

Modulation von *Multidrug resistance associated* Proteinen (MRP) durch Prostaglandine in humanen Lungenzellen

Dissertation

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

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

von Dipl. Biochemikerin Anja Rämisch
geb. am: 07.01.1977 in Dresden

Gutachter

- 1) Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauss
- 2) Prof. Dr. Michael Schwarz

Halle den 13.12.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000010196

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010196>]

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe	4
1.1. Zielsetzung	4
1.2. Grundlagen der Genese und Therapie von Lungenkrebs	5
1.2.1. Anatomie und <i>Clearance</i> Mechanismen der Lunge.....	5
1.2.2. Lungenkrebs	6
1.3. Die ABC-Transporterfamilie der <i>Multidrug resistance associated</i> Proteine (MRP)....	10
1.3.1. Charakterisierung und Struktur der ABC-Transporter.....	10
1.3.2. Klassifizierung der MRP	10
1.3.3. Substratspektren und Verteilung verschiedener MRP-Isoformen.....	11
1.4. Prostaglandine	14
1.4.1. Prostaglandine und ihre Biosynthese	14
1.4.2. Wirkung von Prostaglandinen.....	15
1.5. EGF und EGFR: Aufbau, Funktion und Signalkaskade	17
1.5.1. EGF Aufbau und Funktion.....	17
1.5.2. Die Familie der EGF-Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege.....	19
2. Chemikalien, Material, Geräte	21
2.1. Chemikalien	21
2.2. Material	23
2.3. Geräte	24
3. Methoden.....	26
3.1. Zellkultur	26
3.2. Vitalitätstest: MTT- Assay	27
3.3. Apoptose-Messung.....	28
3.4. RNA-Isolation und RT-real- time- PCR	28
3.5. Proteinisolation und Western Blot	31
3.6. Immunzytochemischer Nachweis von Prostaglandin E2-Rezeptoren in Lungenzellkulturen.....	33
3.7. Transport-Aktivität von MRP1	34
3.8. Immunzytochemische Charakterisierung von Primärkulturen der Lunge	35
3.9. Statistische Auswerteverfahren	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Zellkulturen und Grundexpression der MRP-Proteine.....	36
4.1.1. Primärzellkulturen der Lunge und Patienteninformation.....	36
4.1.2. Die mRNA-Grundexpression verschiedener MRP-Isoformen in humanen Lungenzellen in Kultur.....	45
4.2. Einfluss von Prostaglandin E2 auf humane Lungenzellen.....	48

4.2.1. Vitalitätstest nach Behandlung mit Prostaglandin E2	48
4.2.2. Einfluss von Prostaglandin E2 auf die mRNA-Expression verschiedener MRP-Isoformen	49
4.2.3. MRP1-Transportaktivität in humanen Lungenzellen nach Behandlung mit Prostaglandin E2	53
4.2.4. Vorkommen und Lokalisation der Prostaglandin E2 Rezeptoren EP1, EP2, EP3 und EP4	54
4.2.5. Untersuchung der Auswirkungen von Prostaglandin E2 auf die Cadmium-Toxizität in Bronchialepithelzellen.....	60
4.3. Einfluss von Prostaglandin F2 α auf humane Lungenzellen in Kultur	61
4.3.1. Vitalitätstest nach Behandlung mit Prostaglandin F2 α	61
4.3.2. Einfluss von Prostaglandin F2 α auf die mRNA-Expression verschiedener MRP-Isoformen	62
4.3.3. Transportaktivität in Prostaglandin F2 α behandelten Lungenzellen	65
4.4. Einfluss des Wachstumsfaktors EGF auf MRP und verschiedene Zellparameter	66
4.4.1. Grundexpression des EGFR in Lungengewebe und Primärkultur	66
4.4.2. Einfluss von EGF auf die Vitalität humaner Lungenzellen in Kultur.....	67
4.4.3. EGF moduliert den HGF-Rezeptor c-met	69
4.4.4. Cadmiumtoxizität und EGF	69
4.4.5. Einfluss von EGF auf die mRNA- Expression verschiedener MRP- Isoformen ...	70
5. Diskussion	72
5.1. Belastung der Lunge durch umweltbedingte Schadstoffe.....	72
5.2. Chemotherapieresistenzen bei Lungentumoren	74
5.3. Einfluss von Prostaglandinen auf die Zellvitalität und die Regulation der Expression von MRP1 und MRP3-MRP5 durch Prostaglandine	77
5.4. Prostaglandin E2 und Cadmiumtoxizität.....	84
5.5. Grundexpression der Prostaglandin E2 Rezeptoren in den humanen Lungenzellkulturen	87
5.6. EGF: Einfluss auf die Lungenzellkultur und auf die MRP-Expression	92
5.6. Vorteile im Umgang mit Primärkulturen zur permanenten Zellkultur.....	94
6. Zusammenfassung.....	96
7. Referenzen.....	98
Anhang	111

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

1.1. Zielsetzung

Lungenkrebs gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen in der Welt. Er steht in der Krebssterblichkeit an erster Stelle. Ein wesentlicher limitierender Faktor für die Behandlungserfolge ist die Ausbildung von Chemotherapieresistenzen.

Neben dem sogenannten P-Glycoprotein wurde ein weiteres Transportprotein durch Cole et al. im Jahr 1993 identifiziert, das an Chemotherapieresistenzen beteiligt ist. Beide Proteine gehören zur Familie der ABC (*ATP-binding-cassette*)-Transporter, welche unter ATP-Hydrolyse den aktiven Transport von Xenobiotika und Stoffwechselprodukten über die Zellmembran ermöglichen. Die MRP-Proteine sind organische Anionen-Transporter, welche organische Anionen oder Substanzen in Konjugation mit Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfat über die Zellmembran in den extrazellulären Raum transportieren. In der Zwischenzeit sind 9 Isoformen des Transporters bekannt [Haimeur et al., 2004].

In vielen Lungenkrebstumoren ist die induzierbare Form der Cyclooxygenase (COX II) erhöht [Riedl et al 2004]. Die Erhöhung des am Arachidonsäure-Stoffwechsel beteiligten Enzyms, fördert die Bildung inflammatorisch wichtiger Faktoren, wie Prostaglandine und Leukotriene sowie Thromboxane, welche hauptsächlich für die Blutplättchenaggregation verantwortlich sind. Hohe Konzentrationen an Prostaglandin E₂ wurden in COX II überexprimierenden Zellen gefunden [Huang et al., 1998]. Ebenso zeigten Fibroblasten der humanen Lunge eine erhöhte Prostaglandin E₂ Produktion nach Induktion der COX II durch Interleukin 1 β [Cruz-Gervis et al., 2002]. Die COX II Überexpression fördert Tumorpheriferation, Angiogenese, Invasion und Resistenzen gegenüber Apoptose [Riedl et al., 2004].

Untersuchungen in Rattenhepatozyten zeigten einen Einfluss von Prostaglandin E₂ und F₂ α auf die Expression des P-Glycoproteins [Ziemann et al., 2002]. Deshalb sollten in dieser Arbeit der Einfluss von Prostaglandin E₂ und F₂ α als Entzündungsmediatoren auf die verschiedenen Isoformen von MRP1, MRP3, MRP4 und MRP5 auf transkriptioneller Ebene und auf funktioneller Ebene bei MRP1 in humanen Lungenzellen untersucht werden. Um eventuelle Unterschiede zwischen Primärkulturen der Lunge (periphere Lungenzellen und Bronchialepithelzellen) und der permanenten Tumorzelllinie A549 zu erklären, sollen die verschiedenen membranständigen Prostaglandin E₂-Rezeptoren EP1-4 auf deren Lokalisation und Menge untersucht werden.

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

Für die Untersuchungen sollen primäre Zellkulturen und die Permanentzelllinie A549 untersucht werden, da Primärkulturen näher an die *in vivo*- Situation angepasst sind und interindividuelle Unterschiede der Patienten die Reaktionen beeinflussen können.

1.2. Grundlagen der Genese und Therapie von Lungenkrebs

1.2.1. Anatomie und *Clearance* Mechanismen der Lunge

Die Lunge kann man funktionell in 2 verschiedene Abschnitte unterteilen, zum einen in den gasleitenden Abschnitt (tracheobronchialer Bereich), zu dem die Trachea, die Hauptbronchien, Bronchien und terminalen Bronchioli gehören und zum anderen in den Abschnitt des Gasaustausches (pulmonaler Bereich), zu dem die respiratorischen Bronchiolen und die Alveolen gehören. Beim Menschen ist der rechte Lungenflügel mit 3 Lungenlappen etwas größer als der linke Lungenflügel mit 2 Lungenlappen. Die innere Oberfläche der Bronchien ist mit einem Epithel aus Zilien tragenden Zellen, Gobletzellen (Becherzellen), serösen Zellen, Basalzellen und Surfactant sezernierenden nicht Zilien tragenden Clarazellen ausgekleidet. In geringem Maße sind neuroendokrine Zellen und Bürstenzellen vorhanden. Die Oberfläche der Alveolen wird von 2 Zellarten bedeckt: den Pneumozyten Typ 1 (dünne Zellen, 90% der Oberfläche) und den Pneumozyten Typ 2 (Zellen mit granulären Einschlüssen mit Surfactant). Durch Surfactant wird die Oberflächenspannung in den Alveolen reduziert. Die Alveolen bilden mit ca. 100m² eine sehr große Angriffsfläche für ankommende Gase und somit einen entscheidenden Angriffspunkt für inhalierte Lungenschadstoffe [Muhle et al., 2004]. Neben den Pneumozyten spielen auch Makrophagen im Alveolarbereich eine wichtige Rolle. Sie spielen eine wesentliche Rolle in der Entfernung partikelgetragener Schadstoffe sowie in der Immunabwehr.

Da die Lunge als Eintrittsorgan neben Gasen, luftgetragenen Schadstoffen und Partikeln auch infektiösen Erregern ausgesetzt ist, gibt es verschiedene Schutzsysteme in der Lunge, die hauptsächlich in den gasleitenden Systemen zu finden sind. Man spricht hier von einer mucoziliären Reinigung. Die Gobletzellen sezernieren im tracheobronchialen Bereich Mucus, der Partikel, Stäube und infektiöse Erreger abfängt. Durch den gerichteten Zilienschlag des Flimmerepithels wird der Mucus Richtung Kehlkopf transportiert und durch Husten oder Verschlucken aus der Lunge entfernt. Meist werden Partikel sowie auch Infektionserreger durch Phagozytose in Macrophagen eingeschlossen und über den ziliären Transport im Mucus aus der Lunge entfernt.

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

Bei Rauchern, wie auch bei chronischer Bronchitis können die Zilien in den Atemwegen zerstört werden. Dies führt zur verlängerten Verweildauer von Schadstoffen in der Lunge und kann somit zu einem erhöhten toxischen Potential von Xenobiotika führen. In Richtung gasaustauschendem System nehmen sowohl das Zilien tragende Flimmerepithel, wie auch die Becherzellen ab. In den terminalen Bronchien sind keine Zilien mehr zu finden, da auch große Anteile von Stäuben und Partikeln durch die Schutzmechanismen der oberen Atemwege sowie aufgrund ihrer Größe nicht mehr in die unteren Atemwege gelangen.

Die Mucusproduktion im alveolären Bereich wäre aufgrund der Funktion des Gasaustausches hinderlich. In den alveolären Bereichen erlangt die Reinigung mittels Makrophagen vermittelter Phagozytose erhebliche Bedeutung. Im Gegensatz zum mucozilären Transport läuft die Phagozytose bedeutend langsamer ab. Auch können Partikel ins Interstitium wandern und in lungenassoziierte Lymphknoten abwandern [Muhle et al., 2004].

Aufgrund neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der Partikelexposition rückt die toxikologische Bedeutung von Feinstäuben gerade für die Lunge in das öffentliche Interesse. Aufgrund großer Oberflächen bei kleinem Volumen lagern sich toxische Fremdstoffe wie polyaromatische Kohlenwasserstoffe, Schwermetalle aber auch Säuren auf Stäuben als Carrier ab und können so in die Lungen gelangen. Die Partikel lagern sich in verschiedenen Bereichen der Lunge ab. Durch Impaktion (Aufprall) werden Partikel mit einer Größe von $>5\mu\text{m}$ an Bronchialverzweigungen abgelagert. Von Sedimentation spricht man bei Partikeln mit einer Größe zwischen $0,5$ und $5\mu\text{m}$, da sie sich aufgrund der verringerten Geschwindigkeit des Aerosols in tieferen Bereichen der Atemwege festsetzen. Besonders Ultrafeinstaub, der mit Größen unter $1\mu\text{m}$ definiert ist, kann bis in die Alveolarbereiche eindringen. Hierbei spricht man von Diffusion [Muhle et al., 2004]. Die aufgelagerten Fremdstoffe können Entzündungen (Bsp. Schwermetalle, Cadmium) hervorrufen oder Mutationen (Bsp. PAK, Cadmium) auslösen, die wiederum an der Lungenkrebsentstehung beteiligt sein können.

1.2.2. Lungenkrebs

1.2.2.1. Statistische Daten zu malignen Lungentumoren

Nach Aussagen des Robert-Koch-Institut [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland, 2004] erkrankten im Jahr 2000 ca. 31800 Männer (16% aller Krebsneuerkrankungen) und 10400 Frauen (5,4% aller Krebsneuerkrankungen) an Lungenkrebs. Das Verhältnis zwischen Frauen und Männern liegt in Deutschland damit bei 75% Männer zu 25% Frauen. Damit steht Lungenkrebs sowohl bei Männern, wie auch bei

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

Frauen an dritter Stelle in der prozentualen Anzahl an Neuerkrankungen in Deutschland [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland, 2004]. Im EU-Vergleich liegt Deutschland in der Inzidenz von Lungenkrebs im mittleren Bereich. Die höchste Erkrankungsrate bei Männern zeigt Belgien, bei Frauen Dänemark. Die wenigsten Neuerkrankungen zeigen die Länder Schweden (Männer) und Spanien (Frauen) [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland, 2004]. Auffallend ist der steigende Trend der Neuerkrankungen bei Frauen. Dieser Trend ist vermutlich auf gesteigertes Rauchverhalten bei Frauen zurückzuführen. Ebenso wurde beobachtet, dass weibliche Patienten im Durchschnitt schon bei geringerem Zigarettenkonsum und höherem Einstiegsalter im Vergleich zu Männern an Lungenkrebs erkranken. Eine mögliche Ursache wird in einer erhöhten CYP1A1-Expression in der Lunge gesehen. Das CYP1A1 Enzym ist für die Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen verantwortlich. Dieses Enzym wird durch den Estradiol- Metabolismus beeinflusst [Pauk et al., 2005]. Eine erhöhte CYP1A1 Expression konnte in tumorfreien Geweben bei weiblichen Rauchern mit Lungenkrebs beobachtet werden. Diese Erhöhung war korreliert mit erhöhten DNA-Addukten [Mollerup et al., 1999]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Frauen und Männern zwischen 67 und 68 Jahren [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland, 2004].

Lungenkrebs steht an erster Stelle in der Krebssterblichkeit. Es ist das am weitesten verbreitete Karzinom mit schlechter Behandlungsprognose [Pauk et al., 2005]. Ein Grund der geringen Behandlungserfolge wird in der oftmals späten Diagnose aufgrund des späten Auftretens von Symptomen gesehen [Nowak et al., 2005]. Durch die Spätdiagnose werden aufgrund der hohen Metastasierungsrate von kleinzelligen und nichtkleinzelligen Karzinomen Behandlungskonzepte schwierig. In Deutschland liegt der Anteil an Krebstoten durch Lungenkrebs bei 26,8% für Männer und für Frauen bei 9,8%. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Männern bei 13%, ähnlich bei Frauen mit 14% [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland, 2004].

1.2.2.2. Risikofaktoren

Wie in kaum einer anderen malignen Tumorform sind die krebsauslösenden Faktoren so gut bekannt wie bei Lungenkrebs. Dabei steht das Rauchen an erster Stelle. Bei Männern sind bzw. waren bis zu 90% der Lungenkrebserkrankten Raucher, bei Frauen ca. 60% [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland, 2004]. Auch

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

korreliert das Erkrankungsrisiko mit der Dauer des Rauchens, der Inhalationstiefe sowie der Menge gerauchter Zigaretten pro Tag [Pauk et al., 2005].

Ein erhöhtes Risiko konnte für Verwandte ersten Grades Lungenkrebs erkrankter Patienten bezogen auf Raucher-abhängige Krebsarten und Lungenkrebs [Etzel et al., 2003] beobachtet werden. Damit ist eine genetische Veranlagung für Lungenkrebserkrankungen nicht auszuschließen. Jedoch ist diese Veranlagung anscheinend an das Rauchverhalten geknüpft.

Andere berufsbedingte Einflüsse, wie wasserlösliche Nickel- [Grimsrud et al., 2005], Arsen-, Asbest-, Chrom-Verbindungen, PAK, silikogene Stäube und Uran [Nowak et al., 2005] haben einen Einfluss auf die Lungenkrebsentwicklung. Aufgrund strengerer Kontrollen und strikter Regulierung ist der Einfluss auf die Lungenkrebsentstehung zurückgegangen. Auch Radonbelastung in Häusern und Wohnungen stellt ein erhöhtes Risiko dar. [Lubin et al., 1997]. Radon entsteht beim natürlichen Zerfall von Uranium-238. Während die Konzentrationen in der Umwelt gering sind, kommt es zur Anreicherung in Häusern und Wohnungen. Besonders gefährdet sind Gegenden mit Uranminen [Darby et al., 2004].

Es wurde der Einfluss früherer Lungenerkrankungen in Bezug auf das Lungenkrebsrisiko untersucht [Littman et al., 2004]. Dabei konnte ein leicht erhöhtes Risiko für Patienten mit chronischer Bronchitis oder Emphysemen beobachtet werden. Die erhöhte COX II Expression in vielen Lungentumoren [Riedl et al., 2004], welche verschiedene Faktoren der Krebsentstehung wie Angiogenese, Invasion und Proliferation beeinflusst, liefert Anhaltspunkte für die Beteiligung von Entzündungsreaktionen an der Entstehung von Lungenkrebs.

1.2.2.3. Klassifikation und Behandlungsmethoden

Die Behandlung verschiedener Bronchialkarzinome unterscheidet sich nach den verschiedenen Klassifikationen (Abb.1). Der häufigste auftretende Tumor ist das nichtkleinzellige Karzinom mit ca. 80% Anteil an Bronchialkarzinomen. Dabei wird zwischen Plattenepithel-, Adeno- und großzelligem Karzinom unterschieden. Im Auftreten der verschiedenen Untertypen gibt es Geschlechts- und Rauchgewohnheitsunterschiede. Während bei Frauen das Adenokarzinom überwiegt, steht bei Männern vor allem das Plattenepithelkarzinom im Vordergrund [Seeber et al., 1995]. Bei Nichtrauchern tritt überwiegend das Adenokarzinom auf [Pauk et al., 2005]. In Abhängigkeit von Größe und Infiltrationsgrad werden verschiedene Behandlungsmethoden angewandt. Die Methode der Wahl bei geringer Größe und niedriger Infiltration wird in der operativen Entfernung des betroffenen Lungenlappens gesehen. Hinzu kommt der Einsatz von Radiotherapie (bei Lymphknotenbefall) und Chemotherapie (bei Fernmetastasen).

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

Das kleinzellige Karzinom ist das seltenere Bronchialkarzinom mit jedoch schlechteren Überlebensraten. Die morphologische Klassifikation der *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) ergibt eine Einteilung in 3 Subtypen: 1) kleinzellig ohne Nachweis nichtkleinzelliger Anteile; 2) kleinzellig mit großzelligem Anteil; 3) kleinzellig mit Adeno- und/oder Plattenepithelkarzinomanteil. Dabei ist zu beachten, dass die gemischtzellige Variante eine ungünstigere Prognose aufweist als die kleinzellige Version [Seeber et al., 1995].

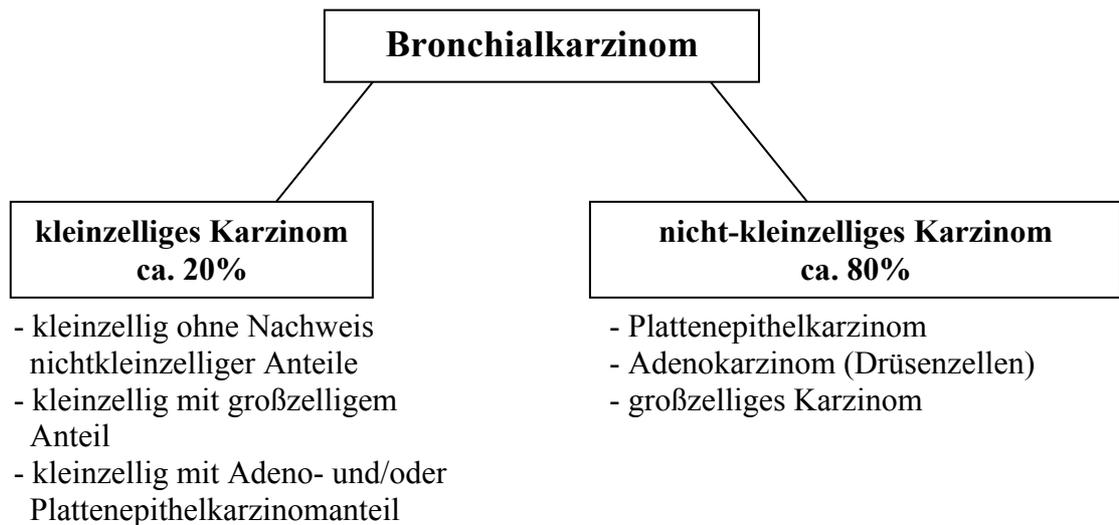


Abbildung 1: morphologische Klassifikation des Bronchialkarzinoms

Die meisten Tumore des SCLC werden aufgrund der hohen Metastasierungsrate mittels Polychemotherapie behandelt. Standardtherapien sind zum Beispiel Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin oder Cisplatin/Etoposid über 4-6 Zyklen. Die Erhaltungstherapie führte bei Patienten hierbei zwar zu einer Verlängerung der progressionsfreien Zeit nicht jedoch der Überlebenszeit, und wird deshalb kaum in Betracht gezogen [Seeber et al., 1995]. Strahlentherapeutische Ansätze werden zusätzlich bei Fernmetastasen im Gehirn angewandt [Seeber et al., 1995]. Bei sehr geringer Tumorausbreitung und bei erfolgreicher Chemotherapie werden operative Eingriffe zur Entfernung des Tumors vermehrt eingesetzt. Oft werden Therapieerfolge durch die Ausbildung primärer und sekundärer Resistenzen behindert. Hierbei spielen Transportmechanismen aus der Zelle eine wichtige Rolle.

