Werden im Langzeitversuch (vgl. Abb. 20, Seite 48) zuerst die Kontrollen in Augenschein genommen, so ist am 28. Tag eine signifikante Induktion von MRP1, MRP3, MRP4 und MRP5 zu sehen. Diese Erscheinung

könnte auf die wiederholte Passagierung der Zellen zurückzuführen sein, die eine vermehrte Expression hervorrufen könnte. In Primärkulturen von NHBE-Zellen von der vierten auf die fünfte Generation wurde ebenfalls eine drastische Induktion von MRP1 beschrieben (Lehmann et al., 2001). Werden die Zellen mit Hg(II) inkubiert, wird eine Repression der MRP-Transporter in den Tumorzellen deutlich (vgl. Abb. 20, Seite 48). So ist am 28. Inkubationstag mit 2,5 und 5 μM Hg(II) eine signifikante Abnahme der mRNA-Menge bei den Genen MRP1-4 und UMAT zu erkennen. MRP5 ist nur am 14. Behandlungstag mit 5 μM Hg(II) signifikant reprimiert. Somit zeigt sich auch in den Langzeitversuchen mit Hg(II) keine deutliche Beteiligung der MRP-Proteine am Transport für Hg(II). Da die Zellen nach 28 Tagen im subkonfluenten Zustand geerntet wurden, wäre die erneute Untersuchung bei unterschiedlicher Konfluenz von Interesse, um den Einfluss der Konfluenz näher prüfen zu können. Bei einer Wiederholung des Langzeitversuchs sollten auch primäre Zellkulturen in Betracht gezogen werden und andere mögliche Transportwege untersucht werden, die einen weiteren oder vielleicht sogar besseren Transportweg für Hg(II) darstellen. So könnte die Expression der Gene MDR1, ZnT1 und OCT1 analysiert werden. Zudem wäre mit Hilfe des Western Blot interessant zu klären, inwiefern die MAPKs im Langzeitversuch die Expression der MRP oder anderer Gene beeinflusst.

5 Zusammenfassung

Der menschliche Organismus ist chronisch inhalativ gegenüber diversen Substanzen exponiert, die sowohl in fester, flüssiger und gasförmiger Form vorliegen. Wie stark die Atemluft mit solchen Stoffen belastet ist, wird unter anderem von der geographischen Lage, der Jahreszeit, dem Arbeitsplatz und vom Lebensstil beeinflusst. Über die oberen und unteren Atemwege gelangen die luftgetragenen Schadstoffe in die Lunge. Über diesen Expositionspfad können auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Metalle Arsenit, Cu(II) und Hg(II) in den Körper eindringen und verschiedene Reaktionen hervorrufen. Die Zellen des menschlichen Organismus verfügen über unterschiedliche Entgiftungsmechanismen, um toxische Substanzen zu eliminieren. Die Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP) stellen einen Weg dar, Stoffe wie beispielsweise auch Zytostatika aus der Zelle herauszutransportieren. Die Tatsache, dass nicht nur gesunde Zellen, sondern auch Tumorzellen mit solchen Membranproteinen ausgestattet und dadurch resistenter gegenüber Chemotherapeutika sein können, kann eine erfolgreiche Krebstherapie erschweren. Aus diesem Grund sollten die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen bestimmter Kulturbedingungen sowie einer Exposition gegenüber Arsenit, Cu(II) und Hg(II) auf die Expression dieser Transportproteine darstellen.

Sämtliche Experimente sind mit der humanen Lungentumorzelllinie H322 durchgeführt worden. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Expression der Transportproteine MRP1-5 und UMAT in Kulturen dieser Zelllinie bei verschiedenen Konfluenzen (80 %, 100 % und 100 % + 3d) sowie mit den Effekten von Arsenit, Cu(II) und Hg(II) auf die Expression dieser Transporter. Diese Versuche dienten der genaueren Charakterisierung des verwendeten Modellsystems und sollten klären, in welchem Ausmaß unterschiedliche Konfluenzen die Expression beeinflussen. Im zweiten Teil wurde der Langzeiteffekt von Hg(II) nach 28 Tagen auf die Expression der oben genannten Gene in Kulturen analysiert, die in subkonfluentem Zustand geerntet wurden.