1.3. Die ABC-Transporterfamilie der *Multidrug resistance associated* Proteine (MRP)

1.3.1. Charakterisierung und Struktur der ABC-Transporter

Für viele große oder auch hydrophile Moleküle stellen biologische Membranen ein Hindernis dar. Zum Schutz der Zelle, aber auch zum Transport biologisch wichtiger Botenstoffe, gibt es eine Vielzahl an Transportproteinen, die aufgrund ihrer Funktionsweise unterschieden werden. Man unterscheidet diese Transportproteine in Kanäle (Membran durchspannende Poore) und Carrier (Transport durch Konformationsänderung). Die ABC-Transporter (*ATP-Binding Cassette*) gehören zur Gruppe der Carrier. Sie benutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse zum Transport verschiedener Substrate, ohne phosphoryliert zu werden [Dean et al., 2001].

Die ATP-Bindungsstelle ist bei den ABC-Transportern hoch konserviert. Die Nukleotidbindedomäne weist 3 charakteristische Sequenzmotive auf. Das Walker A- und Walker B-Motiv und dazwischen ein charakteristisches C-Motiv (Abb. 2). Das funktionelle Transportprotein umfasst in der Regel 2 Nukleotidbindestellen und 2 bis 3 Transmembrandomänen bestehend aus 5 bis 6 α -Helices [Haimeur et al., 2004].

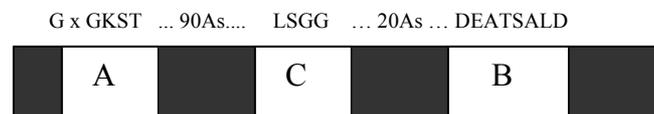


Abbildung 2: Struktur der Nukleotidbindedomäne in ABC-Transportern: A) Walker A-Motiv; B) Walker B-Motiv; C) C-Motiv [nach Dean et al., 2001]

1.3.2. Klassifizierung der MRP

Die Beteiligung von Transportvorgängen an der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Medikamententherapien rückte in den Vordergrund mit der Entdeckung des P-Glycoproteins [Juliano et al., 1976]. Cole et al. identifizierten 1992 im Zusammenhang mit multidrug-resistenten Zellen einen weiteren Efflux-Transporter, das MRP (*multidrug resistance associated protein*). Inzwischen sind 9 verschiedene Isoformen des Proteins mit unterschiedlichen aber teilweise überlappenden Substratspektren bekannt [Haimeur et al., 2005].

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

Aufgrund von Sequenzhomologien werden die MRP in die Familie der ABCC-Transporter eingegliedert (Abb. 3A). Diese Familie enthält bis heute 13 Proteine. Davon werden 4 Mitglieder nicht mit Medikamentenresistenzen in Verbindung gebracht: ABCC7 (cAMP regulierter Chloridkanal); ABCC8 (SUR1, Zelloberflächenrezeptor); ABCC9 (SUR2, Zelloberflächenrezeptor) und ABCC13 (Funktion unbekannt) [Haimeur et al., 2004].

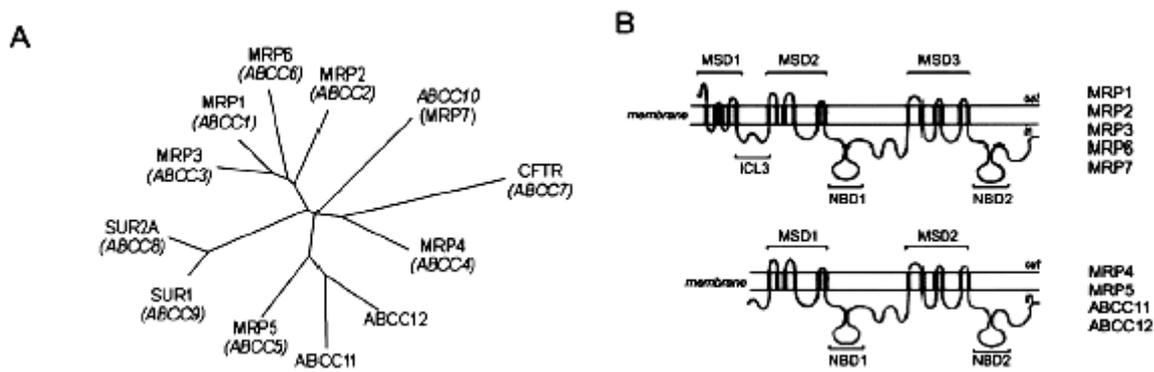


Abbildung 3: A) Sequenzhomologien der ABCC-Familie untereinander; B) strukturelle Unterschiede der verschiedenen MRP- Isoformen [Haimeur et al 2005]

Die verschiedenen MRP- Isoformen teilt man in 2 strukturell unterschiedliche Gruppen (Abb. 3B): 1) bestehend aus 3 Transmembrandomänen und 2 Nukleotidbindedomänen mit MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 und MRP7

2) bestehend aus 2 Transmembrandomänen und 2 Nukleotidbindedomänen mit MRP4, MRP5, MRP8 (ABCC11) und MRP9 (ABCC12) [Haimeur et al., 2004]

Untersuchungen an veränderten MRP1-Proteinen ergaben, dass die erste Transmembrandomäne nicht für die Transportaktivität benötigt wird [Borst et al., 2000].

1.3.3. Substratspektren und Verteilung verschiedener MRP-Isoformen

MRP's sind Transporter von organischen Anionen. Sie können ihre Substrate selbst oder in Konjugation mit Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfat transportieren. Für Glutathion (Abb. 4) ist außerdem ein Cotransport von den Substraten Vinchristin und Daunorubizin mit Glutathion beschrieben [Borst et al., 2000].

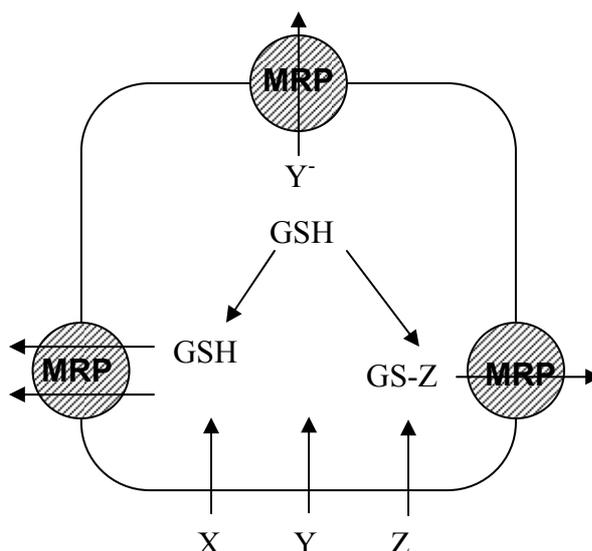


Abbildung 4: Transportmöglichkeiten für MRP-Substrate mit Hilfe von Glutathion (modifiziert nach Borst et al., 2000)

In dieser Arbeit wurde die Expression der Transporter MRP1, MRP3, MRP4 und MRP5 untersucht. Daher soll im Folgenden der Kenntnisstand zur Funktion dieser Isoformen zusammengefasst werden.

MRP1 ist in vielen Geweben des Menschen, wie Lunge, Testis, Niere und im Blut exprimiert. In der Lunge wurde MRP1 in den Alveolar-Makrophagen, im Bronchialepithel und in hyperplastisch reaktiven Typ II Pneumozyten gefunden. In normalen Pneumozyten Typ I und II konnte nur eine niedrige Konzentration beziehungsweise kein MRP1 nachgewiesen werden [Haimeur et al., 2004]. MRP1 ist eine bevorzugte Glutathion-S-Konjugat-Pumpe. Diesem Protein wird eine hohe Beteiligung an Therapeutika-Resistenzen zugeschrieben. So zum Beispiel sind Cisplatin [Maeda et al., 2004], Vincristine, Doxorubicin, Etoposid [Young et al., 2001; O'Connor et al., 2004] oder Arsenit und Methotrexat [Borst et al., 2000] sowie Arsentrioxid [Takeshita et al., 2003] Substrate von MRP1. Im Metabolismus wird eine Beteiligung am Bilirubin-Transport angenommen [Cekic et al., 2003]. Ebenso wird er als Leukotrientransporter beschrieben [Haimeur et al., 2004]. Paumi et al. (2003) beschrieben eine verringerte Zytotoxizität von 15 deoxy- $\Delta^{12,14}$ Prostaglandin J₂ in MRP1 überexprimierenden Zellen.

MRP3 ist hauptsächlich im Dünndarm, Pankreas, Dickdarm und adrenalen Cortex exprimiert. Geringere Konzentrationen wurden in der Leber, der Niere und in der Prostata gefunden [Haimeur et al., 2004]. In einigen Tumorarten, wie myeloide Leukämie [Steinbach et al., 2003], in Tumoren der Blase und der Eierstöcke [Haimeur et al., 2004] aber auch in Tumoren der Lunge [Hsia et al., 2002; Young et al., 2001] ist MRP3 nachweisbar. MRP3 transportiert

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

vorwiegend organische Anionen wie Etoposid und Tenoposid aber auch deren Glucuronsäure-Konjugate [Haimeur et al., 2004]. Eine Beteiligung am physiologischen Transport von Gallensäuresalzen wird diskutiert [Inokuchi et al., 2001, Borst et al., 2000]. Paumi et al. (2003) beschrieben ebenso wie für MRP1 eine Beteiligung von MRP3 beim Transport von 15 deoxy- $\Delta^{12,14}$ Prostaglandin J₂.

Die höchsten Konzentrationen an MRP4 mRNA wurden in der Prostata gefunden. In moderaten Konzentrationen konnte MRP4 auch in Lunge, Nebennieren, Eierstöcken, Testis, Pankreas und Dünndarm nachgewiesen werden [Haimeur et al., 2004]. MRP4 wurde als Transporter zyklischer Nukleotide (cAMP und cGMP) und anderer Nukleotidanaloga beschrieben. MRP4 zeigte jedoch eine geringe Affinität für cAMP und cGMP in MRP4 transfizierten HEK293 Zellen, ohne den intrazellulären Gehalt der zyklischen Nukleotidmonophosphate zu verringern, und fungiert wahrscheinlich als cAMP- und cGMP-Überschusspumpe [Wielinga et al., 2003]. Andere Nukleotidanaloga, wie die antiviralen Medikamente 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)Adenin (PMAE) oder Azidothymidin-Monophosphat, werden als Substrat von MRP4 aus den Zellen transportiert [Borst et al., 2000]. Savaraj et al. (2003) beschrieb eine Überexpression von mutiertem MRP4 in der Cisplatin resistenten SCLC-Zelllinie. Die Beteiligung von MRP4 am Prostaglandinefflux wurde erstmals 2003 beschrieben [Reid et al.]. Ebenso wie MRP1 und MRP3 transportiert MRP4 Methotrexat. Die Affinität des Transporters zu GSH scheint gering zu sein [Haimeur et al., 2004]. Bai et al. (2004) zeigten jedoch den Efflux von Biman-Glutathion durch MRP4. Eine signifikante Rolle bei Xenobiotika-Resistenzen konnte bisher nicht nachgewiesen werden, aber sie wird aufgrund des Substratspektrums nicht ausgeschlossen [Kool et al., 1997].

Wie MRP4 wurde auch MRP5 als Transporter für cGMP und cAMP identifiziert [Wielinga et al., 2003]. Im Gegenteil zu MRP4 scheint MRP5 jedoch GSH und Glutathion-Konjugate zu transportieren. Ein Transport von Methotrexat konnte nicht nachgewiesen werden [Haimeur et al., 2004]. Mc Aleer et al. (1999) beschrieben eine Resistenz gegenüber Cadmiumchlorid in MRP5 überexprimierenden humanen embryonalen Nierenzellen. Eine klinische Relevanz von MRP5 in Beteiligungen an Therapieresistenzen konnte bisher noch nicht gezeigt werden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Wie MRP1 scheint MRP5 ubiquitär im Organismus verteilt zu sein. Die höchsten Konzentrationen waren jedoch in der Skelettmuskulatur im Herzen und in Teilen des Gehirns nachweisbar [Haimeur et al., 2004].

1.4. Prostaglandine

1.4.1. Prostaglandine und ihre Biosynthese

Prostaglandine gehören zur Gruppe der Eicosanoide und werden von den meisten Zellen im menschlichen Organismus gebildet. Sie wirken als autokrine und parakrine Lipidmediatoren. Neben den Thromboxanen und Leukotrienen werden Prostaglandine aus der C20 omega-6 ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure (Prostaglandin 2 Serien) bzw. anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie z. B. 8,11,14-Eicosatriensäure oder 5,8,11,,14,17 Eicosapentaensäure (Prostaglandin 1 und 3 Serien, die Zahlen stehen für die Anzahl an Doppelbindungen) gebildet [Fort et al., 1996].

Arachidonsäure wird in einer Phospholipase A2 abhängigen Reaktion aus Phospholipiden freigesetzt. Das Schlüsselenzym dieser Reaktion ist die sogenannte zytosolische Phospholipase 2 (cPLA₂). Zellen, die dieses Schlüsselenzym nicht besitzen, können keine Eicosanoid-Synthese betreiben [Funk CD 2001]. Die Freisetzung der Arachidonsäure begrenzt die Geschwindigkeit der Prostaglandinbiosynthese [Forth et al., 1996].

Die Arachidonsäure wird am ER und der nuklearen Membran an die Prostaglandin H Synthase, der sogenannten Cyclooxygenase übergeben. Die Reaktion zum Prostaglandin H₂ erfolgt in 2 Teilreaktionen. Im ersten Schritt, der sogenannten Cyclooxygenase Reaktion, wird unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und mittels Ringschluss das Prostaglandin G₂ gebildet. In der zweiten Reaktion wird die Peroxidgruppe der aliphatischen Seitenkette durch eine Hydroxylgruppe (PGH₂) ersetzt. In dieser Reaktion wird ein Ko-Substrat oxidiert. Die Cyclooxygenase II kann Tabakrauchkarzinogene aktivieren, wie zum Beispiel die Umsetzung von Benz[a]pyren-7,8-dihydrodiol zum Benz[a]pyrendiol Epoxid [Riedl et al., 2004]. Es werden 2 Formen der Cyclooxygenasen unterschieden, die konstitutiv exprimierte COX I und die induzierbare Form der COX II [Kam et al., 2000]. Während COX I hauptsächlich für normale physiologische Reaktionen, zum Beispiel für vaskuläre Homöostase, gastrische Funktionen, Blutplättchenaggregation und Nierenfunktion verantwortlich ist, spielt die COX II eine wesentliche Rolle in inflammatorischen Prozessen. Induziert werden kann die COX II durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, bakterielle Lipopolysaccharide oder auch Phorbolster [Kam et al., 2000].

Viele entzündungshemmende Medikamente greifen vor allem in den ersten Schritt der Cyclooxygenasereaktion ein. Diese Substanzen werden im allgemeinen als nichtsteroidale

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

anti-inflammatorische Medikamente bezeichnet. Zu dieser Gruppe gehören Arzneimittel wie Aspirin, Indomethazin oder Ibuprofen.

Aus Prostaglandin H₂ werden durch Isomerisierung Prostaglandin D₂, Prostaglandin E₂, Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) und Thromboxan A₂ gebildet. Die hierfür verantwortlichen Isomerasen sind: PGH₂-PGD₂-Isomerase, PGH₂-PGE₂-Isomerase, Thromboxansynthase, Prostacyclinsynthase. Aus Prostaglandin D₂ und E₂ wird mittels Reduktasen Prostaglandin F₂α synthetisiert. Während die COX-Enzyme in fast allen Geweben vorkommen, sind die Prostaglandin- und Thromboxansynthasen gewebspezifisch. Die Thromboxansynthase befindet sich in Blutplättchen und Makrophagen. Die Prostaglandin I-Synthase ist in Endothelzellen exprimiert. Die PGF-Synthase befindet sich hauptsächlich im Uterus, während die PGD-Synthasen im Gehirn und in Mastzelle zu finden sind. Die Prostaglandin E-Synthese findet in Mikrosomen fast aller Gewebe statt [Funk et al., 2001]. Daraus folgt, dass vor allem Prostaglandin I, Thromboxan und die Prostaglandine der E-Serie für die Lunge eine Rolle spielen.

1.4.2. Wirkung von Prostaglandinen

Prostaglandine erfüllen in verschiedenen Organen eine Vielzahl an physiologischen Funktionen, so dass der therapeutische Einsatz mit Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Auslösen von Fieber verbunden ist [Forth et al., 1996]. Ein Beispiel für medizinische Anwendung liegt im Auslösen von Wehentätigkeit durch Prostaglandin F₂α. Die verschiedenen Wirkungen der Prostaglandine soll kurz an den unterschiedlichen Angriffspunkten des Organismus erläutert werden.

Im Kreislauf haben Prostaglandin E₂, E₁ und I₂ gefäßerweiternde Wirkung. Sie zeigen bei Mäusen eine Blutdruck senkende Wirkung. Die Vorstufen Prostaglandin G und H₂ wirken aufgrund ihrer Affinität zum Thromboxan A₂-Rezeptor vasokonstriktiv. Im Zusammenwirken von Thromboxan A₂ und den Prostaglandinen der I und F-Serie wird ein entscheidender Mechanismus in der vaskulären Homöostase gesehen [Forth et al., 1996].

In Thrombozyten haben Prostaglandin E₁, I₂ und D₂ eine hemmende Wirkung auf die Blutplättchenaggregation durch Formveränderung, Adhäsion und Degranulierung. Prostaglandin E₂ wirkt in physiologischen Konzentrationen aktivierend auf die Thrombozytenaggregation, in hohen Dosen jedoch hemmend. Prostaglandin F₂α zeigt keinen Effekt. Der entscheidende Faktor zur Stimulierung der Blutplättchenaggregation ist Thromboxan A₂ [Forth et al., 1996].

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

In den Nieren wird der renale Blutfluss sowie die Diurese durch Prostaglandin I₂, E₂ und D₂ gefördert. Hierbei wirken die Prostaglandine stimulierend auf die Reninausschüttung sowie hemmend auf das antidiuretische Hormon (ADH) [Forth et al., 1996].

Den Prostaglandinen wird auch bei der Regulation der Kontraktion glatter Muskulatur eine Funktion zugesprochen. Auch hier wirken verschiedene Prostaglandine antagonistisch zueinander und in verschiedenen Organen unterschiedlich. So haben Prostaglandine der E und F-Serie einen kontraktilen Effekt auf die Muskulatur des Darmes. In der Ringmuskulatur wirkt Prostaglandin E₂ eher relaxierend, während F₂α kontraktil wirkt [Heller et al., 1998]. Auch in der Bronchial- und Trachealmuskulatur werden den Prostaglandinen der E-Serie relaxierende Wirkungen zugesprochen. Prostaglandin D₂ und F₂α hingegen wirken bronchokontraktil. Hierbei zeigen vor allem Asthmatiker eine sehr hohe Empfindlichkeit, nicht nur auf die Histaminfreisetzung. Bei Schwangerschaften wirken sowohl PG F₂α wie auch PG E₂ kontraktil auf die Uterusmuskulatur [Forth et al., 1996].

Im Verdauungstrakt haben PG E₁, PG E₂ und PG I₂ eine hemmende Wirkung auf die Magensaftsekretion. Die Schleim- und Bikarbonatsekretion im Magen und Dünndarm sowie die Sekretion des Wassers und von Elektrolyten werden im Darm erhöht [Forth et al., 1996]. Sie dienen dem Schutz der Magenschleimhaut. Längere Behandlungen mit Schmerzmitteln, wie Acetylsalicylsäure, bergen deshalb Gefahren für die Bildung von Magenblutungen und Magengeschwüren.

Eine entscheidende Rolle wird den Prostaglandinen in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen sowie in der Regulierung von Immunreaktionen zugesprochen. Neben durchblutungsfördernder Wirkung hat PG E₂ eine entscheidende Rolle in der Fieberauslösung im Hypothalamus. PG E₁, E₂ und PG I₂ wirken schmerzerregend. Den Prostaglandinen der E-Serie wird eine dämpfende Wirkung auf die Immunantwort zugeschrieben, durch die Hemmung der Histaminsekretion, die Bildung von Sauerstoffradikalen sowie von Leukotrien B₄. Ebenso hemmt Prostaglandin E₂ die Proliferation von T-Lymphozyten und die Differenzierung von B-Lymphozyten [Forth et al., 1996].

Die Wirkung von Prostaglandinen wird durch Rezeptoren vermittelt. Man unterteilt sie in 3 funktionelle Gruppen: - **relaxierende Rezeptoren** mit EP₂, EP₄ (Prostaglandin E₂),

IP (Prostaglandin I₂) und DP (Prostaglandin D₂)

- **kontraktile Rezeptoren** mit EP₁ (Prostaglandin E₂) FP (Prostaglandin F₂α)

- **inhibierende Rezeptoren** mit EP₃ (Prostaglandin E₂) [Narumiya et al., 1999]

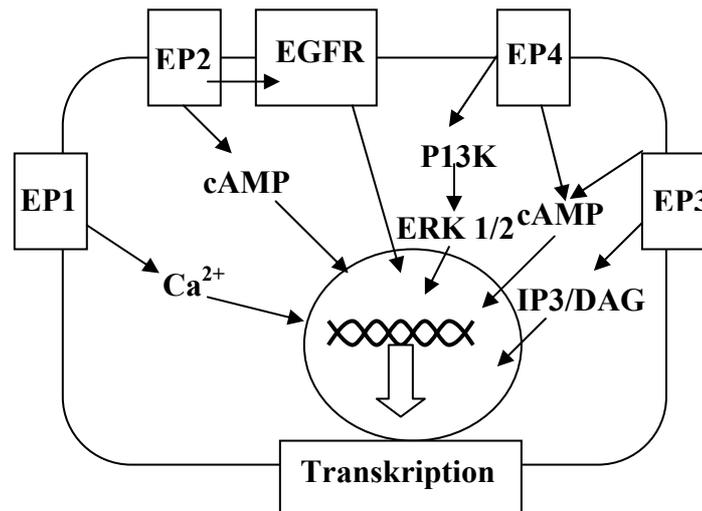


Abbildung 5: bisher bekannte Wege für die Vermittlung von Prostaglandin E2-Signalen

Während man bei Prostaglandin F₂α eine nahezu einheitliche kontraktile Wirkung beschrieben hat, sind gerade bei Prostaglandin E₂ eine Vielzahl von Wirkungen bekannt. Wie kann jedoch ein einziges Molekül so viele unterschiedliche Funktionen ausüben? Während Prostaglandin F₂α Reaktionen über einen Rezeptor, den sogenannten FP- Rezeptor, vermittelt, sind für die Vermittlung der E₂- abhängigen Signalkaskaden 4 verschiedene Rezeptoren verantwortlich (EP1-EP4) [Funk et al., 2001]. Bei EP3 sind noch 8 weitere Isoformen bekannt. [Bilson et al 2004]. Für EP2 und EP4 ist bekannt, dass die Signalvermittlung über Gs-Typ G-Proteine, das heißt Adenylatzyklase aktivierend, verlaufen. EP3 vermittelte Signalkaskaden können durch unterschiedliche G-Proteine aktiviert werden Für EP1 ist das G-Protein noch nicht identifiziert worden. [Narumiya S et al., 1999, Hata et al., 2004]. Die Signalvermittlung (Abb. 5) erfolgt über cAMP, Kalzium, Inositol-3-Phosphat oder auch EGFR-Transaktivierung [Hata et al., 2004]. Die Rezeptorausstattung auf der Oberfläche der Membran entscheidet über die Reaktion der Zelle auf die Prostaglandin E₂-vermittelte Reaktion.

1.5. EGF und EGFR: Aufbau, Funktion und Signalkaskade

1.5.1. EGF Aufbau und Funktion

EGF ist ein essentieller Bestandteil im Zellkulturmedium AECG (0,5ng/ml) für primäre Lungenzellen. Deshalb wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Wirkung auf EGF untersucht.

EGF erhöht die *in vitro* Invasivität und fördert die Tumorentwicklung bei Tumorzellinjektion der schwach malignen Tumorlinie EP1 in Mäusen [Hamada et al., 1999]. Musalam et al. (2001) konnten zeigen, dass EGF vor Fas-induzierter Apoptose durch Hochregulierung des antiapoptotisch wirksamen Proteins Bcl-x(L) schützt. In EGFR-überexprimierenden Zellen (A431) zeigte sich durch Behandlung mit EGF ein G1-Wachstumsarrest vermittelt durch Gadd45 [Fong et al., 2001].

1.5.2. Die Familie der EGF-Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege

Zur Familie der EGF- Rezeptoren gehören 4 Mitglieder, die Tyrosinkinaseaktivität besitzen. Das sind Erb B1 (EGFR), Erb B2 (Her2/neu), Erb B3, Erb B4. Allen Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie eine extrazelluläre Transmembran- und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität besitzen [Franklin et al., 2002]. Durch Ligandenbindung (Liganden: EGF, TGF α , HB-EGF, Betacellulin, Epiregulin, Amphiregulin, Neuregulin 1-3) dimerisiert der Rezeptor zum Homo- bzw. Heterodimer (Abb. 7). Es kommt zur Autophosphorylierung des Rezeptors, wodurch die Thyrosinkinaseaktivität aktiviert wird. Das führt zu weiteren Phosphorylierungskaskaden, in die das G-Protein Ras sowie MAP-Kinasen involviert sind [Franklin et al., 2002].

Die EGFR-Signalkaskaden vermitteln Zellproliferation, reduzieren Apoptose, spielen eine Rolle in der Angiogenese, onkogenetischen Transformation, Metastasierung, Proteinsekretion und Differenzierung [Franklin et al., 2002, Wu et al., 2002 a].

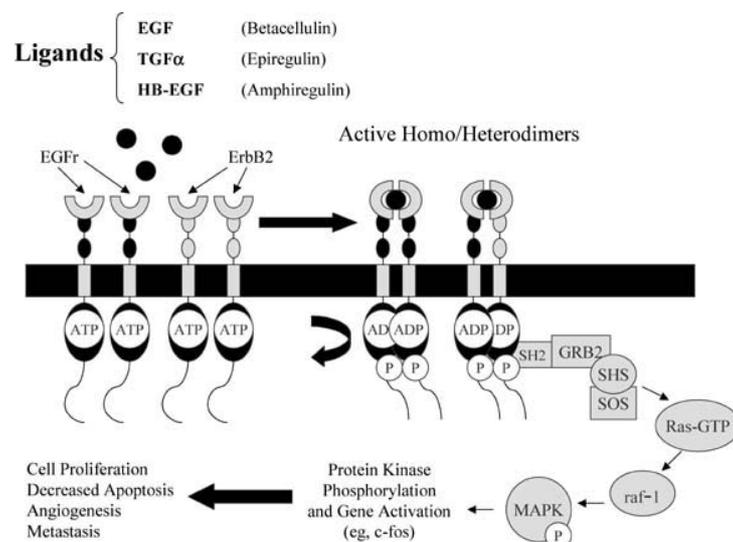


Abbildung 7: Funktionsweise des EGF-Rezeptors und dessen Signalkaskade [Franklin et al., 2002]

Untersuchungen mit Schwermetallsalzen (Arsen, Zink und Vanadium) zeigten die Aktivierung von EGFR unter Beteiligung von Ras. Für Vanadium konnte eine Ras-abhängige Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B beobachtet werden. EGFR ist also involviert in der Stressantwort auf Schwermetalle [Wu et al., 2002 a]. Neben der Ligandenbindung konnte nach Zink Behandlung gezeigt werden, dass EGFR über das Src-Protein phosphoryliert werden kann [Wu et al., 2002 b], wie auch für den Prostaglandin E2-Rezeptor die EGFR-Transaktivierung beschrieben wurde [Bilson et al., 2004]. Die Ras-vermittelten Signalkaskaden spielen auch eine Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse, wie Aktivierung von Interleukin 6 und Interleukin 8 aber auch bei der Induktion von COX II. Dies konnte in Zellen (BEAS-2B) gezeigt werden, die mit Natriummetavanadat (+5) behandelt wurden [Wu et al., 2002 a].

In nicht-kleinzelligen Lungentumoren wurde beschrieben, dass EGFR überexprimiert vorkommt. Chemotherapieansätze mit Antikörpern gegen EGFR bzw. Tyrosinkinaseinhibitoren wurden entwickelt, zeigen jedoch nur begrenzte Wirksamkeit [Pao et al., 2005, Perrone et al., 2005, Bunn et al., 2002]. Insgesamt ist umstritten, ob ein EGF- bzw. EGF-Rezeptor orientierter Therapieansatz für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms aussichtsreich ist [Franklin et al., 2002].

2. Chemikalien, Material, Geräte

2.1. Chemikalien

Zellkultur

AECG-Medium	Promo- Cell, Heidelberg
Epit-o-ser-Medium	C-C-Pro- GMBH, Neustadt/W
DMEM	Gibco- Lifescience, Berlin
Detach Kit (TNS, HBSS, Trypsin)	Promo-Cell, Heidelberg
Trypsin, PBS, FKS, L15-Leibovitz Puffer	Biochrome, Berlin
Fibronektin, Collagen R, DMSO	Sigma, Taufkirchen

MTT-Assay

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

Apoptose-Nachweis

Apo-One-Homogenous Caspase 3/7-Kit	Promega, Mannheim
------------------------------------	-------------------

Proteinisolation und -bestimmung

TRItidy G	Applichem, Darmstadt
Isopropanol , Ethanol	Roth, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
BCA, Kupfer- Sulfat, SDS	Sigma, Taufkirchen

RNA-Isolation

TRItidy G	Applichem, Darmstadt
1-Brom-3-chlor-propan, Chloroform	VWR, Darmstadt
Isopropanol , Ethanol	Roth, Karlsruhe
HPLC-Wasser	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma, Taufkirchen

RT-PCR

DNase, DNase-Puffer, DNase Stopp-Reagenz, Random-Primer, MMLV-Reverse Transkriptase, 5xPuffer dNTP, RNasin	Promega, Mannheim
2x PCR-Master-Mix	Fermentas, Canada
MgCl ₂ (25mM)	Promega, Mannheim
Sybr Green	Biozym, Oldendorf
Primer	Invitrogen, USA

Western Blot

Polyacrylamid	Applichem, Darmstadt
TRIS, Natriumchlorid, Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Tween 20, Ponceau S, Bromphenolblau, β-Mercapto-Ethanol, Glycerin	Sigma, Taufkirchen
Glycin, SDS, Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
primär Antikörper (c-met, EP1-4), sek. Antikörper (HRP-conj)	Santa Cruz, USA
Hybond- ECL- Nitrocellulose- Membran, ECL/Advanced ECL Detektions Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Entwickler, Fixierer	Sigma, Taufkirchen

Immuncytochemie

Triton- X- 100, Goat/rabbit-Serum	Sigma, Trautheim
Primärantikörper, Sekundärantikörper	Santa Cruz, Cayman Chemicals

Transportaktivität von MRP1

CDF	Molecular probes, invitrogen, USA
-----	-----------------------------------

Chemikalien zur Beh. der Zellen

Prostaglandin E2, Prostaglandin F2α, EGF	Sigma, Trautheim
Cadmiumsulfat	bereitgestellt durch das Inst. für Rechtsmedizin der MLU-Halle

2.2. Material

24Well-, 6er Well- Zellkulturplatten, Zellkulturschalen (6cm Ø), Zentrifugenröhrchen (15, 50ml), Zellkulturflaschen mit Filter	TPP, Schweiz
96Well-Fluoreszenzplatten u. -Zellkulturplatten, Chamber Slides Deckgläschen, Objektträger	Nunc, Wiesbaden Schütt-Labortechnik, Göttingen
serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml) Pipettenspitzen (1000µl, 200µl, 10µl) Filterspitzen (1000µl, 200µl, 10µl) Multi-Ecoflex- Spitzen (0,5- 200µl), Tubes (1,5ml, RNase, DNase frei)	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg, VWR, Dresden Roth, Karlsruhe
Tubes (0,5; 0,2ml; RNase, DNase frei) Whatman Filterpapier (Chr 3,3) ECL- Film	Brand, Wertheim Biometra, Göttingen Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Einweg-Küvetten Quarzküvetten	Brand, Wertheim Hellma, Mühlheim

2.3. Geräte

Autoklav:

Autoklav 3021 Schütt- Labortechnik, Göttingen

Brutschränke:

BBD 6220 Heraeus-Instruments; Hanau

Function line Heraeus-Instruments; Hanau

Hera cell Heraeus-Instruments; Hanau

Sterilbank:

Hera safe Heraeus-Instruments; Hanau

Zentrifugen:

Biofuge fresco Schütt-Labortechnik, Göttingen

GS-15 R Beckman, USA

Photometer:

DU 7500 Beckman, USA

Elektrophorese:

Biometra P25 Schütt-Labortechnik, Göttingen

Phero-STAP 550

Mikroskope:

Nikon Eclipse TS100 Nikon, USA

Axioskop 20 Zeiss, Jena

Invers-Fluoreszenzmikroskop mit Nikon, USA

Fluoreszenz-Objektiv; Amplifier AFX-D

Kamera:

Digitalkamera Coolpix 5000 Nikon, USA

Monochromator:

MuLTIsCan 2, Xenon Lamp power
Supply Mod 35/75, Sperrfilter für
Rhodamin 123

Amko LTI, Tornesch

PCR-Geräte:

Mastercycler gradient
Rotorgene 2000

Eppendorf, Hamburg
Corpett Research, UK

Elisa Reader:

Genios

Tecan, USA

Hybridisierungsöfen:

OV 5

Biometra, Göttingen

Auswerte- Software:

Excel

Microsoft, USA

Sigma Stat 8.0

SPSS Inc. USA

Tina 2.09

Raytest, Straubenhardt

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Gewinnung und Kultivierung von primären Lungenzellkulturen

Die Kultivierung normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und peripherer Lungenzellen (PLZ) (modifiziert nach Lechner und La Veck, 1985) wurde von Herrn Thomas Stock (Etablierung der Kultivierungs-Methode) [Stock 2002] und Frau Dr. Dorothee M. Runge (erste Anwendungsversuche) [Runge et al., 2001] am Institut für Umwelttoxikologie etabliert.

Es wurde peripheres Lungen- und Bronchus- Gewebe von Patienten mit Teilresektion der Lunge (vorwiegend Tumorpatienten) entnommen. Die Patienten wurden operativ im Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität behandelt. Die Ethikkommission stimmte der Verwendung der Gewebeproben für die Forschung am Institut zu. Die Zusammenarbeit erfolgte mit der Abteilung Herz-Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle. Unser Ansprechpartner war PD Dr. Stefan Hofmann. Nach Sichtung durch den Chirurgen waren die entnommenen Gewebeproben tumorfrei. Nach Entnahme wurden die Gewebeproben in eiskaltem L15-Leibovitz-Puffer gewaschen und transportiert.

NHBEZ: Das Gewebe des Bronchus wurde mechanisch mit Hilfe steriler Pinzetten und Scheren vom Lungengewebe getrennt und in 2-5 mm² große Stücke geschnitten. Nach dreimaligem Waschen der Gewebestücke in PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin wurden die Stücke auf beschichtete Kulturschalen (2 % Kollagen, 1 % Fibronectin und 0,1 % Rinderserumalbumin in L15-Medium) gelegt. Nach 5 Minuten wurde AECG-Medium mit Supplement (0,5 ng/ml EGF, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 0,5 µg/ml Epinephrin, 6,5 ng/ml Trijodthyronin, 10 µg/ml Transferrin, 0,1 ng/ml Retinolsäure und 4 µl/ml BPE) auf das Gewebe gegeben. Der Medienwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Nach ca. 2-4 Wochen zeigte sich ein subkonfluenten Zellrasen (80-90 % konfluent) und die Gewebestücke konnten in eine 2. Generation überführt werden. Die Zellkultur konnte stabil bis maximal zur 7. Generation kultiviert werden.

PLZ: Das periphere Lungengewebe wurde von Ablagerungen befreit und in 2-3 mm² große Stücke geteilt. Nach dreimaligem Waschen in PBS mit 1% Pen/Strep wurden die Gewebestückchen auf unbeschichtete Kulturschalen gegeben und 5 min bei Raumtemperatur

3. Methoden

stehen gelassen. Anschließend wurde das Gewebe mit 4 ml AECG- Medium mit Supplement überschichtet. Das Medium wurde im Abstand von 2 bis 3 Tagen gewechselt. Nach ca. 4-6 Wochen konnte ein subkonfluent Zellrasen (80-90% konfluent) beobachtet werden und die Gewebestücke in die 2. Generation umgesetzt werden. Die peripheren Lungenzellen wurden maximal bis zur 8. Generation kultiviert.

Passagieren der Zellen: Für die Versuche wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde der Detach Kit von Promo Cell verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS wurden die Zellen für ca. 5 min mit Trypsin bei 37° C von der Platte abgelöst. Die Zellen wurden in TNS (4ml/Platte) resuspendiert und die Zellzahl mittels Fuchs-Rosendahl Zählkammer bestimmt. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 900rpm für 5 min wurde das Zellpellet (Konz. 40.000 Zellen/ml) in AECG-Medium gelöst und die Zellsuspension auf beschichtete Platten (NHBEZ) bzw. unbeschichtete Platten (PLZ) gegeben. Nach ca. 1 Woche konnten die Zellen bei 80% Konfluenz für die Versuche herangezogen werden.

Kultivierung der Lungentumorzelllinie A549

Bei dieser permanenten Zelllinie handelte es sich um ein Alveolarkarzinom mit AII Zellmorphologie [Lieber et al., 1976]. Die Lungenzellen wurden in Kulturflaschen mit „Dulbeccos modified Eagle’s medium“ (DMEM; 10% FKS, 1% Pen/Strep) kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurden die Zellen mit warmem PBS gespült und mit Trypsin die Zellen vom Kulturboden gelöst (ca. 5 min bei 37°C). Die Zellen wurden in PBS gelöst und die Zellzahl mit der Fuchs/Rosendahl-Zählkammer bestimmt. Nach Zentrifugation (5 min, 900 rpm) und nochmaligem Waschen mit PBS wurde das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen (Konz. 2500-5000 Zellen/ml) und auf Kulturschalen beziehungsweise auf 24 Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 5-7 Tagen konnten die Zellen für die Versuche eingesetzt werden.

3.2. Vitalitätstest: MTT- Assay

Als Vitalitätstest verwendeten wir den MTT-Test [Carmichael et al., 1987]. Hierbei handelte es sich um eine kolorimetrische Methode, die die Umsetzung des gelben Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in das blaue wasserunlösliche Tetrazoliumsalz durch zelluläre Dehydrogenasen misst. Die Zellen wurden auf 24 Well-Platten ausgesät und bei 70-80 % Konfluenz behandelt. Nach Beendigung der Behandlung

3. Methoden

wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS (37° C) gewaschen. Nach Zugabe des MTT-Farbstoffes (0,7 mg/ml in PBS) wurden die Zellen bei 37° C im Hybridisierungssofen inkubiert. Nach Entfernen der Farblösung wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und der umgesetzte Farbstoff mittels Isopropanol-Ameisensäure-Gemisch (95/5, v/v) gelöst. Die Absorptionsmessung erfolgte im Beckman-Photometer bei 570nm.

3.3. Apoptose-Messung

Apo-ONE-Homogeneous Caspase 3/7-Assay: Zur Messung der Effektor-Caspasen 3/7 wurde der Assay der Firma Promega verwendet. Das Messprinzip beruht auf einer Fluoreszenzmessung nach Spaltung eines fluoreszenz-markierten Pentapeptid [(Z-DEVD)₂-Rhodamin 110 Substrat], welches spezifisch durch die Caspasen 3/7 geschnitten wird. Der mitgelieferte Puffer dient zur Lyse der Zellen, um die Caspasen ins Medium zu überführen und das Substrat stabil zu halten. Die Zellen wurden hierfür auf 96 Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Behandlung wurde das Substrat-Puffer-Gemisch eins zu eins zum Medium zugegeben. Nach 1 h Inkubation unter Schütteln wurden pro Probe jeweils zweimal 80 µl Medium-Substrat-Gemisch entnommen und auf eine 96 Well-Fluoreszenzplatte übertragen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im ELISA-Reader bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

3.4. RNA-Isolation und RT-real-time-PCR

RNA-Isolation: Die RNA wurde aus den behandelten Proben mittels TRIzol G isoliert. Die Methode hat den Vorteil, gleichzeitig RNA, DNA und Proteine aus einer Probe isolieren zu können. Das Verfahren wurde von Chomczynski et al. (1995) entwickelt und seither leicht modifiziert. Hierfür wurden die Zellen auf Kulturschalen mit 6 cm Durchmesser gesetzt. Nach Behandlung wurden die Zellen mit 1 ml TRIzol G pro Platte geerntet. Diese Zellsuspension konnte bei -80°C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt werden. Zuerst wurde die RNA bei der sauren Guanidiniumthiocyanat/Phenol-Extraktion getrennt, indem zur Trennung der wässrigen von der phenolhaltigen Phase 200 µl Chloroform oder alternativ 100 µl 1-Chlor-3-Brom-Propan zugegeben wurden. Nach Zentrifugation bei 11000 rpm für 15 min bei 4° C wurde die wässrige Phase, die die RNA enthält, vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Die organische Phase wurde für die Proteinisolation weiter aufbewahrt. Die RNA wurde aus der wässrigen Phase mittels Isopropanol im Verhältnis 1:1 (v/v) gefällt. Nach

3. Methoden

zweimaligem Waschen mit Ethanol (75 % und 96 %) wurde das RNA-Pellet getrocknet und in 15 bis 25 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 5 μl zur Konzentrationsbestimmung entnommen und in 1 ml HPLC-Wasser resuspendiert. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette bei 260 nm (Absorptionsmaximum: Nukleinsäuren), 280 nm (Absorptionsmaximum: Proteine) und 320 nm (Hintergrund). Zur Beurteilung der Reinheit wurde der Quotient zwischen der Absorption bei 260 und 280 nm gebildet. Der Quotient musste zwischen 1,7 und 2,0 liegen, um für weitere Reaktionen verwendet werden zu können.

cDNA- Synthese: Für die cDNA- Synthese wurden 2 μg RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit RQ1 RNase-freier DNase in einem Volumen von 10 μl (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM MgSO_4 ; 1 mM CaCl_2) für 30 min bei 37° C behandelt. Die Reaktion wurde abgestoppt mit 1 μl Stopplösung (20 mM EGTA pH 8,0) und Erhitzen bei 65° C für 10 min. Für die c-DNA-Synthese wurden 500 ng Random Hexamere zugegeben und die Proben bei 70°C für 5min denaturiert. Für die eigentliche Synthese wurden 5x-Puffer (Endkonz.: 50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT), MMLV-Reverse Transkriptase (200U) und dNTP-Mix (Endkonzentration 500 μM von jedem Nukleotid) zur Probe gegeben. Die Synthese fand bei 37° C für 1 h statt und wurde beendet durch Erhitzen auf 94° C für 5 min.