In den Kurzzeitversuchen konnte gezeigt werden, dass die Konfluenz einen wesentlichen Einfluss auf die Expression hat und die Wirkung der Metalle unterschiedlich stark beeinflusst. So ist im Konfluenzversuch ohne Metall auffällig, dass die Gene MRP2, MRP4 und UMAT bei 100 % Konfluenz den höchsten mRNA-Gehalt aufzeigten. Die Expression von MRP5 wird mit zunehmendem Wachstum signifikant induziert. Zu enge Wachstumsverhältnisse in den Kulturen eine Akkumulation von Stoffwechselprodukten hervorrufen. Die induzierten Proteine könnten demnach für deren Transport aus den Zellen verantwortlich sein. MRP3 hingegen scheint an diesen Eliminationsprozessen nicht beteiligt zu sein, da die Expression bei den höheren Konfluenzen stark sinkt.

Im Konfluenzversuch mit Arsenit scheinen die Gene MRP1, 2, 4, 5 und UMAT unabhängig von der Konfluenz nicht am Transport von Arsenit beteiligt zu sein. MRP3 ist in diesem Versuch das einzige Gen, welches auf eine mögliche Mitwirkung an der Elimination von Arsenit hindeutet. Dies scheint aber nur bei 100 % Konfluenz in Gegenwart von 5 μM Arsenit der Fall zu sein. Bei 80 % Konfluenz hingegen wird MRP3 in Gegenwart von Arsenit reprimiert. Bei MRP5 führt die Behandlung mit Arsenit ab den Konfluenzen 100 % und 100 % + 3 d zu einer signifikanten Minderung der mRNA-Menge. UMAT zeigt bei 80 % Konfluenz eine deutliche Repression. Ohne die Anwesenheit von Arsenit ist die mRNA-Menge von MRP3 und UMAT signifikant bei 100 % und 100 % + 3 d vermindert und die Expression von MRP5 ist erhöht. MRP4 weist nur in der 100 % konfluenten Kontrollkultur eine ausgeprägte Induktion auf.

Eine mögliche Beteiligung der untersuchten Transporter am Kupferstoffwechsel wurde ebenfalls in Abhängigkeit von der Konfluenz untersucht. So zeigen die Transporter MRP4 und UMAT bei Konfluenz 100 % + 3d in Gegenwart von 2,5 und 5 μM Cu(II) eine signifikante Induktion. Demnach könnte ein Transport von Cu(II) durch diese Proteine postuliert werden, der aber nur bei sehr engen Wachstumsbedingungen zum Tragen kommt. Die anderen untersuchten Transporter scheinen keinen Einfluss auf den Kupfertransport zu nehmen. MRP5 wird bei 100 % Konfluenz mit 2,5 und 5 μM Cu(II) und bei 100 % + 3d mit 5 μM sogar deutlich reprimiert. Ohne Cu(II) ist die Expression der Gene MRP4, MRP5 und UMAT bei Konfluenz 100 % signifikant erhöht. Zudem zeigt MRP5 bei 100 % + 3d im Vergleich zur 80 % konfluenten Kultur ebenfalls eine deutliche Induktion. Der mRNA-Gehalt von MRP3 sinkt in unbehandelten Kulturen mit zunehmendem Wachstum bis zu einer Konfluenz von 100 % + 3 d signifikant.