Real-time-PCR: Für die Real-time-PCR wurden 5 μl aus jeder c-DNA-Probe zur Erstellung eines internen Standards entnommen und gepoolt. Danach wurde die cDNA 1:4 mit DEPC-HPLC-Wasser verdünnt. Für die Standardreihe wurde der interne Standard nach folgendem Schema verdünnt. Für den internen Standard wurde die Konzentration von 10^6 Kopien festgelegt und die weiteren Verdünnungen auf den Standard bezogen:

unverdünnter Standard	\cong	10^6 Kopien
1. Verdünnung (1:2)	\cong	5×10^5 Kopien
2. Verdünnung (1:10)	\cong	10^5 Kopien
3. Verdünnung (1:10 aus 1. Verdünnung)	\cong	5×10^4 Kopien
4. Verdünnung (1:10 aus 2. Verdünnung)	\cong	10^4 Kopien

Es wurden aus jeder Verdünnung, dem unverdünnten Standard und den Proben 2 μl cDNA für die PCR entnommen. Zusätzlich wurde eine Nullprobe ohne c-DNA zum Ausschluss von Primerdimeren mitgeführt. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung. Den Proben wurden folgende Substanzen zugesetzt: 12,5 μl PCR-Mastermix (Fermentas); 7 μl Nuklease freies A. bidest., 1,5 μl Primergemisch (Endkonz. 0,6 μM ; Primer siehe Tabelle 1), 0,5 μl Sybr-Green

3. Methoden

(1:50.000, verdünnt aus Stammlösung); 1 μ l MgCl₂ (Endkonzentration: 3 mM). Das Endvolumen betrug 25 μ l. Zur Detektion verwendeten wir den Sequenz-unspezifischen Farbstoff Sybr Green. Dieser interkaliert mit der doppelsträngigen DNA und kann dann zur Fluoreszenz angeregt (Anregungswellenlänge: 470nm; Emissionswellenlänge: 585nm) werden. Die PCR begann mit einem Initialschritt bei 95°C für 2min zur Denaturierung der DNA. Es folgten 35-40 Zyklen mit folgenden Abschnitten:

- 1) Denaturierung: 95° C 30 s
- 2) Anlagerung der Primer: 30 s (Temperatur: siehe Tabelle 1)
- 3) Extension: 72°C 30 s
- 4) Fluoreszenzmessung: 15 s (Temperatur: siehe Tabelle 1)

Abschließend wurde zur Vollendung der spezifischen PCR-Produkte eine konstante Temperatur von 72° C über 5 min gehalten mit anschließendem Start der Schmelzkurve, bei der die Fluoreszenzabnahme bei steigender Temperatur (bis 95°C) gemessen wird. Die Schmelzkurve dient der Beurteilung des sauberen Produkts. Hierbei wird die Abnahme der Fluoreszenz mit steigenden Temperaturen verfolgt. Da die Temperatur des Aufschmelzens der doppelsträngigen DNA (und damit die Auslöschung der Sybr-Green Fluoreszenz) Sequenz- und Größen-abhängig ist, kommt es zu einem raschen Abfall der Fluoreszenzintensität (Auslöschung der Fluoreszenz), dessen Temperatur für das PCR-Produkt spezifisch ist (Schmelztemperatur). Gibt es mehrere solcher Abnahmepunkte ist das Produkt als nicht sauber anzusehen und der Versuch nicht auswertbar. Zur Auswertung wurden der Schwellenwert und die Schwellenwertzyklen bestimmt. Aus den Standards wurde eine Eichreihe ermittelt, in die die Konzentrationen gegen die Schwellenwertzyklen (logarithmische Skalierung) aufgetragen wurden. Aus dieser Eichgerade wurden für die Proben die Konzentrationen in Relation zur Standardeichkurve ermittelt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ unter Verwendung eines Referenzgenes (GAPDH). Die Expressionsänderungen wurden im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle ermittelt.

	Primer	bp	Annealingtemp.	Mess-Temp.
GAPDH	5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC 5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT	226	60°C	82°C
MRP1	5'- TAC ATG AAG GCC ATC GGA CTC 5'- AGA CGC TCA GCC GGA CTT T	160	57°C	85°C
MRP3	5'- CTC AAT GTG GCA GAC ATC GG 5'- GGG AGC TCA CAA ACG TGT G	178	55°C	88°C
MRP4	5'- GGG CAG GAG AAT GAT TAG AAC 5'- ACC ACA GGC CAG ATA GTC AA	180	57°C	82°C
MRP5	5'- CGC ATC GCA CAC GTA AAC 5'- TGG ACA ATA ACA CGC AGT CAC	163	55°C	82°C

Tabelle 1: Primersequenzen, Produktlänge, Annealing-Temperatur und Messtemperatur der einzelnen PCR-Produkte

3.5. Proteinisolation und Western Blot

Proteinisolation: Zur Proteinisolation wurden die Proben aus der RNA-Isolation verwendet. Nach Abnahme der restlichen wässrigen Phase und der Interphase wurden zur Ausfällung restlicher Nukleinsäuren 300 µl Ethanol zugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4500 rpm und 4° C für 5 min abzentrifugiert. Die Lösung wurde vorsichtig vom Pellet abgenommen und auf 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zur Fällung der Proteine wurden den Proben jeweils 750 µl Isopropanol zugesetzt. Die Fällung fand innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur statt. Nach Zentrifugation des Pellets (15 min bei 11.000 rpm, 4° C) wurde das Pellet dreimal mit einer 300 mM Guanidinhydrochlorid-Lösung (in Ethanol) gewaschen (20 min bei RT, Zentrifugation: 5 min, 9000 rpm, 4° C). Die Salzrückstände wurden durch zweimaliges Waschen mit Ethanol entfernt. Die Proteinpellets wurden vereint und getrocknet. Anschließend wurden die Proteine in 1 % SDS-Lösung aufgenommen. Zur besseren Löslichkeit wurden 5 µl einer 1 N NaOH-Lösung/100 µl Proteinlösung zugegeben.

Proteinbestimmung: Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Methode [Smith et al., 1985]. Dabei werden Cu^{2+} -Ionen durch Proteine zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Diese Ionen bilden mit der Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der durch Absorptionsmessung bei 595nm gemessen werden kann. Zur Proteinbestimmung wurden 5 µl der 1 % SDS-Proteinlösung genommen und 1:10 mit 0,9 % NaCl_2 -Lösung verdünnt. Als Eichsubstanz wurde BSA verwendet in folgenden Konzentrationen: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 µg/µl. Anschließend wurden jeweils 10 µl in Doppelbestimmung auf eine 96 Well-Platte gegeben. Das Nachweisreagenz bestand aus 49 Teilen BCA und 1 Teil Kupfer (II)Sulfat (4% w/v). Vom Nachweisreagenz wurden 200µl/Well aufgetragen und die Platte für 30 min bei 37° C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Platte wurde im ELISA-Reader bei 595 nm vermessen. Aus der BSA- Eichreihe wurden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

Western Blot: Für den Western Blot wurden 30-40 µg Protein eingesetzt. Die Proben wurden mit Aqua bidest. auf ein einheitliches Probevolumen eingestellt. Anschließend wurde Probenpuffer (Endkonzentration: 33 mM Tris, 0,6 % β -Mercapto-Ethanol, 23 mM SDS, 6,7 % Glycerin, 6×10^{-3} % Bromphenolblau) zugegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 95° C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Proteine wurden auf ein 10 % SDS-PAGE- Gel aufgetragen (7 % Sammelgel). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 30 mA/Gel für ca. 1,5-2 h (Laufpuffer: 26 mM Tris, 190 mM Glycin, 1 % SDS). Anschließend wurden die Proteine mittels Nasstransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür

3. Methoden

wurden die Membran, das PAGE-Gel sowie 2 Filterpapiere (Whatman-Chromatographie-Papier) in Transferpuffer (50 mM Tris, 0,5 mM Glycin, 0,05 % SDS) befeuchtet, in Form eines Sandwichs (Filterpapier, Gel, Membran und Filterpapier) zusammengebaut und in eine Transferkammer mit Transferpuffer überführt. Der Transfer fand über Nacht bei 250 mA bzw. über 3 h bei 500 mA statt. Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mittels Ponceau-red (0,1 % [w/v] in 5 % Essigsäure [v/v]) angefärbt. Nach kurzem Waschen in 10 % Essigsäure wurden die Membranen eingescannt und die Gleichmäßigkeit der Auftragung mit Hilfe des Computerprogrammes TINA2.09 densitometrisch überprüft. Nach vollständigem Entfernen der Farbrückstände auf der Membran durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween [v/v], pH 7,3) wurden die Membranen mit Blockierlösung (2-5 % *Blocking agent* [w/v] in TBS-T) für eine Stunde auf einem Taumler bei RT inkubiert. Anschließend folgte die Behandlung der Membranen mittels Primärantikörper (1:1000-1:2000 verdünnt in Blockierlösung) für 2 h bei RT bzw. über Nacht bei 4° C auf einem Taumler. Die Membranen wurden mit TBS-T einmal für 15 min und dreimal für 5 min gewaschen. Es erfolgte die Behandlung mit dem Sekundärantikörper (1:2500 - 1:40000 in Blockierlösung) für 1 h bei RT auf dem Taumler. Die verwendeten Antikörper für die Prostaglandinrezeptoren und deren Konzentrationen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Membranen wurden wieder mit TBS-T einmal für 15 min und dreimal für 5 min gewaschen. Anschließend wurde das Substrat zur Detektion zugegeben (ECL-Substrat bzw. ECL-Advanced- Substrat). Dafür wurden die beiden Komponenten vorher 1:1 zusammengegeben. Davon wurden ca. 3 bis 3,5 ml des Substrates für 5 min auf die Membranen gegeben. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz auf ECL Filmen. Für die Entwicklung der Filme verwendeten wir Entwickler und Fixierer von Kodak nach Herstellerangaben. Die quantitative Auswertung der Versuche erfolgte densitometrisch mittels TINA2.09.

3. Methoden

Prim Ak	Konz.	sek. Ak	Konz.	Nachweis-Detergenz
goat anti EP1 Ig G (Peptid: Nähe N-Terminus human EP1)	1:2000	mouse-anti goat IgG	1:10000	ECL-Advanced-Substrat
rabbit anti EP2 IgG (rekomb. Protein AS 1-75 am N-Terminus von humanen EP2)	1:4000	goat-anti-rabbit Ig G	1:40000	ECL-Advanced-Substrat
rabbit anti EP3 IgG (rekomb. Protein AS 1-200 am N-Terminus von humanen EP3)	1:2000	goat-anti-rabbit Ig G	1:40000	ECL-Advanced-Substrat
rabbit anti EP4 IgG (rekomb. Protein AS 329-488 am C-Terminus vom humanen EP4)	1:2000	goat-anti-rabbit Ig G	1:40000	ECL-Advanced-Substrat

Tabelle 2: verwendete primäre und sekundäre Antikörper sowie deren Konzentrationen und das Nachweisreagenz (Santa Cruz: Produktinformation zum Antikörper)

3.6. Immunzytochemischer Nachweis von Prostaglandin E2-Rezeptoren in Lungenzellkulturen

Zum Nachweis der Prostaglandin E2-Rezeptoren als zelluläre Proteine wurden normale humane Lungenzellen (NHBEZ und PLZ) sowie humane Lungentumorzellen (A549) auf sterilen Deckgläsern kultiviert, die für NHBEZ Collagen- und Fibronectin- (3 mg Collagen + 1 mg Fibronectin / 100 ml L15-Medium) beschichtet worden waren. Nach 7-14 Tagen (Mediumwechsel dreimal in der Woche) wurde die Fixierung durchgeführt. Die Zellen wurden nach Spülen mit PBS zum gewünschten Zeitpunkt für 5 min in -20° C kaltem Methanol inkubiert. Nach Absaugen des Methanols konnten die fixierten Zellen bei -20° C gelagert werden.

Vor Inkubation der Deckgläser mit den primären polyklonalen Antikörpern wurden die Proben zunächst durch leichtes Schwenken in PBS rehydriert und für 5 min in Permeabilisierungslösung 0,1 % Triton-X-100 in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präparate wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann für 30 min in Blocklösung (10 % Ziegen- [EP2-EP4] bzw. 10 % Kaninchenserum [EP1]) in PBS bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Hintergrundreaktionen zu reduzieren. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurde der Primärantikörper (1:100 in 1,5 % Serum in PBS; 200 μ l/Deckgläsern) zugegeben.

3. Methoden

Die Antikörperinkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Proben wurden anschließend zweimal mit PBS gespült. Als sekundärer Antikörper wurde ein 1:500 in 1,5 % Serum verdünnter CY3-gekoppelter anti-goat bzw. anti rabbit IgG-Antikörper verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Die Deckgläschen wurden anschließend, wie oben angegeben, erneut mit PBS gewaschen (5mal jeweils 3 min). Alle Proben wurden nach dem Färben bei 4° C bis zur mikroskopischen und mikrophotographischen (Nikon-Digital Kamera) Auswertung gelagert. Die Proben wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotografiert (Anregung: 546 nm, Emission 590 nm)

3.7. Transport-Aktivität von MRP1

Die Transportstudien wurden nach Lehman et al. (2001) an den Lungenzellen (A549, NHBEZ, PLZ, kultiviert auf Borsilikatdeckgläschen in 6er Well- Zellkulturplatten) mit der Technik der Einzelzellfluoreszenz-Messung am Fluoreszenz-Inversmikroskop durchgeführt. Mit dem Fluoreszenz-Inversmikroskop, Amplifier AFX-DX und monochromatischem Licht (Exzitation = 460 nm, Emmission im Sperrfilterbereich mit einem Maximum bei 490 nm gemessen) wurde die Emission des intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffes mit 30 Messungen pro-Sekunde und 10 sec Messdauer durchgeführt.

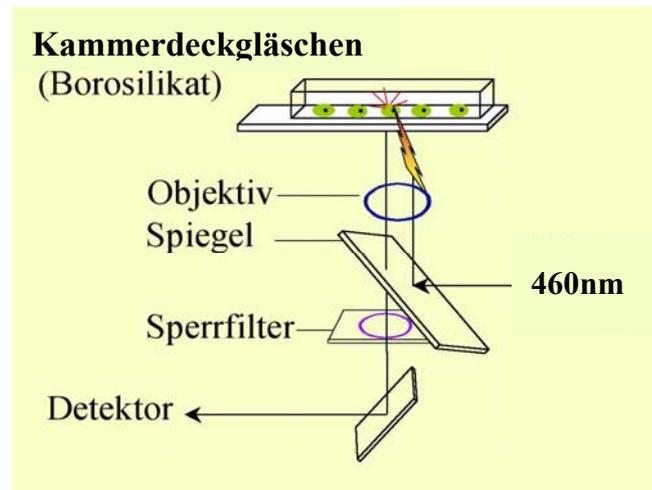


Abb. 8: Versuchsaufbau zur Messung der Einzelzellfluoreszenz

Der Strahlengang des induzierten Fluoreszenzlichtes in den Zellen erfolgte rückwärts über Borosilikatglas, Immersionsöl, Fluoreszenz-Objektiv, Sperrfilter /Reflektionsspiegel und Amplifier. Die Interpretation der Messergebnisse erfolgte rechnergestützt (GEM, DSCAN-

Software Amko LTI[®]), wobei für jeden Messpunkt der Absolutwert und Hintergrund durch *linear fit* ermittelt wurden.

Zur Untersuchung der funktionellen Transport-Aktivität von MRP-1 wurde die Versuchsanordnung, wie in Abbildung 1 beschrieben, verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff, welcher nur durch MRP-1 transportiert wird, ist 5,6-Carboxy-2',7'-Dichlorfluorescein (Courtois et al., 1999) (CDF, Molecular probes). Nach Behandlung der Zellen mit Entzündungsmediatoren wurden die Zellen für 4h mit CDF (4 µg/ml) inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die akkumulierte Menge an CDF mittels Einzelzellfluoreszenz vermessen. Eine Negativkontrolle ohne CDF wurde zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz mitgeführt.

3.8. Immunzytochemische Charakterisierung von Primärkulturen der Lunge

Die Charakterisierung der Epithelzellkulturen erfolgte immunzytochemisch. Die Zellen wurden auf Chamber Slides kultiviert. Nach Fixierung mit 70 % Ethanol erfolgte die Antikörperbehandlung mit Primäantikörpern gegen Zytokeration 8/18 und 7, Desmin, Smooth muscle actin und Vimentin über 50 min bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte mittels Biotin-gekoppeltem Sekundäantikörper und Avidin-Biotin-Komplex Reagenz. Mit Hematoxinil wurde gegengefärbt. Die Charakterisierung wurde am Institut für Pathologie in Kooperation mit Fr. Dr. C. Taege durchgeführt.

3.9. Statistische Auswerteverfahren

Zur statistischen Auswertung der RNA-Expressionsdaten sowie der Proteinexpression und Transportaktivitäten wurde der One-Way-Anova mittels des Statistik-Auswerteprogrammes SigmaStat 8.0 herangezogen. Dieser Test analysiert die Unterschiede im Mittelwert zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen ≥ 3 . Damit können zum Beispiel Aussagen hinsichtlich Konzentrationsabhängigkeit oder Zeitabhängigkeit aus einem Experiment ermittelt werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ergab sich, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner bzw. gleich 5 % ($p \leq 0,05$) war.

4. Ergebnisse

4.1. Zellkulturen und Grundexpression der MRP-Proteine

4.1.1. Primärzellkulturen der Lunge und Patienteninformation

Für die Versuche wurden serumfreie Primärkulturen des humanen Bronchus und der peripheren humanen Lunge verwendet. Das Gewebe wurde von Patienten entnommen, die sich einer Pneumektomie oder Lobektomie aus medizinischen Gründen unterziehen mussten. Während der Operation wurde das Gewebe durch einen Pathologen im Schnellschnittlabor beurteilt. Das Gewebe der Kulturen war tumorfrei bzw. frei von anderen pathologischen Merkmalen. Nach Ausplattieren des Gewebes wuchsen die Bronchialzellen in ca. 2-4 Wochen und die peripheren Lungenzellen in 4-6 Wochen bis zur Subkonfluenz aus und konnten für die Versuche herangezogen werden.

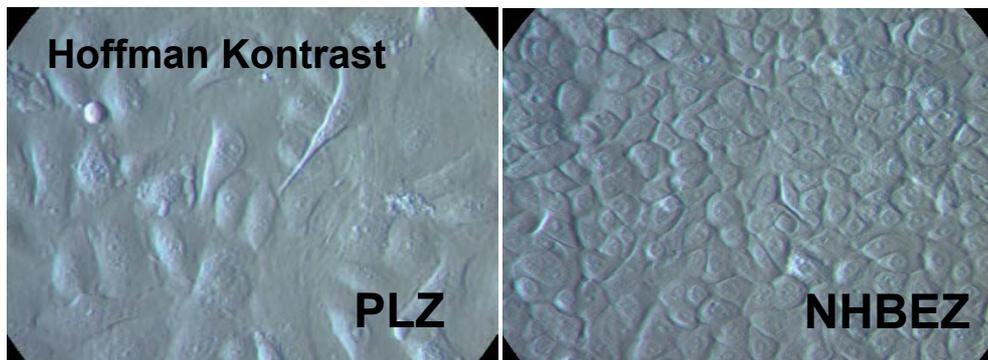


Abbildung 9: Hoffmann-Kontrast der Lungenzellen in Kultur (400x Vergrößerung) normale humane bronchiale Epithelzellen (NHBEZ), periphere Lungenzellen (PLZ)

Im Hoffmann Kontrast (Abb. 9), welcher die plastische Darstellung der Zellkulturen ermöglicht, ist bei den normal humanen Bronchialepithelzellen die charakteristische pflastersteinartige Struktur des Epithelzellrasens zu erkennen. Für die genaue Zuordnung des Epithelcharakters wurden immunzytochemische Methoden herangezogen. Abbildung 10 zeigt die immunzytochemische Charakterisierung peripherer Lungenzellen.