Der Versuch mit Hg(II) zeigt ebenfalls den deutlichen Einfluss der Konfluenz auf die Expression von MRP1-5 und UMAT. Eine Mitwirkung am Transport von Hg(II) scheint in diesem Experiment nur das MRP1 Gen zu haben. Bei 100 % Konfluenz wird MRP1 in Gegenwart von 2,5 μM Hg(II) deutlich induziert. Ohne Hg(II) ist die mRNA-Menge von MRP3 bei Konfluenz 100 % und 100 % + 3d signifikant vermindert. Im Unterschied dazu werden MRP4 bei 100 % und MRP5 bei 100 % + 3d deutlich induziert, die demnach am Transport diverser Stoffwechselprodukte beteiligt zu sein scheinen.

Im Konfluenzversuch nach 28-34 Tagen Inkubation mit Hg(II) werden nur bei MRP5 signifikante Effekte sichtbar. Hierbei kommt es, wie bei den anderen Versuchen, zu einer deutlichen Induktion bei den Konfluenzen 100 % und 100 % + 3d. In Gegenwart von 5 μM Hg(II) wird MRP5 in der 100 % konfluenten Kultur signifikant reprimiert. Auch mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, wie groß die Auswirkung der Konfluenz auf die Expression ist.

Im Langzeitversuch mit Hg(II) wird ab dem 28. Behandlungstag bei fast allen Genen mit Ausnahme von MRP5 eine signifikante Repression erkennbar. So zeigen MRP1-4 bei 2,5 und 5 μM Hg(II) eine verminderte Expression. Die mRNA-Menge von UMAT ist nur bei 5 μM verringert. Bei MRP5 kommt es nur am 14. Inkubationstag mit 5 μM zu einer Repression. Keines der untersuchten Gene wird in Gegenwart von Hg(II) vermehrt exprimiert, was nicht auf eine Beteiligung dieser Transporter am Schutz der Zellen gegen Hg(II) hindeutet.

6 Literaturverzeichnis

- 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.
- Ballatori N (2002) Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect* 110 (suppl 5):689–694.
- 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.
- BAuA (2002) Auszug aus dem Bericht "Sicherheit und Gesundheit bei der Arbeit 2008": TC Berufskrankheitengeschehen, <http://www.baua.de/de/Publikationen/Forschungsberichte/2002/Fb951.html>, Zugriff am 30. März 2009.
- Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR, Kruh GD (1998) Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1735-1741.
- Beyersmann D, Hartwig A (2008) Carcinogenic metal compounds - recent insight in molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82(8):493–512.
- Böhle A, Brandau S, Durek C, Ardelt P, Kausch I: Blasenkarzinom. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg) *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen*. Springer Verlag, 2002, S. 298-299.
- Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-592.
- Boxberger HJ: *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*. Wiley-VCH, 2006, S. 1-3.
- Bucher O, Wartenberg H: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Huber 1997, S. 252-259.
- Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz (2003) Bekanntmachung des Umweltbundesamtes Stoffmonographie Arsen-Referenzwert für Urin Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes. DOI 10.1007/s00103-003-0710-6. 46:1098-1106.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169–193.
- Chanda S, Dasgupta UB, Guhamazumder D, Gupta M, Chaudhuri U, Lahiri S, Das S, Ghosh N, Chatterjee D (2006) DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci* 89:431-437.
- Chen Z, Chen GQ, Shen ZX, Chen SJ, Wang ZY (2001) Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic compounds: in vitro and in vivo studies. *Semin Hematol.* 38(1):26-36.
- 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.