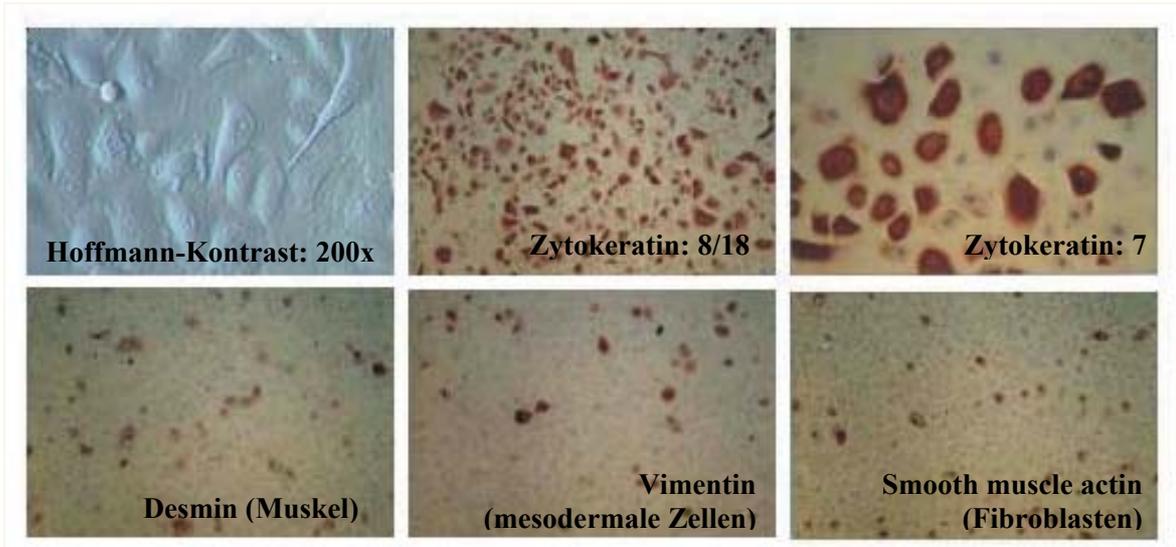


Abbildung 10: Immunzytochemische Charakterisierung der Primärkulturen der peripheren Lunge mit Zytokeratin 8/18 und Zytokeratin 7 für respiratorisches Epithel sowie Gegenfärbungen mittels Desmin für Muskelzellen, Vimentin für mesodermale Zellen und Smooth muscle actin für Fibroblasten

Wie an der immunzytochemischen Färbung erkennbar ist, handelt es sich bei den peripheren Lungenzellen um eine Mischzellkultur. Diese weist einen hohen Anteil von 70-80 % Epithelzellen auf, zu erkennen an der Färbung gegen Zytokeratin 8/18 und Zytokeratin 7. Neben den Epithelzellen weist die Kultur sowohl Muskelzellen als auch mesodermale Zellen und Fibroblasten auf.

In Abbildung 11 ist die immunzytochemische Färbung von humanen Bronchialepithelzellen dargestellt. Die immunzytochemische Färbung der Bronchialepithelzellen wiesen einen sehr hohen Anteil an Epithelzellen auf (>95%). Vereinzelt waren mesodermale Zellen, Fibroblasten und Muskelzellen nachweisbar.

Bei vielen Primärkulturen treten Probleme in der Dauer der Kultivierbarkeit auf. Hepatozyten zum Beispiel weisen eine Kultivierungsdauer von meist weniger als einer Woche bis maximal 3 Wochen auf [Morgan et al, 1994]. Viele der Primärzellkulturen müssen aufwendigen Prozeduren, wie enzymatischen Verdau mit Collagenase und Ausschaben fremder Zellen sowie Aufreinigen über Dichtezentrifugation unterzogen werden.

4. Ergebnisse

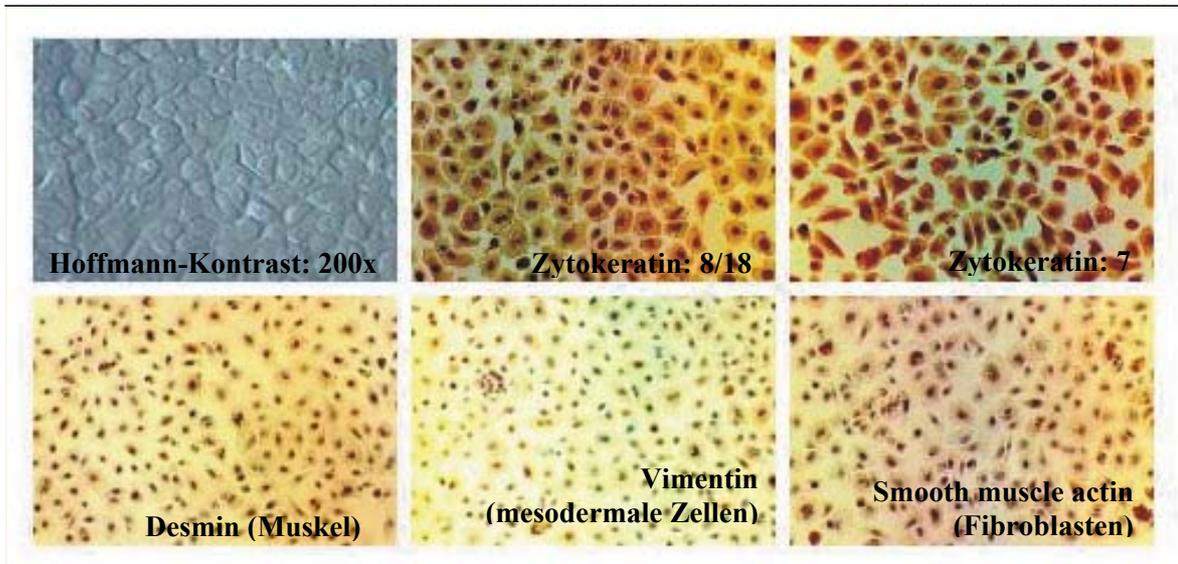


Abbildung 11: Immunzytochemische Charakterisierung der Primärkulturen der peripheren Lunge mit Zytokeratin 8/18 und Zytokeratin 7 für respiratorisches Epithel sowie Gegenfärbungen mittels Desmin für Muskelzellen, Vimentin für mesodermale Zellen und Smooth muscle actin für Fibroblasten

In der Form des Auswachsens aus Gewebe mittels Selektion durch serumfreie Medien (AECG-Medium und anfangs Epit-o-ser) gelingt es hier, epitheliale Lungenzellen über mehrere Wochen bis hin zu 6 Monaten stabil zu kultivieren. Dabei wurden anfangs die Bronchialepithelzellen mit Epit-o-ser Medium, welches 10µg Insulin; 0,205 µg/ml Dexamethason, 10 µg/ml IGF sowie Rinderhypophysenextrakt nach Herstellerangaben (c-c-pro) enthält, verwendet. Aufgrund schlechteren Wachstums wurden die Bronchialzellen auf AECG-Medium umgestellt. Das gleiche Medium wurde auch für die peripheren Lungenzellen verwendet. Dieses Medium weist eine komplexere Zusammensetzung (0,4% Rinderhypophysenextrakt, 0,5 ng/mlEGF, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 0,5 µg/ml Epinephrin, 6,7 ng/ml Triiodthyronin, 10 µg/ml Transferrin und 0,1 ng/ml Retinolsäure) im Vergleich zu Epit-o-ser auf. Nach Wechsel zeigte sich eine schnellere Auswachsrate der Zellen. Ebenso ermöglicht das AECG-Medium den besseren Vergleich zwischen peripheren Lungenzellen und Bronchialepithelzellen.

Die Kulturdauer sowie die Anzahl an Generationen für die Primärkulturen der Lunge wiesen eine hohe Schwankungsbreite auf. In Abbildung 12 sind die Kulturdauer in Wochen, sowie die Anzahl an Generationen der humanen Bronchialepithelzellen der im Institut verwendeten und dokumentierten Gewebeproben in den Jahren 2001 bis 2004 dargestellt.

4. Ergebnisse

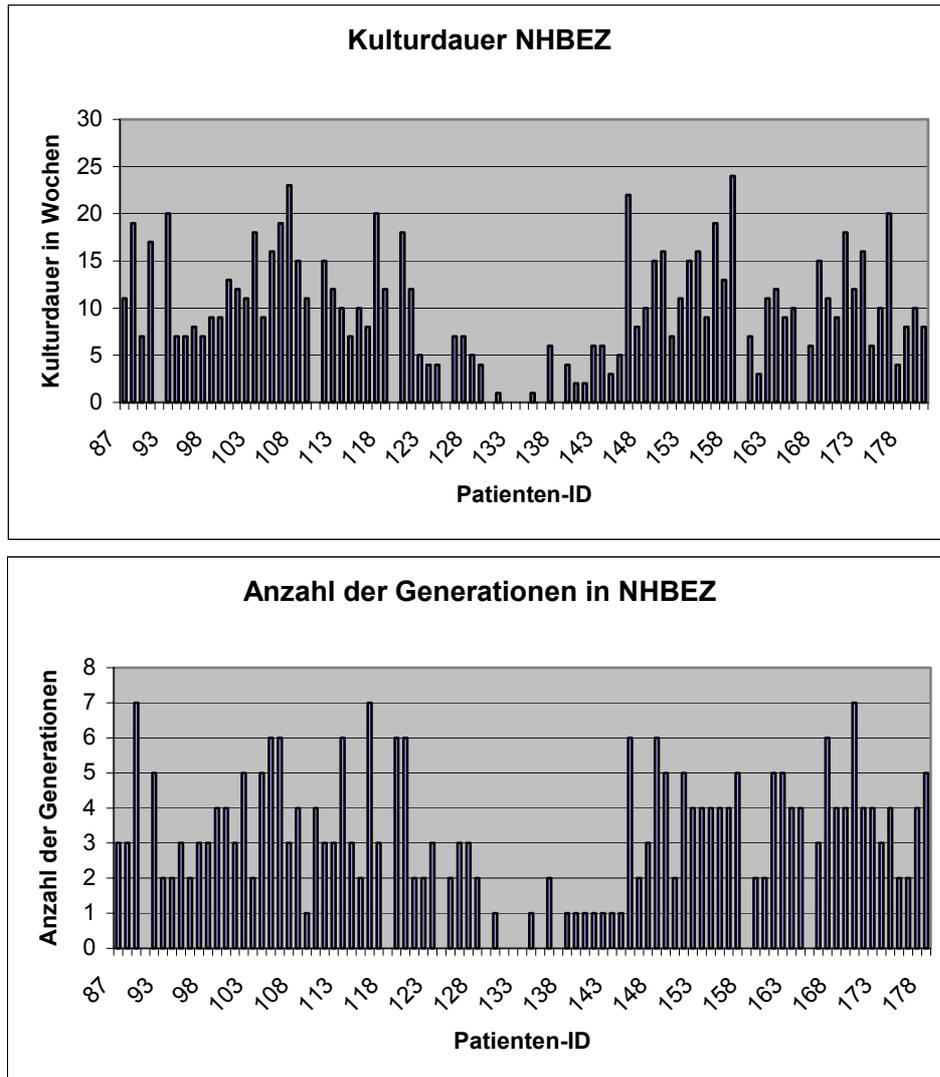


Abbildung 12: Kulturdauer in Wochen und Generationenanzahl von normalen humanen Bronchialepithelzellen aller Gewebeproben in den Jahren 2001-2004

Die Kulturdauer variierte bei den einzelnen Patienten zwischen 1 und 23 Wochen. Der Durchschnitt der Kultivierungsdauer liegt bei 10 Wochen. Die durchschnittliche Anzahl an Generationen lag bei 3 Generationen. Dabei lagen 41 % der Kulturen \leq der 2. Generation, 37 % zwischen der 3. und 4. Generation, während 22 % \geq der 5. Generation bis maximal zur 7. Generation lagen.

In Abbildung 13 sind die Kultivierungsdauer und Generationenanzahl der peripheren Lungenzellen dargestellt.

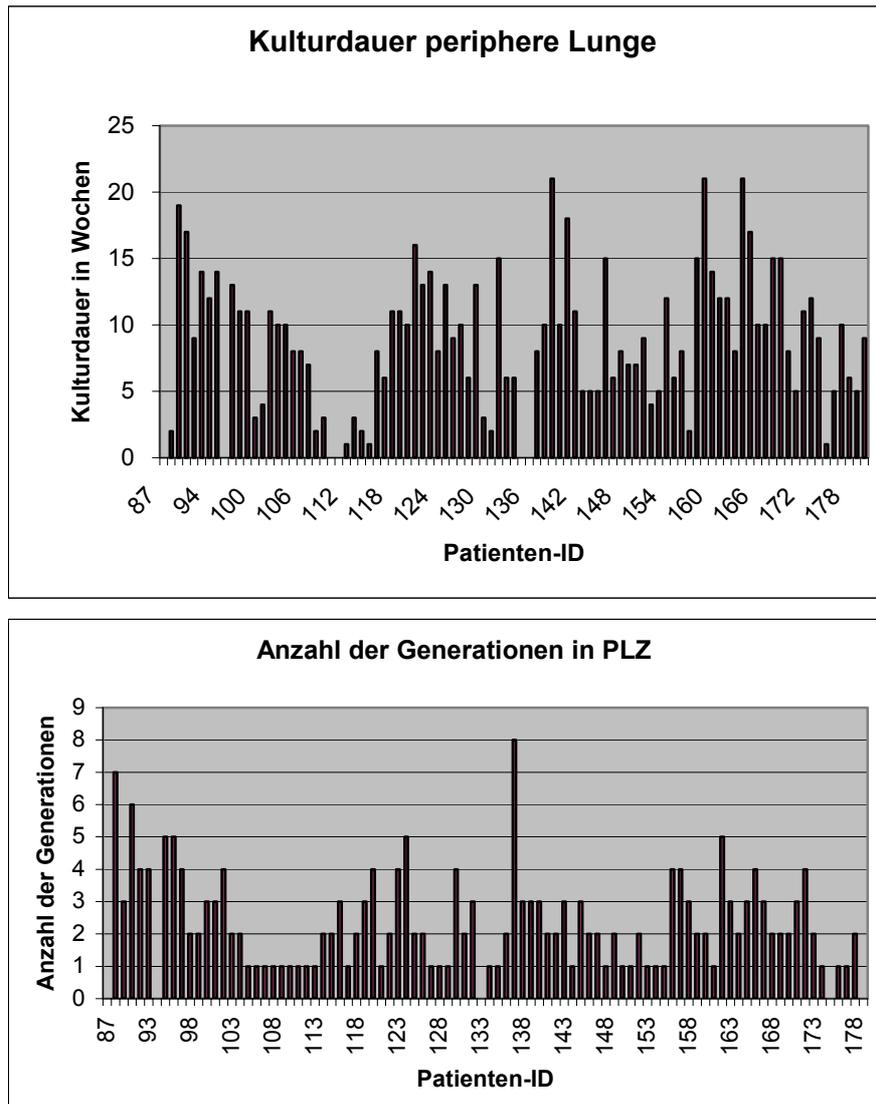


Abbildung 13: Kulturdauer und Generationenanzahl aller peripheren Lungenzellgewebekulturen zwischen den Jahren 2001 und 2004

Die peripheren Lungenzellen konnten im Durchschnitt über 9 Wochen kultiviert werden, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Bronchialepithelzellen hergestellt werden konnte. Die durchschnittliche Generationenanzahl lag bei 2 Generationen. Der Unterschied zwischen den peripheren Lungenzellen und den Bronchialepithelzellen war statistisch signifikant ($p < 0,05$, One way Anova). Dabei lagen 62 % der Kulturen \leq der 2. Generation, 30 % lagen zwischen der 3. und 4. Generation, während 8 % der ≥ 5 . Generation bis maximal zur 8. Generation angehörten.

Die unterschiedliche Anzahl an Generationen bei gleicher Kultivierungsdauer lässt sich durch die schnellere Auswachsrate primärer Bronchialepithelzellen (ca. 2-4 Wochen) im Vergleich zu den peripheren Lungenzellen (ca. 4-6 Wochen) erklären.

4. Ergebnisse

Die Möglichkeiten, primäre Lungenzellen aus Resektatmaterial der menschlichen Lunge zu generieren sind unterschiedlich. Zum einen zeigen die Bronchialepithelzellen einen deutlich höheren epithelialen Charakter, zum anderen zeigen sie eine schnellere Auswachsrate und eine höhere Generationenanzahl. Ein Unterschied in der Kultivierung liegt in der Beschichtung der Platten. Während periphere Lungenzellen auf unbeschichteten Kulturplatten auswachsen, werden Bronchialepithelzellen auf Kollagen (2 %) und Fibronectin (1 %) beschichteten Platten kultiviert.

In Tabelle 3 sind die Patientendaten und die Verwendung der Zellkulturen für die folgenden Versuche dargestellt. Diese Daten wurden aus Krankenhausakten bzw. durch Patientenbefragung erstellt.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Raucher	Besonderheiten	Versuch	Methode
119	m	67	Colonc Met.	ja (30J/ 20Z/d)	Asbestbelastung	EGF	WB (c-met)
120	m	70	BC re OL	k. A.	-	EGF	WB: EGFR
123	w	67	BC li OL	NR	-	EGF	WB: EGFR/MTT
126	m	74	BC re OL	ja (25J/ 10Z/d)	Asbestbelastung	EGF	MTT
140	m	65	BC re UL	ja (30J/ 20Z/d)	-	-	WB-PG E2-Rez.
142	m	63	Zentr. BC	ja (20Z/d)	Tiefbau Staubbelastung	EGF/Cd	MTT
143	m	64	BC re UL	-	-	- EGF/Cd	EGFR-Expr MTT
145	m	54	neuroend. Carc.	k. A.	Arbeit im Kali- Werk	PG F2 α - EGF EGF/Cd	MTT EGFR-Expr MTT MTT
146	m	60	NSCLC li UL	ja (37J/ 3-5Z/d)	Asbestbelastung	EGF/Cd	MTT
148	m	60	RH re OL	-	-	PG F2 α	MTT

4. Ergebnisse

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Raucher	Besonderheiten	Versuch	Methode
149	m	68	Adenoc.	NR	Bergmann	-	<i>EGFR-Expr</i>
151	m	66	NSCLC re OL	ja (40J/ 20Z/d)	Mischstaubbel.	EGF EGF/Cd	WB: c-met MTT
152	m	75	NSCLC re OL	ja (60J/ 8-10Z/d)	-	EGF EGF/Cd PG F2 α	MTT MTT MTT
154	m	60	BC li OL	k. A.	-	-	<i>EGFR-Expr</i>
155	m	83	BC re UL	nein (seit 50J)	Schlosser	PG F2 α -	MRP1- Transportakt. EGFR-Expr
156	m	72	<i>Pneu- monie</i>	<i>nein (seit 70er Jahre)</i>	<i>Fotoind. (Ammoniak/ Silbernitrat) Mischstaubbel.</i>	<i>PG F2α PG E2</i>	<i>RT-PCR(MRP)/ MRP1-Transp.-Akt. RT-PCR (MRP)</i>
157	m	65	Narbenc. re OL	ja (40J/ 20Z/d)	Mischstaubbel. Zimmermann	PG F2 α PG E2	RT-PCR(MRP) RT-PCR (MRP)
159	m	72	Platten epithelc. li OL	ja (50J/ 20Z/d)	KFZ-Schlosser	EGF/Cd	MTT
161	w	65	<i>ulz. Bronchio ektasen li UL</i>	<i>nein</i>	-	<i>PG F2α PG E2</i>	<i>RT-PCR(MRP) RT-PCR (MRP)</i>
162	m	52	Infiltrat NSCLC in li UL	ja (20/d)	Radio- u. Chemother. Dreher	EGF/Cd PG F2 α PG E2	MTT MTT MTT/RT-PCR (MRP)
163	m	64	<i>Metast. aus Nieren- carc.</i>	<i>nein seit 1984</i>	-	<i>PG F2α PG E2</i>	<i>RT-PCR(MRP) RT-PCR (MRP) ICH (E2-Rez.)</i>
164	m	60	BC li OL	-	-		WB (PG-E2-Rez.)
165	w	61	<i>RH li OL</i>	<i>nein</i>	-	<i>PG F2α PG E2</i>	<i>RT-PCR(MRP) RT-PCR (MRP)</i>

4. Ergebnisse

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Raucher	Besonderheiten	Versuch	Methode
166	m	50	Plattenepithelc. li OL	ja (34J seit 7J 20Z/d vorher 30Z/d)	Asbest- und Quecksilber- belastung	PG F2 α PG E2	RT-PCR(MRP) RT-PCR (MRP)/ MRP1-Transp.-akt. WB/IH (PG-E2- Rez.)
167	m	60	BC li OL	-	-		WB (PG-E2-Rez.)
170	w	51	BC re UL	ja (30J 20-25Z/d)	Chemotherapie	PG F2 α	RT-PCR(MRP)
171	m	76	Plattenepi- thelc.	ja bis 1998 30Z/d	Asbestbelastung	PG E2	RT-PCR (MRP)
172	m	61	Adenoc. re OL	seit 15J NR	Bergmann	PG E2	RT-PCR(MRP)
173	m	60	-	-	-	PG F2 α PG E2	RT-PCR(MRP) RT-PCR (MRP)
175	m	51	Platten- epithelc.	k.A	k.A.	PG F2 α - PG E2	MTT WB (PG-E2-Rez.) RT-PCR(MRP)
176	m	65	Adenoc re OL	NR seit 9J	Chemotherapie	PG E2	MRP1-Transp.-akt.
178	m	53	Adenoc re OL	NR seit 6J		PG E2	MTT
180	w	64	NSCLC li UL	ja 20J 20Z/d	-		ICH (PG-E2-Rez)
181	m	62	BC	nein seit 17J	Asbestbel.		ICH (PG-E2-Rez.)
182	w	56	kein Tumor- befund	ja (30J;5- 10Z/d)	-	PG E2/Cd	Casp Akt ICH (PG-E2-Rez.)
184	m	62	NSCLC re OL	ja 1Pck/d	-	PG E2/Cd	Casp. Akt
186	m	63	Platten- epithelc. li UL	NR seit 6J davor 20Z/d	Chemiarbeiter (Arbeit mit chlorierten Verb.)	PG E2/Cd	Casp. Akt

4. Ergebnisse

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Raucher	Besonderheiten	Versuch	Methode
193	m	78	BC li	k. A.	k. A.	PG E2 PG F2 α	MRP1-Transp. Akt. MRP1-Transp. Akt.
194	m	78	Periph. BC	k. A.	k. A.	PGE2 PGF2 α PG E2/Cd	MRP1-Transp. Akt. MRP1-Transp. Akt. Casp. -Akt.