- Cui X, Wakai T, Shirai Y, Hatakeyama K, Hirano S (2006) Chronic oral exposure to inorganic arsenate interferes with methylation status of p16INK4a and RASSF1A and induces lung cancer in A/J mice. *Toxicol Sci* 91:372-381.
- 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.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* 11:1156-1166.
- Dean M (2002) The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mono_001, Zugriff am 25.05.2009.
- 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.
- Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderón-Aranda ES, Manno M, Albores A (2001) Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol*.177(2):132-48.
- DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft; MAK- und BAT-Werte-Liste (Mitteilung 43 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe vom 1. Juli 2007). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim 2007.
- DFG (2009) Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe http://www.dfg.de/dfg_profil/gremien/senat/gesundheitschaedliche_arbeitsstoffe/index.html, Zugriff am 30. März 2010.
- DGK (2010) Stichwort Kupfer: rotes Metall stärkt das Immunsystem <http://dgk.de/gesundheit/umwelt-gesundheit/informationen/nahrung/stichwort-kupfer-rotes-metall-staerkt-das-immunsystem.html> © 2010 Deutsches Grünes Kreuz für Gesundheit e.V. - Powered by Pro Preventa GmbH, Zugriff am 02. April 2011.
- DKFZ (2008) Chemotherapie: Mit Zytostatika gegen Krebs <http://www.krebsinformationsdienst.de/themen/behandlung/chemotherapie.php>, Zugriff am 13. Januar 2010.
- Efferth T: *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie: Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften*. Springer Verlag, 2006, S. 44-46.
- Fahmy B, Cormier SA (2009) Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 23(7):1365-71.
- Fanger GR, Schlesinger TK, Johnson GL: Control of MAPK Signaling by Ste20- and Ste11-Like Kinases. In: Gutkind JS (ed) *Signaling networks and cell cycle control: the molecular basis of cancer and other diseases*. Humana Press, 2000, pp. 183.
- Fuhrmann GF: *Toxikologie für Naturwissenschaftler: Einführung in die theoretische und spezielle Toxikologie*. Teubner, 2006, S. 234-236.
- Furukawa T, Komatsu M, Ikeda R, Tsujikawa K, Akiyama S (2008) Copper transport systems are involved in multidrug resistance and drug transport. *Curr Med Chem*.15(30):3268-78.

- GESTIS (2010) Stoffdatenblatt Arsen(III)-oxid. Stand: 08.02.2010.
<http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll?f=templates&fn=main-hit-h.htm&2.0>, Zugriff am 02. April 2011
- George J, Banik NL, Ray SK (2009) Genistein induces receptor and mitochondrial pathways and increases apoptosis during BCL-2 knockdown in human malignant neuroblastoma SK-N-DZ cells. *J Neurosci Res.* 88(4):877-86.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6: 1095–1101.
- Glaeser H, Fromm MF, König J: Transporters and Drugs- An Overview. In Vaz RJ, Klabunde T (ed): *Antitargets: prediction and prevention of drug side effects.* Wiley-VCH, 2008, pp. 341-349.
- Glahn F: MRP-Transporter in humanen Lungenzellen - Bedeutung für Risiken durch toxische Metalle. Dissertation, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2009.
- Gliech M, Kindler J M (2006) Elementbeschreibungen: Quecksilber. In: Rutherford online-Lexikon der Elemente. Uniterra - Berlin 1995 - 2006, <http://www.uniterra.de/rutherford>, Zugriff am 22. Februar 2010.
- Gosselink R: Atemsystem. In: van den Berg, F (Hrsg) *Angewandte Physiologie: Organsysteme verstehen und beeinflussen*, Band 2. Georg Thieme Verlag, 2005, S. 41-46.
- Grinnell RM, Unrau YA: *Social Work Research and Evaluation: Foundations of Evidence-Based Practice.* Oxford University Press, 2010, pp. 445.
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SPC (2004) The MRP-Related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Current Drug Metabolism.* 5:21-53.
- Hartwig A (2011) Kupfer in: RÖMPP Online. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, RD-11-02474, <http://www.roempp.com>, Zugriff am 04. Januar 2012.
- Hartwig A, Pelzer A, Asmuss M, Burkle A (2003) Very low concentration of arsenite suppress poly(ADP-ribosyl) ation in mammalian cells. *Int J Cancer* 104:1-6.
- Hay RJ, Reid YA, McClintock PR, Chen TR, Macy ML (1996) Cell Line Banks and Their Role in Cancer Research. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 24:107-130.
- 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 ntransporter. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 151–155.
- Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M: *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* Georg Thieme Verlag, 2006, S. 127-128.
- 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):C579-90.
- Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK (2006) Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2(3):351-66.

- Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152–162.
- Keinänen SI, Hassinen VH, Kärenlampi SO, Tervahauta AI (2007) Isolation of genes up-regulated by copper in a copper-tolerant birch (*Betula pendula*) clone. *Tree Physiol.* 27(9):1243-52.
- Kim SH, Bark H, Choi CH (2005) Mercury induces multidrug resistance-associated protein gene through p38 mitogen-activated protein kinase. *Toxicology Letters* 155:143–150.
- Klein M, Geisler M, Suh SJ, Kolukisaoglu HU, Azevedo L, Plaza S, Curtis MD, Richter A, Weder B, Schulz B, Martinoia E (2004) Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J.* 2004 Jul, 39(2):219-36.
- Kligerman AD, [u.a.] (2003) Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ Mol Mutagen.* 42(3):192- 205.
- 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.
- Kooijman C (2007) Luft und Lunge. Lungenliga Schweiz. Bern. Publikation Nr. 10911674.
- 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, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, Borst P (1999) MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6914–6919.
- Kruh GD, Guo Y, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Chen ZS (2007) ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 453:675–684.
- Kurashima-Ito K, Ikeya T, Senbongi H, Tochio H, Mikawa T, Shibata T, Ito Y (2006) Heteronuclear multidimensional NMR and homology modelling studies of the C-terminal nucleotide-binding domain of the human mitochondrial ABC transporter ABCB6. *J Biomol NMR* 35(1):53-71.
- Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
- Langdon SP, Macleod KG: Essential Techniques of Cancer Cell Culture. In Langdon SP (ed): *Cancer cell culture: methods and protocols.* Springer Verlag, 2004, pp. 18.
- Lehmann S, Bengtzen S, Paul A, Christensson B, Paul C (2001) Effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on leukemic cells from patients with non-M3 acute myelogenous leukemia: studies of cytotoxicity, apoptosis and the pattern of resistance. *Eur J Haematol.* 66(6):357-64.
- Leslie EM, Haimeur A, Waalkes MP (2004) Arsenic transport by the human multidrug resistanceprotein 1 (MRP1/ABCC1): Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.* 279, 32700– 32708.

- Leonard SS, Harris GK, Shi X (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2004 Dec 15; 37(12):1921-42.
- Lindl T, Gstraunthaler G: Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank. Spektrum Akademischer Verlag, 2002, S. 120.
- Ling YH, Jiang JD, Holland JF, Perez-Soler R (2002) Arsenic Trioxide Produces Polymerization of Microtubules and Mitotic Arrest before Apoptosis in Human Tumor Cell Lines. *Mol Pharmacol* 62:529–538.
- 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.
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, 2006, S. 16, S. 330-340.
- Markant A, Rimbach G, Krämer K, Mayer H, Pallauf J: 1. Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. In: Sims W (Hrsg): *Oxidativer Stress und Pharmaka*, Govi-Verlag Eschborn, 2005, S. 17-23.
- 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.
- Mizutani T (2009) Characterization of Signaling Pathways in Cells Infected with SARS-CoV. In: Yang D (Hrsg.) *RNA viruses: host gene responses to infections*. World Scientific. S. 324.
- Paschke T, Scherer G and Heller WD (2003) Effects of Ingredients on Cigarette Smoke Composition and Biological Activity: A Literature Overview. *International/Contributions to Tobacco Research, Volume 20*.
- Piatek K, Schwerdtle T, Hartwig A, Bal W (2008) Monomethylarsonous acid destroys a Tetrathiolate Zinc Finger much more efficiently than inorganic arsenite: Mechanistic considerations and consequences for DNA repair inhibition. *Chem Res Toxicol.* 21(3):600-6.
- Pimentel E: *Handbook of Growth Factors: Peptide growth factors. Volume II*. CRC Press, 1994, pp. 99.
- Qiao DF, Ma AD, Yan F, Wang HJ (2006) As₂O₃-induced permeability transition pore opening in mitochondria depends on Ca²⁺. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 26(7):1030-3.
- Qu GP, Xiu QY, Li B, Liu YA, Zhang LZ (2009) Arsenic trioxide inhibits the growth of human lung cancer cell lines via cell cycle arrest and induction of apoptosis at both normoxia and hypoxia. *Toxicol Ind Health.* 25(8):505-15.
- Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW, Athar M (1999) Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit. Rev. Toxicol.* 29, 543–568.
- 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.