Tabelle 3: Patientendaten (Geschlecht, Alter, Diagnose, Rauchverhalten und Besonderheiten) für die Lungenzellkultur im Zusammenhang mit den durchgeführten Versuchen; die Nummerierung bezieht sich auf eine Instituts-interne Verschlüsselung aufgrund des Datenschutzes nach zeitlicher Reihenfolge der Gewebeproben.

Für die Experimente wurden Gewebe aus 39 Operationen verwendet, wobei in 9 Fällen kein Lungenkarzinom vorlag. Dazu zählen zum Beispiel andere Tumorerkrankungen und Pneumonien. Die weiteren Daten beziehen sich auf die 30 Patienten mit nachgewiesenen Lungenkrebserkrankungen. Von den lungenkrebserkrankten Patienten hatten 15 (50%) ein nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. Dazu zählen Plattenepithel-, Adenokarzinome sowie nicht eingeordnete NSCLC. Von den Patienten, die nur mit Bronchialkarzinom klassifiziert wurden, sind keine weiteren Zuordnungen bekannt.

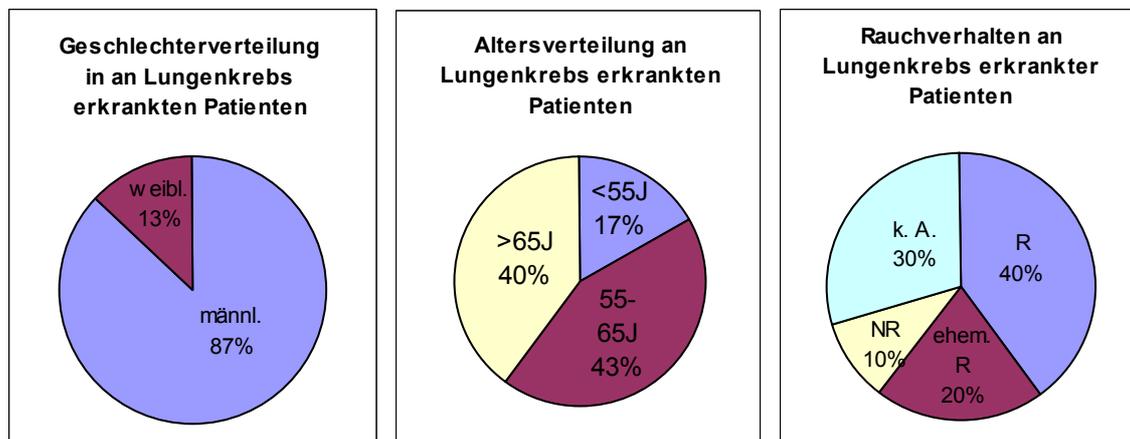


Abbildung 14: Zusammenstellung statistischer, Lungenkrebs- spezifischer Daten anhand der Patientendaten (2002-2005, MLU) aus Tabelle 3

Vergleicht man die erhaltenen statistischen Daten mit der bundesweiten Datenerfassung des Diagnosejahrs 2000 [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland, 2004], liegt der Frauenanteil mit 14% an Krebserkrankungen etwas niedriger

4. Ergebnisse

(ca. 25% bundesweit im Jahr 2000). Das mittlere Diagnosealter liegt bei 64 Jahren und ist damit vergleichbar mit dem bundesweiten Durchschnitt (67-68 Jahre).

Lungenkrebskrankungen treten im Vergleich zu anderen Krebskrankungen gehäuft in Altersgruppen ab ca. 50 Jahren auf. Dieser Sachverhalt lässt die Schlussfolgerung zu, dass Umwelteinflüsse wie Rauchen, Schadstoffkonzentrationen am Arbeitsplatz (Asbest) aber auch Stäube/Partikel eine wesentliche Ursache für die Lungenkrebsentwicklung darstellen und genetisch bedingte Mutationen eher eine untergeordnete Rolle spielen. Eine wesentliche Ursache für die Lungenkrebsentstehung ist das Rauchen. Dieser Sachverhalt konnte auch in den Patientendaten bestätigt werden (Abbildung 14). Jedoch machten 31 % der Patienten keine Angabe zu dem Rauchverhalten. Aufgrund der statistischen bundesweiten Korrelation von Patienten mit Lungenkrebs, bei denen bis zu 90 % der Männer und 60 % der Frauen Raucher waren, ist zu vermuten, dass die Patientengruppe ohne Angaben einen hohen Anteil an Rauchern bzw. ehemaligen Rauchern aufweist.

Zum Vergleich zwischen Primärzellkulturen und Tumorzelllinien verwendeten wir die Tumorzelllinie A549. Bereitgestellt wurde die Zelllinie von Prof. Wiebel, Institut für Toxikologie, Gesellschaft für Strahlenforschung in München. Diese Permanentlinie wurde klassifiziert als Adenokarzinom mit AII Zellmorphologie, welche p53 positiv ist. Die Zelllinie zeichnet sich durch ein schnelleres Wachstum gegenüber den Primärzellen aus. Viele Zellparameter, wie die Wachstumsrate oder auch Chromosomenzahl sind in Permanentlinien durch die hohe Kultivierungsdauer verändert [Morgan et al 1994]. Somit diente die Tumorzelllinie als Vergleichsbasis gegenüber den Primärkulturen. Der Vorteil liegt hier in der unbegrenzten Kultivierbarkeit auf Kosten der Apoptose. Ebenfalls zeigen sich Einflüsse auf die Differenzierung, den Metabolismus und die Ausbildung von Mutationen.

4.1.2. Die mRNA-Grundexpression verschiedener MRP-Isoformen in humanen Lungenzellen in Kultur

Art der Zellkultur, Zeitdauer aber auch Mediumeinflüsse können veränderte Genexpression bedingen. Dabei spielt die Kultivierungsdauer eine wesentliche Rolle. Bei den immortalisierten Zellkulturen kann man oft signifikante Unterschiede im Vergleich zur Ausgangskultur feststellen. Zum Beispiel erhöht sich die Zellteilungsrate der Zellen mit Dauer der Zellkultur [Morgan et al., 1994]. Da in dieser Arbeit sowohl eine immortalisierte Zelllinie sowie 2 verschiedene Lungengewebeulturen (NHBEZ und PLZ) verwendet wurden, mussten die verschiedenen Grundexpressionen der interessierenden MRP-Transporter verglichen werden.

4. Ergebnisse

Für die Bestimmung der RNA-Expression wurden unbehandelte Zellkulturproben verschiedener Patienten bzw. unterschiedliche Passagen der Tumorzelllinie A549 verwendet und deren RNA isoliert. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 2 µg RNA eingesetzt. Die Expressionsdaten wurden auf GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ein wichtiges Enzym aus der Glycolyse) als Referenzgen bezogen. In den Experimenten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Expression von GAPDH in den verschiedenen Lungenzellen. Ebenso war die Expression durch Prostaglandine unbeeinflusst.

In die Entscheidung der Wahl von Referenzgenen wurden 3 verschiedene *Housekeeping* Gene einbezogen: GAPDH, β -Actin und 18S rRNA. β -Actin wurde hinsichtlich schlechter Reproduzierbarkeit in der *realtime*-RT-PCR verworfen. Der Vergleich zwischen 18S rRNA und GAPDH wurde unter Behandlung mit Prostaglandin F₂ α an Bronchialepithelzellen untersucht. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Verhalten der *Housekeeping* Gene ohne Einfluss von Prostaglandin F₂ α auf die Expression (Abbildung 15).

Aufgrund der zusätzlich notwendigen Verdünnung der cDNA für die Analyse von 18S rRNA und aufgrund der stabilen Expression von GAPDH entschieden wir uns für GAPDH als Referenzgen.

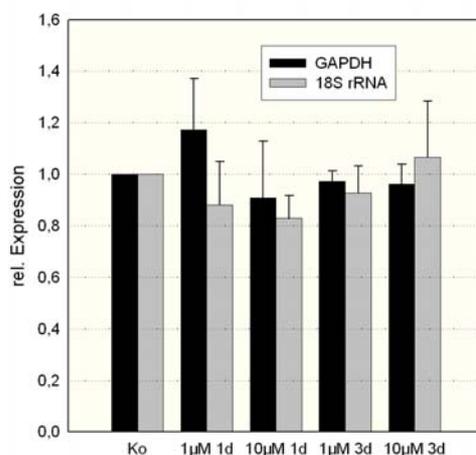


Abbildung 15: Housekeeping Genexpression von GAPDH und 18S rRNA im Vergleich in NHBEZ (n=3) nach Behandlung mit Prostaglandin F₂ α

In Abbildung 16 sind die Expressionsunterschiede der MRP-Isoformen MRP1, MRP3, MRP4 und MRP5 dargestellt. In den Primärkulturen der peripheren Lunge und den Bronchialzellen zeigten sich kaum Unterschiede in der Grundexpression verschiedener MRP-Isoformen. Es war zwar ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Expression von MRP5 (p=0,048) zu erkennen, aber dieser Unterschied mit einem Faktor von 1,3 sollte keine physiologische

4. Ergebnisse

Auswirkung haben. Die Unterschiede zwischen den Primärkulturen und der Tumorzelllinie waren deutlich zu erkennen. Mit einem Faktor von 4,9 ($p=0,011$) für MRP1, einem Faktor von 124 ($p=0,007$) für MRP3 und einem Faktor von 13 ($p<0,001$) für MRP4 zeigte die Tumorzelllinie A549 gegenüber den Primärzellkulturen eine erhöhte Expression dieser MRP-Isoformen. MRP5 war im Vergleich zu den anderen Isoformen in der Tumorzelllinie runterreguliert. Die Expression entsprach noch 30% der Primärzellen ($p<0,001$). Hier wird deutlich, dass in der MRP-Expression die Kulturbedingungen eine wesentliche Rolle spielen. Genexpression wird sehr differenziell gesteuert. Die Unterschiede in der Expression können aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung des Mediums hinsichtlich des serumhaltigen DMEM-Mediums für die Tumorzelllinie im Gegensatz zur serumfreien Kultivierung von Primärzellkulturen entstehen. Hierbei ist auf die Regulation durch unterschiedliche Hormone und Wachstumsfaktoren zu achten. Ein wesentlicher Aspekt ist auch die Kulturdauer. Während die Primärzellen eines Patienten maximal 6 Monate kultiviert werden konnte, wird die Tumorzelllinie A549 seit mehreren Jahren am Institut kultiviert. Lehmann et al. (2005) beschrieb in NHBEZ jedoch eine stabile Expression des MRP1-Proteins in Abhängigkeit von der Generationenanzahl. Wurden die Kulturen jedoch gesplittet, zeigte sich eine mehr als 3fache Erhöhung der mRNA Expression von MRP1.

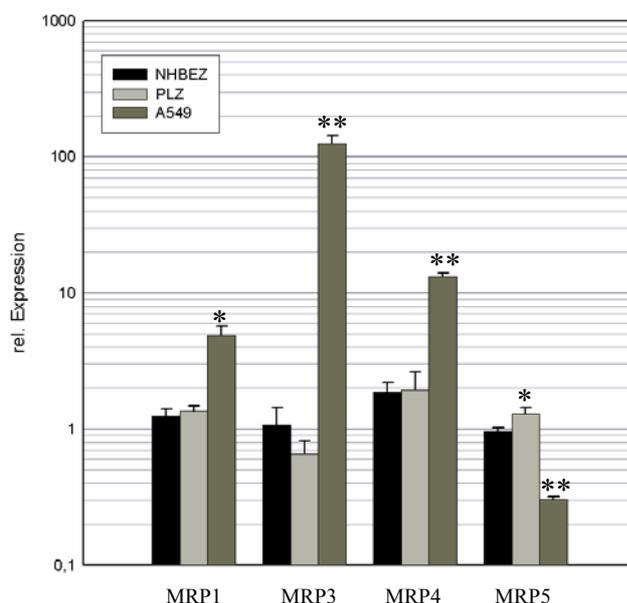


Abbildung 16: Grundexpression verschiedener MRP-Isoformen (MRP1, MRP3, MRP4, MRP5) in verschiedenen humanen Lungenzellen (NHBEZ; PLZ und A549) semiquantitative Auswertung mit GAPDH als Referenzgen; rel. Expression \pm SE (Standard Error), $n=4$
Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Ein weiterer Grund für die unterschiedliche MRP-Expression liegt in der unterschiedlichen Herkunft der Zellen. Während die Tumorzelllinie aus einem Adenokarzinom stammt, stammen die Primärkulturen von pathologisch beurteilten normalen Zellen ab. Erhöhte Expression von MRP-Transportern in verschiedenen Tumoren mit Chemotherapieresistenzen ist in der Literatur beschrieben [Hsia et al 2002; Steinbach et al 2003].

4.2. Einfluss von Prostaglandin E2 auf humane Lungenzellen

Prostaglandin E2 zeigt viele zelluläre Effekte, wie zum Beispiel Regulation des vaskulären Muskeltonus, der zellulären Proliferation, der Interleukin 6-Produktion oder der Synthese von Adhäsions-Molekülen [Largo et al., 2004]. Aufgrund der Regulation des Zellwachstums und des Einsatzes von Ethanol als Lösungsmittel untersuchten wir zuerst die Effekte auf die zelluläre Vitalität. Im Anschluss wurde die Modulation der MRP-Expression nach Behandlung mit Prostaglandin E2 untersucht.

4.2.1. Vitalitätstest nach Behandlung mit Prostaglandin E2

Zur Testung der Vitalität und um zytotoxische Effekte auf metabolischer Ebene auszuschließen verwendeten wir den MTT-Test. Dieser Test basiert auf der Umsetzung des gelben Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in das blaue wasserunlösliche Tetrazoliumsalz durch mitochondrielle Dehydrogenasen. Die Umsetzung des Farbstoffes ist proportional zur Überlebensrate der Zellen.

Für den Test wurden menschliche Lungenzellen (Bronchialzellen und periphere Lunge) sowie die humane Tumorzelllinie A549 eingesetzt. Die Zellen wurden für 24 h mit Prostaglandin E2 (0; 1, 5 und 10 μ M) behandelt. Für Prostaglandin E2 wurden 2 Ethanolkontrollen (0,6 und 6 mM) mitgeführt, da Ethanol als Lösungsmittel für Prostaglandin E2 diente. Es waren 2 Arten der Kontrolle erforderlich: 1) native Kontrolle; 2) Vehikelkontrolle (Ethanol) Die relative Vitalität wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Es wurden 2 verschiedene Ethanolkonzentrationen (0,6 und 6 mM) eingesetzt, entsprechend dem Ethanolgehalt in den 1 μ M bzw. 10 μ M Prostaglandin E2 behandelten Proben.

4. Ergebnisse

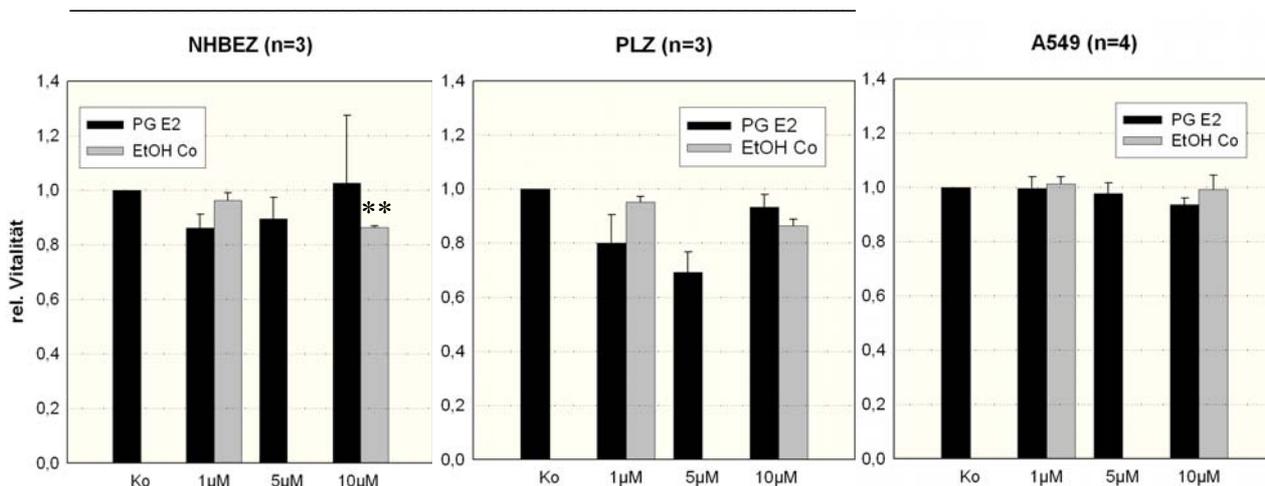


Abbildung 17: Vitalitätstest nach Behandlung humaner Lungenzellen (NHBEZ, PLZ und A549) mit Prostaglandin E2 und Ethanol als Lösungsmittel

Die eingesetzten Prostaglandin E2 Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen in Kultur in Bronchialzellen (Abbildung 17). Bei den Bronchialepithelzellen zeigte sich ein signifikantes Absinken ($p < 0,001$) der Vitalität nach Ethanolbehandlung (6 mM) auf 86%. Dies erreichte jedoch nicht den zytotoxischen Grenzbereich von 80 %. Bei der Behandlung mit Prostaglandin E2 war dieser Effekt nicht zu beobachten. Die peripheren Lungenzellen zeigten nach Prostaglandin E2 Behandlung einen leichten Rückgang der Vitalität, bei 5 µM sogar unter 80 % ohne Signifikanz. Ein solcher Effekt konnte bei den Ethanolkontrollen nicht beobachtet werden. Hingegen war bei 10 µM Prostaglandin E2 Konzentration wieder ein Anstieg der Vitalität zu erkennen. Aufgrund der Erhöhung bei 10 µM könnte Prostaglandin E2 in peripheren Lungenzellen eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung bei 5 µM PG E2-Konzentration bewirken. Die Tumorzelle A549 zeigt kein solches Verhalten. Hier waren keine Unterschiede in der Vitalität im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

4.2.2. Einfluss von Prostaglandin E2 auf die mRNA-Expression verschiedener MRP-Isoformen

Für die Bestimmung der RNA-Expression wurden die Zellen über 24 und 72 h mit 2 verschiedenen Konzentrationen an Prostaglandin E2 (1, 10 µM) behandelt. Die Behandlungszeiten und Konzentrationen sind angelehnt an die bei Ziemann et al. (2002) beschriebenen Kulturbedingungen bei der Reaktion von *mdr1b* auf die Prostaglandin E2-Behandlung. Zusätzlich wurden Ethanolkontrollen über 24 und 72 h mitgeführt, um Lösemittelleffekte auszuschließen. Nach erfolgter Behandlung wurden die Zellen mit TRItidy

4. Ergebnisse

G (Appllichem) geerntet und die RNA isoliert. Nach Umschreiben in cDNA wurde die Expression semiquantitativ mittels Realtime-PCR unter Verwendung von GAPDH, welches keine Effekte auf die Prostaglandin E2-Behandlung zeigte, als Referenzgen ermittelt. Die ermittelten Expressionsdaten wurden auf eine unbehandelte Kontrolle (wird gleich 1 gesetzt, nicht im Diagramm dargestellt) bezogen. Der statistische Vergleich wurde auf die Ethanolkontrollen bezogen.

In Abbildung 18 ist das Expressionsverhalten des MRP1-Transporters in verschiedenen humanen Lungenzellen nach Behandlung mit Prostaglandin E2 dargestellt.

In Bronchialepithelzellen konnte eine Erhöhung der MRP1 Expression um einen Faktor von $2,4 \pm 0,35$ nach 72 h bei einer Prostaglandinkonzentration von $10 \mu\text{M}$ im Vergleich zur Ethanolkontrolle beobachtet werden. In peripheren Lungenzellen, wie auch in der Tumorzelllinie A549 war dieser Effekt nicht zu erkennen.