- RKI und GEKID (2008) Daten zu Abbildungen in: Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. Berlin, 6:46.
- Rossmann TG, Molina M, Klein CB (1986) Comutagens in *E. coli* and Chinese hamster cells with special attention to arsenite. *Prog Clin Biol Res.* 209A:403-8.
- Rüger B: Test- und Schätztheorie. Oldenbourg Verlag, 2002, S. 345.
- 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.
- Schäfer SG, Elsenhans B, Forth W, Schümann K: Metalle In: Marquardt H, Schäfer SG (Hrsg) Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2004, S. 763-799.
- 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.
- 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.
- Schunk A: Salze mehrkerniger Halogeno-Mercurate mit komplexen Kationen. Dissertation, Universität Ulm, Sektion für Röntgen- und Elektronenbeugung, 1999.
- Schweisfurth H, Kurbjuhn H (2004) Epidemiologie und Ätiologie des Lungenkarzinoms. *Brandenburgisches Ärzteblatt* 4:126.
- Schwerdtle T, Baum M (2011) Arsen In: RÖMPP Online. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, RD-01-03320. <http://www.roempp.com>, Zugriff am 04. Januar 2012.
- 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.
- Shi H, Shi X, Liu KJ (2004) Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem.* 255(1-2):67-78.
- Sitzmann H, Blaß W (2011) Quecksilber In: RÖMPP Online. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York RD-17-00131. <http://www.roempp.com>, Zugriff am 05. Januar 2012.
- Strietzel R: Die Werkstoffkunde der Metall-Keramik-Systeme. Verlag Neuer Merkur GmbH, 2005, S. 40-41.
- Sugawara N, Lai YR, Sugawara 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.
- Thomas C: Grundlagen der klinischen Medizin: Atmungsorgane, Band 3. Schattauer Verlag, 1995, S. 6-8, S. 115.
- Tian X, Ma X, Qiao D, Ma A, Yan F, Huang X (2005) mCICR is required for As₂O₃-induced permeability transition pore opening and cytochrome c release from mitochondria. *Mol Cell Biochem.* 277(1-2):33-42.

Torky AR, Foth H: Quecksilber. In: Dunkelberg H, Gebel T, Hartwig A (Hrsg) Handbuch der Lebensmitteltoxikologie Band 2. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007, 803-850.

Unadkat J D, Wei X (2004) New Drug Development. Regulatory Paradigms for Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics. Edited by C. G. Sahajwalla. Informa Healthcare 2004, 6: 112-116.

UNEP (2011) Mercury in the Aquatic Environment: Sources, Releases, Transport and Monitoring. Division of Technology, Industry and Economics (DTIE) Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, pp. 7.

Umweltbundesamt (2009) Luft und Luftreinhaltung Feinstaub.
<http://www.umweltbundesamt.de/luft/schadstoffe/feinstaub.htm>, Zugriff am 24. Juni 2010.

Van der Deen M, GE de Vries E, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS (2005) ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respiratory Research* 6:59.

Vernhet L, Allain N, Bardiau C, Anger JP, Fardel O (2000) Differential sensitivities of MRP1-overexpressing lung tumor cells to cytotoxic metals. *Toxicology* 142:127–34.

Vernhet L, Allain N, Payen L, Anger JP, Guillouzo A, and Fardel O (2001) Resistance of human multidrug resistance-associated protein 1-overexpressing lung tumor cells to the anticancer drug arsenic trioxide. *Biochem Pharmacol* 61:1387–1391.

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-ribose)ylation in cultured human cells. *DNA Repair (Amst)* 6(1):61-70.

Wobus AM, Mertsching H: Zellkulturtechniken, Zellmodelle und Tissue Engineering. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg) Grundlagen der molekularen Medizin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007, S. 245-246, S. 258-261.

Wortelboer HM, Balvers MG, Usta M, van Bladeren PJ, Cnubben NH (2008) Glutathione-dependent interaction of heavy metal compounds with multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008 Jul, 26(1):102-8.

Wrba F, Dolznig H, Mannhalter C: Genetik verstehen: Grundlagen der molekularen Biologie. Band 8332 von Uni-Taschenbücher L. UTB Verlag, 2007, S. 144.

Zhang Y, Han H, Elmquist WF, Miller DW (2000) Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*. 876(1-2):148-53.

7 Thesen

1. In unbehandelten Kulturen von H322-Zellen zeigen MRP2, MRP4 und UMAT bei 100 % Konfluenz den höchsten mRNA-Gehalt, während MRP5 mit steigender Konfluenz induziert wird. MRP3 hingegen wird mit zunehmendem Wachstum der Zellen signifikant reprimiert.
2. Bei enger werdenden Wachstumsverhältnissen kommt es zu einer Induktion der Transporter MRP2, MRP4, MRP5 und UMAT. Die Ansammlung von unterschiedlichen Stoffwechselprodukten könnte eine Ursache für die gesteigerte Expression darstellen.
3. Unterschiedliche Konfluenzen (80 %, 100 % und 100 % plus 3 Tage) der H322-Zellkultur verändern die Expression der Gene MRP2-5 und UMAT. Daher ist eine strikte Kontrolle der Konfluenzen der Zellkulturen notwendig, um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und Artefakte zu vermeiden.
4. Der MTT-Assay mit Arsenit in Gegenwart von MK571 unterstützt die Hypothese, dass MRP-Transporter an der Elimination von Arsenit beteiligt sind.
5. Der Vitalitätstest mit MK571 mit Cu(II) zeigt keine Hinweise auf eine Mitwirkung der MRPs am Transport dieses Metalls.
6. Der MTT-Assay mit Hg(II) in Anwesenheit von MK571 liefert keine Hinweise darauf, dass MRP-Transporter an der Detoxifikation von Hg(II) beteiligt sind. Die Vitalitäten der über einen Zeitraum von 42 Tagen mit 2,5 und 5 μM Hg(II) behandelten H322-Zellen lassen bei Inkubation mit steigenden Dosen Hg(II) keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten Kulturen und demnach keine Anpassungsreaktion feststellen. Der Einfluss von MK571 nach einer 42 Tage langen Hg(II)-Inkubation zeigt ebenfalls keine Hinweise, dass die MRPs am Transport von Hg(II) beteiligt sind.