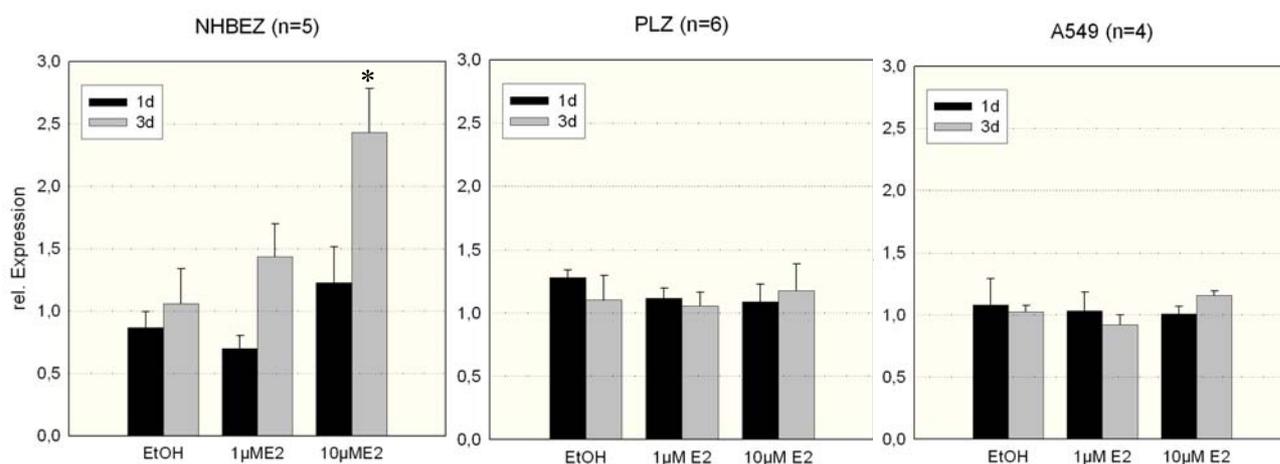


Abbildung 18: MRP1 (mRNA)-Expression in humanen Lungenzellen, semiquantitative Auswertung im Vergleich zu einer unvorbehandelten Kontrolle. Als Referenzgen diente GAPDH, rel. Expression \pm SE, * $p=0,023$ zur Ethanolkontrolle

Abbildung 19 zeigt die mRNA-Expression des Efflux-Transporters MRP3 in den Lungenzellen unter Prostaglandin E2-Behandlung. Die Primärkulturen des Bronchus und der peripheren Lunge zeigten eine erhöhte dosisabhängige MRP3-RNA Expression mit einem Faktor von $2,6 \pm 0,75$ (SE) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch hohe individuelle Reaktionsschwankungen von Faktoren zwischen 1,2 und 4,7 (Tabelle 4) konnten keine statistisch abgesicherten Unterschiede ($p=0,122$) im Vergleich zur Ethanolkontrolle ermittelt werden. In den peripheren Lungenzellen war nach 72 h Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ E2 mit einem Faktor von $2,9 \pm 0,98$ ebenso eine Erhöhung feststellbar.

4. Ergebnisse

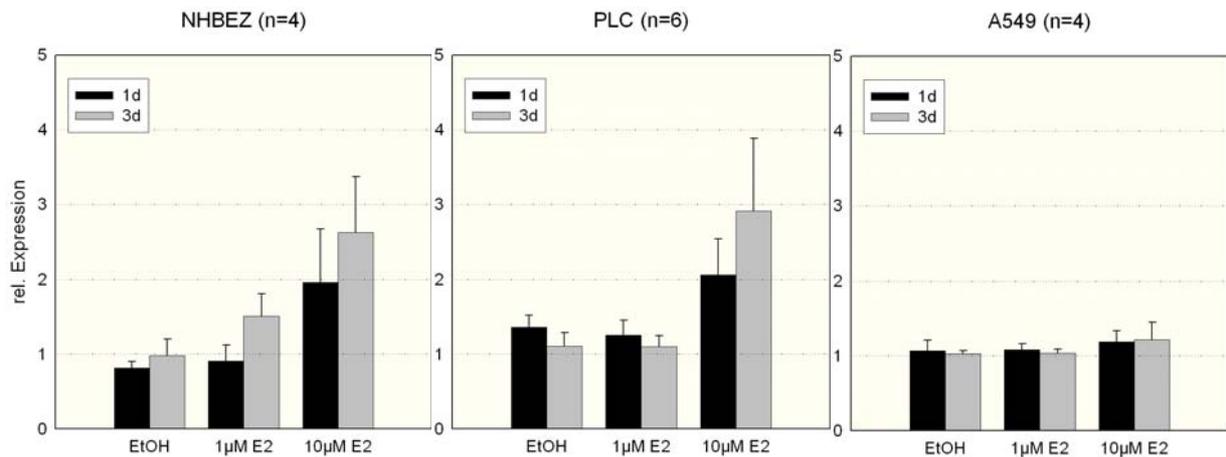


Abbildung 19: MRP3 (mRNA)-Expression in humanen Lungenzellen, semiquantitative Auswertung im Vergleich zu einer unvorbehandelten Kontrolle. Als Referenzgen diente GAPDH, rel. Expression \pm SE

Die Faktoren schwankten jedoch in einem Bereich von 0,9 bis 6,9 (Tabelle 4). Diese Schwankung erlaubte keine statistisch signifikante Aussage im Vergleich zur Ethanolkontrolle ($p=0,323$). Auf die Tumorzelle A549 hatte die Prostaglandin E2 Behandlung keinen Einfluss.

Patient	Lunge/ Bronchus	Faktoren EtOH/PG E2	Diagnose	Alter	Geschlecht	R/NR	Besonderheiten
156	Bronchus	0,8/1,8	Pneumonie	72	m	>30J NR	Mischstaub
157	Bronchus	1,2/2,7	Narben-Ca.	65	m	R	Mischstaub
162	Bronchus	0,4/1,3	NSCLC	52	m	R	Radio/Chemotherapie
163	Bronchus	1,4/4,7	Metastase Nierenca.	64	m	Seit 1984 NR	-
165	Lunge	1,5/4,7	Kein Tumor	61	w	NR	-
166	Lunge	0,9/1,1	NSCLC	50	m	R	-
171	Lunge	1,2/6,9	NSCLC	76	m	6J NR	Asbestbelastung
172	Lunge	1,6/1,4	NSCLC	61	m	15J NR	-
173	Lunge	0,4/0,9	-	60	m	-	-
175	Lunge	1,1/2,4	NSCLC	51	m	-	-

Tabelle 4: Aufschlüsselung der einzelnen Patientendaten in Bezug auf die Reaktion von MRP3 auf Prostaglandin E2 im Vergleich zur Kontrolle mit Ethanol

4. Ergebnisse

In den Einzelreaktionen zeigen sich im Vergleich zur Ethanolkontrolle in allen Bronchialkulturen (mit unterschiedlicher Intensität) nicht jedoch in allen Lungenzellkulturen (Patienten 166 und 172) eine Erhöhung der Expression im Vergleich zur Ethanolkontrolle. Bei beiden Tumoren handelte es sich um Nichtkleinzellige Tumore, beide Tumorpatienten sind bzw. waren Raucher. Jedoch ergab die Patientenanalyse keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu den reagierenden Gewebeproben

Die mRNA-Expression von MRP4 nach PG E2-Behandlung sind in Abbildung 20 dargestellt.

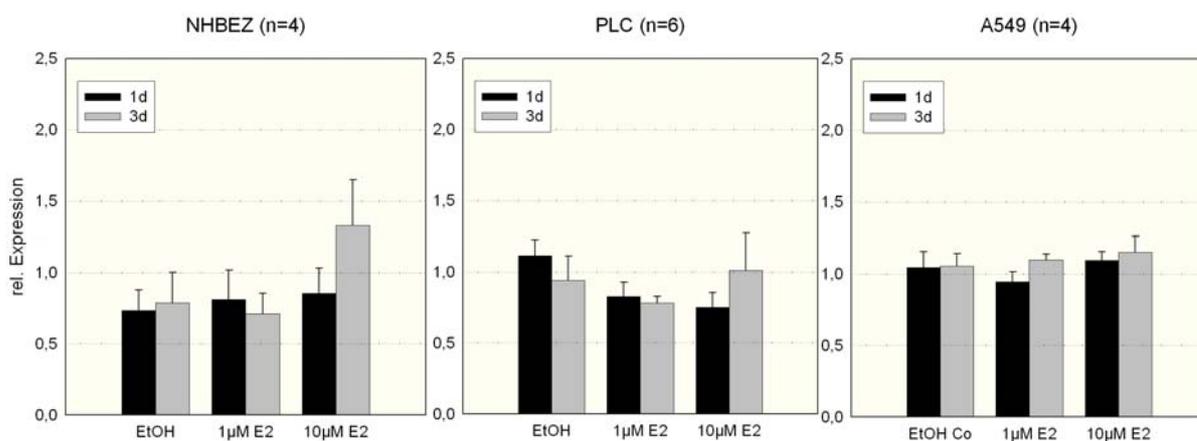


Abbildung 20: MRP4-Expression in humanen Lungenzellen nach Behandlung mit Prostaglandin E2 über 24 und 72 h, semiquantitative Auswertung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle, als Referenzgen diente GAPDH, rel. Expression \pm SE

Die Expression des MRP4-Transporters zeigte keine Veränderung nach Behandlung mit Prostaglandin E2. Mit einem Faktor von $1,3 \pm 0,31$ waren keine Erhöhung der Expression von MRP4 in den Bronchialepithelzellen zu beobachten. Ebenso zeigten die peripheren Lungenzellen (Faktor: $1,0 \pm 0,26$) und die Tumorzelle (Faktor: $1,1 \pm 0,11$) keine Erhöhung der Expression von MRP4.

In humanen Bronchialepithelzellen zeigte MRP5 (Abbildung 21) eine grenzwertig erhöhte Expression nach 3-tägiger Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ Prostaglandin E2 (Faktor: $1,8 \pm 0,61$). Aufgrund hoher Patienten- bezogener Varianzen mit Faktoren zwischen 1,1 und 3,7 konnte jedoch keine Signifikanz ($p=0,277$) im Vergleich zur Ethanolkontrolle festgestellt werden. In peripheren Lungenzellen und in der Tumorzelle A549 konnte kein Effekt von Prostaglandin E2 auf die MRP5-Expression beobachtet werden.

4. Ergebnisse

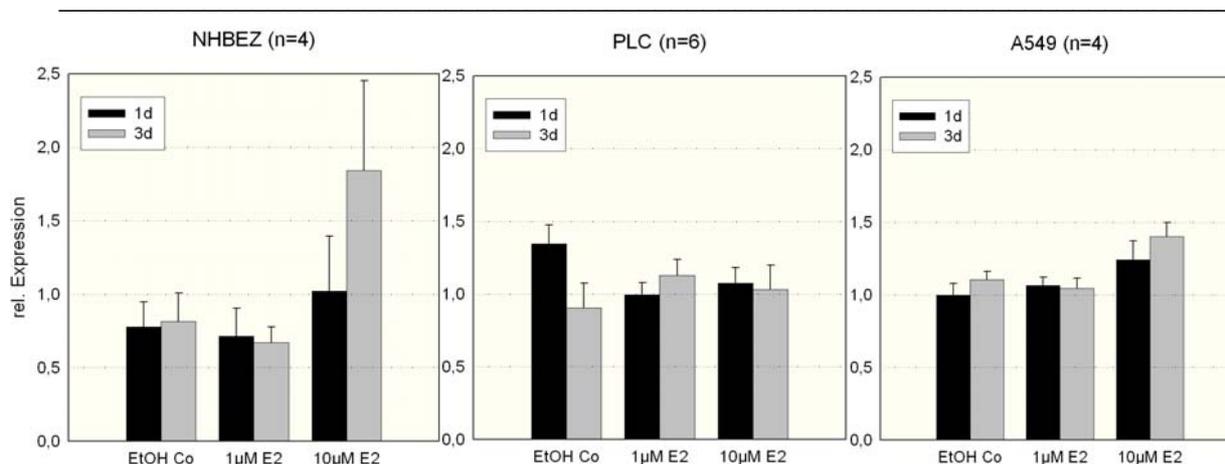


Abbildung 21: Expression von MRP5 (mRNA) nach Behandlung mit Prostaglandin E2 in humanen Lungenzellen in Kultur semiquantitative Auswertung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle, als Referenzgen diente GAPDH, Rel. Expression \pm SE,

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MRP1 auf die Behandlung mit Prostaglandin E2 mit einer gesteigerten Expression reagierte (Abb. 18). MRP3 (Abb. 19) und MRP5 zeigten (Abb. 21) nach 3 Tagen Behandlung eine grenzwertige nicht signifikante Erhöhung der Expression. Die beobachteten Reaktionen beschränken sich hauptsächlich jedoch auf die normal humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und konnten in den peripheren Lungenzellen nur bei MRP3 beobachtet werden. Dabei zeigten 2 von 6 Patienten keine Erhöhung gegenüber der Vehikelkontrolle mit Ethanol in den peripheren Lungenzellen. In der Tumorzelle waren keine Expressionsunterschiede der MRP-Proteine nachweisbar.

4.2.3. MRP1-Transportaktivität in humanen Lungenzellen nach Behandlung mit Prostaglandin E2

Neben der Expressionserhöhung spielen Regulationsmechanismen posttranskriptioneller Natur (Bsp. Ubiquitinabbau, Abspalten von Signalpeptiden) bei der Regulierung von Proteinen und deren Funktion eine wesentliche Rolle. Um einen physiologischen Effekt der Expressionserhöhung von MRP1 nachzuweisen, verwendeten wir die Einzelzellfluoreszenzmessung mit CDF (spezifisches Substrat von MRP1), welches passiv in die Zelle diffundiert und aktiv über MRP1 heraus transportiert wird. Eine verringerte Akkumulation von CDF in der Zelle weist somit auf eine erhöhte Transportaktivität hin.

Die Lungenzellen wurden über 1 bis 72 h mit Prostaglandin E2 (10 µM) und darauf folgend 4 h mit CDF behandelt. Die Akkumulation des Farbstoffes wurde mittels Einzelzellfluoreszenzmessung am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Eine erniedrigte Akkumulation des

4. Ergebnisse

Farbstoffes weist auf eine erhöhte Transportaktivität aus der Zelle hin. Ethanolkontrollen wurden über die Zeit mitgeführt, um Lösemiteleinflüsse auszuschließen.

In Abbildung 22 sind die intrazellulären CDF-Gehalte nach erfolgter Behandlung mit Prostaglandin E2 und Ethanol dargestellt. Aufgrund der Verringerung des intrazellulären CDF-Gehaltes nach 72 h ($p < 0,001$) konnte gezeigt werden, dass nach Prostaglandin E2-Behandlung die Transportaktivität von MRP1 in NHBEZ erhöht war. Diese Erhöhung war ebenso wie die Expressionserhöhung nach 72 h in den Bronchialepithelzellen erkennbar (Abb. 22). Ein Lösemiteleinfluss von Ethanol konnte nicht festgestellt werden. Die peripheren Lungenzellen und die Permanentzelllinie A549 zeigten keine Veränderung des intrazellulären CDF-Gehaltes. Die transkriptionelle Expressionserhöhung war im Vergleich dazu auch nur in den Bronchialzellen zu erkennen

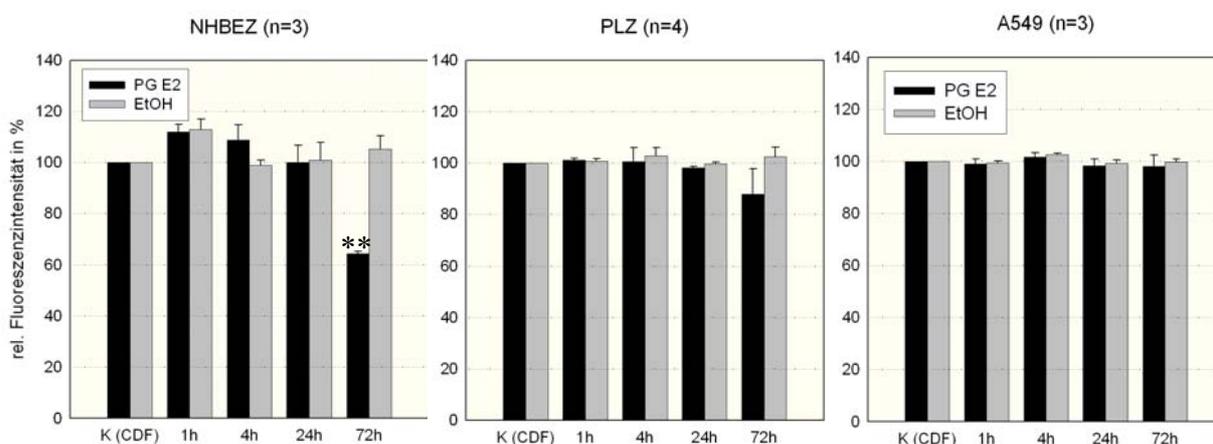


Abbildung 22: CDF-Akkumulation in humanen Lungenzellen nach Behandlung mit Prostaglandin E2. Gemessen wurde die relative Fluoreszenzintensität des spezifischen MRP1-Substrates CDF über Einzelzellfluoreszenzmessung. ; Ethanol als Lösemittel-Kontrolle, Angabe der Daten: Fluoreszenzintensität \pm SE, Signifikanzniveau: ** $p < 0,001$

4.2.4. Vorkommen und Lokalisation der Prostaglandin E2 Rezeptoren EP1, EP2, EP3 und EP4

Für die Vermittlung von Prostaglandin E2-spezifischen Signalen in der Zelle sind 4 membranständige Rezeptoren (EP1, EP2, EP3 und EP4), die entsprechend der G-Protein Kopplung unterschieden werden und dadurch unterschiedliche Signalkaskaden anschalten (cAMP, IP3, ERK), verantwortlich. Hinsichtlich ihrer Struktur ähneln sie dem Thromboxan A2-Rezeptor.

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionen der MRP-Proteine auf die Prostaglandin E2-Behandlung in den verschiedenen Lungenzellen untersuchten wir die Proteingehalte und

4. Ergebnisse

Lokalisation der 4 verschiedenen Subtypen des Rezeptors. Zur Detektion dieser Rezeptoren verwendeten wir 2 verschiedene Methoden: den Western Blot für die Quantifizierung sowie die Immunzytochemie für die Lokalisation in der Zelle.

Western Blot-Analyse: Für den Western Blot wurden unbehandelte Zellen mit Tritidyl geerntet und das Protein isoliert. Es wurden ca. 30-40 µg Gesamtprotein für die Versuche eingesetzt. Als Referenzprobe für den Vergleich wurde in mehreren Versuchen die gleiche Probe (NHBEZ: Pat. 164 Gen. 2 Pas. 3) eingesetzt.

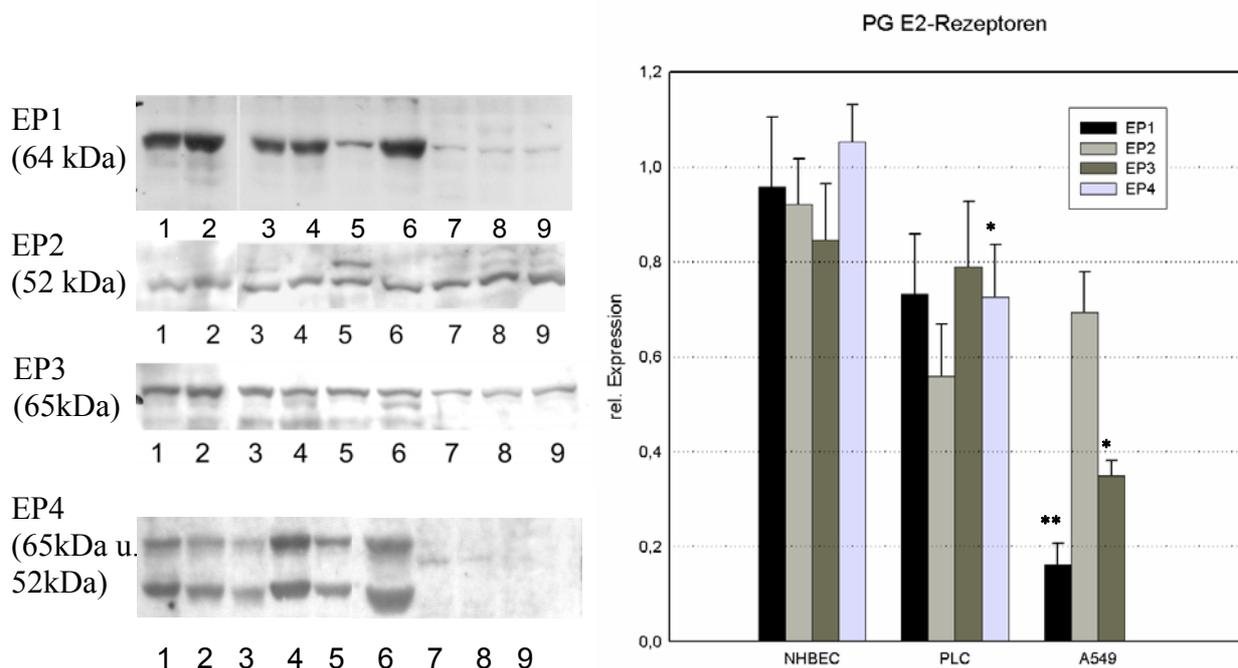


Abbildung 23: repräsentativer Western Blot (links) und densitometrische Auswertung aus 3 Western Blots (rechts der Prostaglandin E2- Rezeptoren in humanen Lungenzellen: NHBEZ (1-3), PLZ (4-6) und A549 (7-9); Patientenanzahl: 5 (NHBEZ), 5 (PLC), 6 (A549); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$)

Die Tumorzelle A549 zeigt eine deutlich erniedrigte Proteinexpression von EP1 ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Bronchialzellen und Lungenzellen (Abb. 23). Für EP2 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Lungenzellkulturen ermittelt werden. Jedoch zeigte die periphere Lunge die Tendenz zum geringeren EP2-Gehalt. Bei der Tumorzelle A549 war eine deutlich verringerte EP3 Expression im Vergleich zu NHBEZ ($p = 0,01$) und PLC ($p = 0,02$) zu erkennen, während EP4 nicht detektiert wurde. Eine verringerte EP4 Expression konnte auch in den peripheren Lungenzellen im Vergleich zu den

4. Ergebnisse

Bronchialzellen ($p=0,05$) beobachtet werden. Aufgrund hoher interindividueller Schwankungen war nur eine grenzwertig verringerte Expression von EP1 und EP2 in den peripheren Lungenzellen zu erkennen. Bei den Kulturen verschiedener Patienten handelte es sich ausschließlich um Männer im Alter zwischen 50 und 76 Jahren, die teilweise mit Asbest belastet waren. Zwei der Patienten waren Raucher. Bei 3 Patienten gab es keine Informationen über das Rauchen. Vier Patienten gehören zur Gruppe ehemaliger Raucher (zwischen 15 und 6 Jahren Nichtraucher). Die verschiedenen Patientenanamnesen können einen Einfluss auf die differenzielle Proteinexpression in den Primärkulturen haben. Die Ergebnisse aus dem Western Blot können ein Erklärungsansatz für die fehlende MRP-Expressionssteigerung in peripheren Lungenzellen aber vor allem für die fehlenden Reaktionen auf die Prostaglandin E2-Behandlung der Tumorlinien A549 liefern.