7. MRP3 wird bei 100 % Konfluenz durch 5 μM Arsenit signifikant induziert. Eine mögliche Beteiligung von MRP3 an der Elimination von Arsenit ist somit denkbar. MRP1, MRP2, MRP4, MRP5 und UMAT scheinen keinen Beitrag zum Transport von Arsenit zu leisten.
8. Sehr enge Wachstumsbedingungen (Konfluenz 100 % + 3 Tage) führen in Gegenwart von 2,5 und 5 μM Cu(II) zu einer signifikanten Induktion der Gene MRP4 und UMAT. Eine Mitwirkung dieser Proteine an der Detoxifikation von Cu(II) wäre daher denkbar.
9. Ab dem 7. Inkubationstag mit 5 μM Hg(II) sind in der Zellkultur zytoplasmatische Vesikel zu erkennen. Diese könnten für den Export von neu synthetisierten Proteinen zur Zellmembran oder zur Speicherung toxischer Substanzen fungieren.
10. Die gesteigerte Transkriptmenge des MRP1-Gens bei 2,5 μM Hg(II) in den Kulturen mit 100 % Konfluenz deutet auf einen möglichen Transport von Hg(II) durch dieses Protein hin. Dagegen scheinen MRP2-5 und UMAT nicht am Schutz der Zellen vor Hg(II) beteiligt zu sein.
11. Werden die H322-Zellen für 28 Tage mit Hg(II) behandelt und in einem subkonfluenten Stadium (80 % Konfluenz) geerntet, so scheint keines der untersuchten Gene an der Elimination von Hg(II) beteiligt zu sein. Die Inkubation mit Hg(II) ruft nach 28 Tagen eine signifikante Repression von MRP1-4 und UMAT hervor. Bei MRP5 zeigt sich nur am 14. Inkubationstag eine Repression in Gegenwart von 5 μM Hg(II).

8 Lebenslauf

Name: Annett Harders
Geburtsdatum: 04.02.1981
Geburtsort: Magdeburg

Schulausbildung

1987 bis 2000 Allgemeine Hochschulreife in Magdeburg
1997 bis 1998 Highschool in Indiana/USA

Studium

2000 bis 2002 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität
Magdeburg
2002 bis 2007 Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
10 2003 Vorphysikum
02 2005 Physikum
07-11 2007 Staatsexamen

Promotion

Seit 02 2006 am Institut für Umwelttoxikologie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Berufsweg

11 2008 bis 11 2009 Praxis Dr. Jan Reinecke in Bremen
12 2009 bis 05 2010 Praxis Dr. Stahlberg, Dr. Reiter & Partner in Bremen
seit 06 2010 Praxis Dr. Mittag & Partner in Bremen

Bremen, den

Annett Harders

9 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Annett Harders, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Annett Harders

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

„Ich, Annett Harders, versichere, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe.“

Annett Harders

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor allem *Frau Prof. Dr. Heidi Foth* für die freundliche Aufnahme am Institut für Umwelttoxikologie, für das interessante Forschungsthema und für die uneingeschränkte Unterstützung.

Ein herzlicher Dank geht an *Dr. Felix Glahn*, der mir von Anfang an stets zur Seite stand. Zudem hatte er immer ein offenes Ohr für meine vielen Fragen und Zeit für kreative Anregungen und Diskussionen. Ich bedanke mich auch für die gemeinsame Zeit beim wöchentlichen Zirkeltraining und den netten Abenden im Lokal oder mit einer Flasche Bier und einer DVD.

Danken möchte ich auch *Jan Wiese*, der mir im Labor über viele verzweifelte Momente hinweggeholfen hat. Bedanken möchte ich mich auch für die gemütliche und lustige Zeit beim morgendlichen Frühstück oder beim abendlichen Kochen.

Zudem danke ich herzlich *Dr. Felix Glahn* und *Jan Wiese* für die Durchsicht dieses Manuskripts.

Bedanken möchte ich mich bei den Technischen Assistentinnen *Tina Röder* und *Christel Trümpler* für die hilfreiche Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Allen Mitarbeitern der Umwelttoxikologie möchte ich für die familiäre und entspannte Atmosphäre danken. Hierbei möchte ich mich auch herzlich bei *Christine Regener*, *Irmgard Martin* und *Hartmut Auffahrt* bedanken. Die schöne Zeit, die ich dort verbringen durfte möchte ich auf keinen Fall missen.

Mein abschließender Dank gebührt meiner Familie, die mir immer großes Interesse und Verständnis in Bezug auf mein Studium und meine Dissertation entgegengebracht hatte.