Immunzytochemie: Für die zelluläre Lokalisation wurden die Zellen auf Borosilikatdeckgläschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80-90% wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Für den immunzytochemischen Nachweis verwendeten wir dieselben Primärantikörper (bis auf EP4 Chayman Chemicals) wie für den Western Blot. Als Sekundärantikörper setzten wir CY3 markierte Antikörper ein.

Der kontraktile Rezeptor EP1 (Abb. 24), dessen Signal durch intrazelluläre Kalzium-Erhöhung vermittelt wird, konnte sowohl in den Primärkulturen der Lunge als auch des Bronchus nachgewiesen werden.

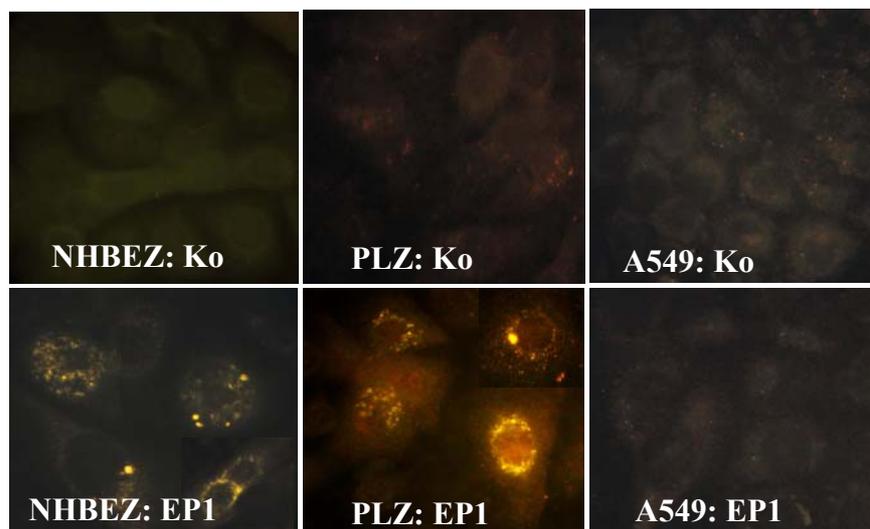


Abbildung 24: Immunzytochemische Detektion des Prostaglandin E2-Rezeptors EP1 in humanen Lungenzellen in Kultur (NHBEZ, PLZ und A549). Die Kontrollen sind Negativkontrollen, die nur mit dem Sekundärantikörper (CY3 markiert) behandelt wurden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung: 1000fach)

4. Ergebnisse

EP1 wurde hier hauptsächlich intrazellulär nachgewiesen. Jedoch konnte EP1 nicht in allen Zellen der Primärkulturen der Lunge und des Bronchus in der Immunofluoreszenz nachgewiesen werden. Der Anteil der fluoreszierenden Zellen lag zwischen 20 und 40 Prozent. In der Tumorzelle A549 war keine Fluoreszenz zu beobachten. Dies bestätigt die Ergebnisse aus dem Western Blot (Abb. 23), wo der Rezeptor auch nur in sehr geringen Mengen in der Tumorzelle nachgewiesen werden konnte.

In Abbildung 25 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Prostaglandin E2 Rezeptors EP2 in den Lungenzellkulturen dargestellt. Der EP2-Rezeptor, der vorrangig relaxierende Wirkung vermittelt (Narumya et al., 1999), konnte in allen Lungenzellkulturen jedoch mit unterschiedlicher Lokalisation nachgewiesen werden.

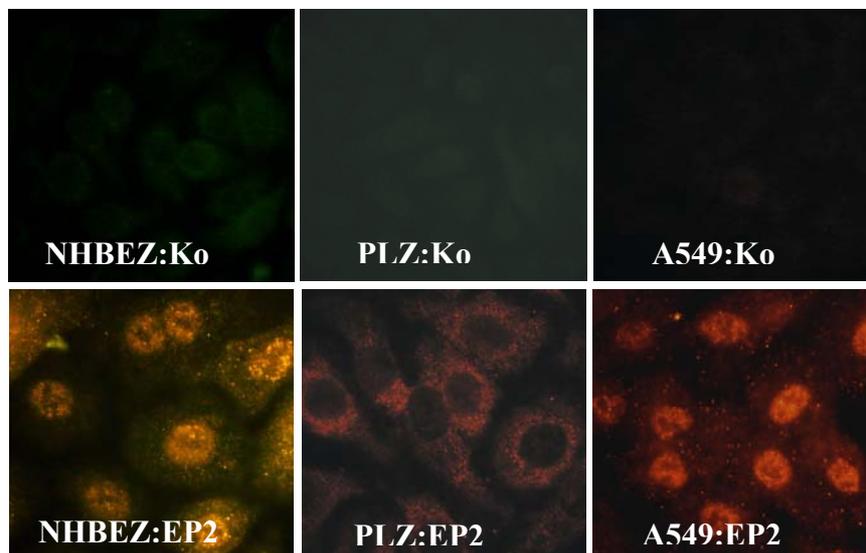


Abbildung 25: Immunzytochemische Detektion des Prostaglandin E2-Rezeptors in humanen Lungenzellen in Kultur (NHBEZ, PLZ und A549). Die Kontrollen sind Negativkontrollen, die nur mit dem Sekundärantikörper (CY3 markiert) behandelt wurden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung: 1000fach)

Die Fluoreszenz war in allen Zellen der Zellkulturen nachweisbar. Während in den peripheren Lungenzellen die Fluoreszenzsignale im Zytoplasma nachweisbar waren, konnte in Bronchialzellen und in der Tumorzelle ein deutliches intrazelluläres Signal am Zellkern beobachtet werden. Aufgrund dieser Lokalisation kann das Protein vermutlich nicht funktionell aktiv sein. Eine Möglichkeit für funktionell aktive Lokalisation bietet möglicherweise die *dry-wet* Kultur, wobei die Zellen auf Membranen mit einer apikalen der Luft zugewandenen Seite und einer basalen Seite, über die Nährstoffe aus dem Kulturmedium entnommen werden, wachsen. Veränderte Lokalisation unter *dry-wet* Kultur konnte für MRP1

4. Ergebnisse

und MRP2 in NHBEZ nachgewiesen werden [Torky et al., 2005]. Eine andere Möglichkeit liegt in der Induzierbarkeit von EP2 durch inflammatorisch wirkende Substanzen wie Lipopolysaccharide.

EP3 wird den inhibitorischen Prostaglandin E2 Rezeptoren zugeordnet [Narumiya et al., 1999]. Bisher sind 8 verschiedene Isoformen (EP3.1; EP3.II; EP3.III; EP2.IV; EP3.V; EP3.VI; EP3.e; EP3.f) des Rezeptors bekannt [Heather et al., 2004]. Die immunhistochemischen Fluoreszenzaufnahmen des Prostaglandin E2 Rezeptors EP3 sind in Abbildung 26 dargestellt.

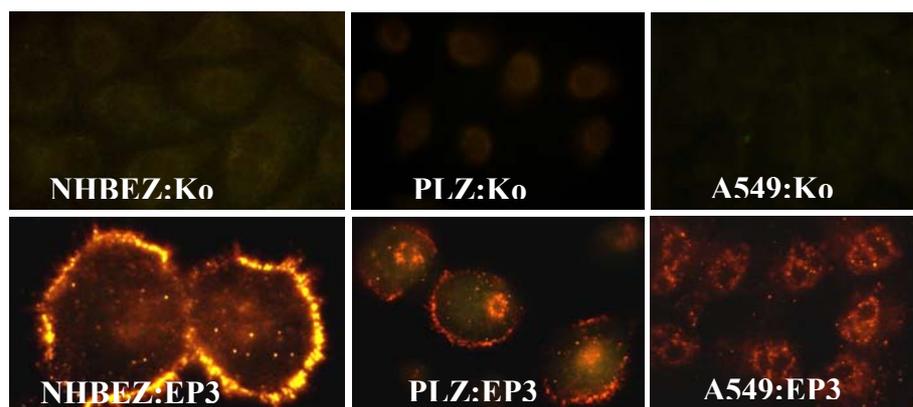


Abbildung 26: Immunzytochemische Detektion des Prostaglandin E2 Rezeptors EP3 in humanen Lungenzellen in Kultur (NHBEZ, PLZ und A549). Die Kontrollen sind Negativkontrollen, die nur mit dem Sekundärantikörper (CY3 markiert) behandelt wurden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung: 1000fach)

Ein positives Fluoreszenzsignal von EP3 konnte in nahezu allen Zellen beobachtet werden. In primären Bronchial- und Lungenzellen befindet sich der Prostaglandin E2 Rezeptor EP3 hauptsächlich an der Zellmembran. Eine geringe Expression konnte auch im Zellinneren beobachtet werden. Bei der Adenokarzinom-Zelllinie konnte der Rezeptor jedoch nur intrazellulär beobachtet werden.

EP4 ist ähnlich aufgebaut wie EP2 und gehört zu den relaxierenden Rezeptoren. Ebenso wie EP2 ist er an Gs-Typ G-Protein gekoppelt und vermittelt Signale über cAMP [Hata et al., 2004]. Ein Unterschied liegt in der Inaktivierung der EP4 Signalkette durch Internalisierung des EP4-Rezeptors in das Zytoplasma. Damit ist wahrscheinlich die Wirkungsdauer von Prostaglandin E2 bei EP4-gesteuerten Signalkaskaden begrenzt [Desai et al., 2000].

In Abbildung 27 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des EP4-Rezeptors in den 3 verschiedenen Lungenzellkulturen abgebildet. In den Primärkulturen der Lunge, das heißt sowohl bei den Bronchialzellen, wie auch den peripheren Lungenzellen ist EP4 im

4. Ergebnisse

zytoplasmatischen aber im membrannahen Bereich lokalisiert. Die Zelllinie A549 zeigte kein deutliches Fluoreszenzsignal. Wie auch im Western Blot (Abb. 23) konnte EP4 nicht in der Tumorzelllinie nachgewiesen werden.

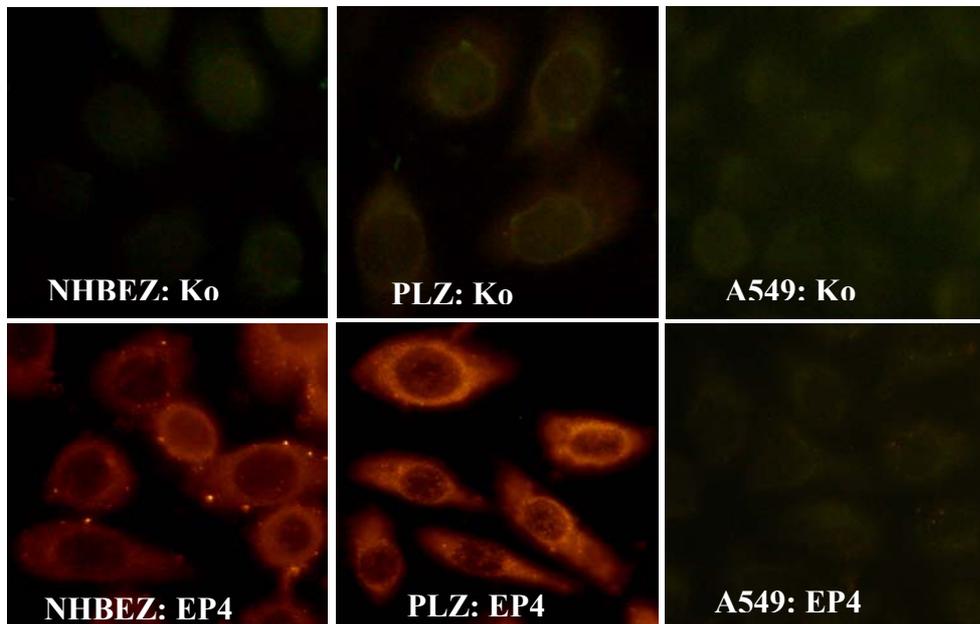


Abbildung 27: Immunzytochemische Detektion des Prostaglandin E4-Rezeptors in humanen Lungenzellen in Kultur (NHBEZ, PLZ und A549). Die Kontrollen sind Negativkontrollen, die nur mit dem Sekundärantikörper (CY3 markiert) behandelt wurden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung: 1000fach)

Für die Signalübertragung von Prostaglandin E2 ist es notwendig, dass die Rezeptoren membranständig vorliegen. Eine membranständige Lokalisation konnte jedoch nur für EP3 eindeutig nachgewiesen werden. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede auch zur Tumorzelllinie, wo ein Nachweis von EP3 nur intrazellulär gezeigt werden konnte. Aufgrund des positiven Nachweises der Rezeptoren im Western Blot, kann es sich bei intrazellulärer Lokalisation um Vorstufen der aktiven Rezeptoren oder auch Abbauprodukte, wie bei EP4 durch Desai et al. (2000) beschrieben handeln. Eine mögliche Ursache für die falsche Lokalisation des Rezeptors liegt möglicherweise in den Kulturbedingungen.

Um näher an physiologische Bedingungen der Lungenzellkultur heranzukommen, wird im Institut ein neues Verfahren der Lungenzellkultur auf Membraninserts erprobt, welches eine luftzugewandte und eine dem Medium zugewandte Seite aufweist. Erste Versuche an MRP1 und MRP2 zeigten in der Immunzytochemie eine veränderte Lokalisation des Proteins [Torky et al., 2005]. Möglicherweise sind die Rezeptoren unter diesen Bedingungen an der Membran lokalisiert.

4.2.5. Untersuchung der Auswirkungen von Prostaglandin E2 auf die Cadmium-Toxizität in Bronchialepithelzellen

Cadmium als Schwermetall steht in seiner Toxizität noch vor Quecksilber und wird hauptsächlich über die Lunge aufgenommen. Cadmium wurde als kanzerogen mit der Klassifikation A2 (im Tierversuch unter Arbeitsplatz-ähnlichen Bedingungen nachgewiesen) eingestuft [„vorläufiger“ inhalativer TRD-Wert: 25 ng/kg x d; Eikmann et al., 2002)]. Zytotoxisch wirkt das Cadmiumion stark denaturierend auf Proteine. Nach oraler oder inhalativer Aufnahme wird es durch Bindung an Trägerproteine gespeichert und wird kaum ausgeschieden. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass Cadmium Apoptose erzeugt [Stohs & Bagchi 1995, Hassoun & Stohs 1996; Choi et al., 2002, Watjen et al., 2002, Lopez et al., 2003; Shih et al., 2003].

Als möglichen Schutzmechanismus der Zelle dient der Transport aus der Zelle. McAleer et al. (1999) beschrieb in MRP5 transfizierten Zellen (HEK239) eine 2,4fache Resistenz gegenüber Cadmiumchlorid.

Da nur in Bronchialzellen der Trend zur erhöhten MRP5-Expression (Abb. 19) zu beobachten war, wurden die Versuche auch nur an diesem Lungenzelltyp durchgeführt.

Zur Beurteilung der Cadmiumtoxizität setzten wir 2 Methoden ein: zum einen den klassischen Zytotoxizitätstest MTT-Assay sowie die Bestimmung der Aktivität von den Effektorcaspasen 3/7-Aktivität (Fluoreszenzassay von Promega) als Apoptosemarker. Der MTT-Test diente zum Abgrenzen subtoxischer und akut toxischer Bereiche, während die Caspase-Aktivität eher den mechanistischen Aspekt zeigte.

Die Zellen wurden über 3 Tage mit Prostaglandin E2 (10 µM), aus den Expressionsversuchen abgeleitet, sowie über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cadmium (2,5 bis 50 µM) behandelt. Anschließend erfolgte der MTT-Test sowie die Bestimmung der Caspaseaktivität. In Abbildung 28 sind die experimentellen Ergebnisse dargestellt.

Wie Abbildung 28 zeigt, sind keine Unterschiede in der allgemeinen Toxizität Cadmiumtoxizität zu erkennen. Die Grenze zwischen subtoxisch und akut toxisch liegt zwischen 6 und 7 µM Cd. Die Caspase-Aktivität zeigte eine signifikante Erhöhung nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µM Cadmium mit und ohne Prostaglandin E2. Die 6 h und 24 h wurden auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen. Eine grenzwertige Erhöhung der Caspase-Aktivität jedoch nicht signifikant zeigte sich auch bei 5 µM Cd (Faktor: $5,5 \pm 2,87$); 24 h ohne Prostaglandin E2 zur unbehandelten Kontrolle) und bei 5µM Cd mit Prostaglandin E2 Vorbehandlung ($5,7 \pm 3,33$; 24 h).

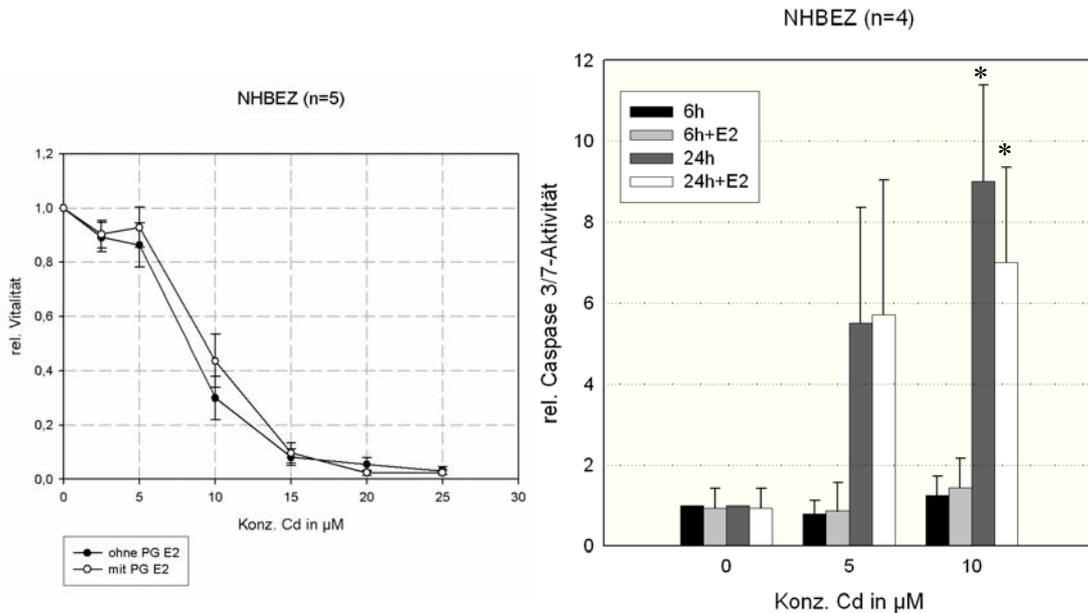


Abbildung 28: MTT-Assay (links) und Caspase 3/7-Aktivität (rechts) nach Behandlung mit Cadmium \pm Prostaglandin E2 in Bronchialepithelzellen. relative Vitalität bzw. relative Caspaseaktivität \pm SE, * $p < 0,05$

Ein Effekt von Prostaglandin E2 auf die Zytotoxizität von Cadmium und die Apoptoseinduktion konnte nicht hergeleitet werden.

Die grenzwertige Erhöhung der MRP5-Expression durch Prostaglandin E2 hatte keinen Einfluss auf die Cadmiumtoxizität sowie auf die Induktion der Apoptose in den Lungenzellen.

4.3. Einfluss von Prostaglandin F2 α auf humane Lungenzellen in Kultur

4.3.1. Vitalitätstest nach Behandlung mit Prostaglandin F2 α

Für die Bestimmung der Vitalität wurde der MTT- Test verwendet. Bronchialepithelzellen, periphere Lungenzellen und die Tumorzelle wurden für 24 h mit Prostaglandin F2 α (0,1-50 μ M) behandelt. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt.

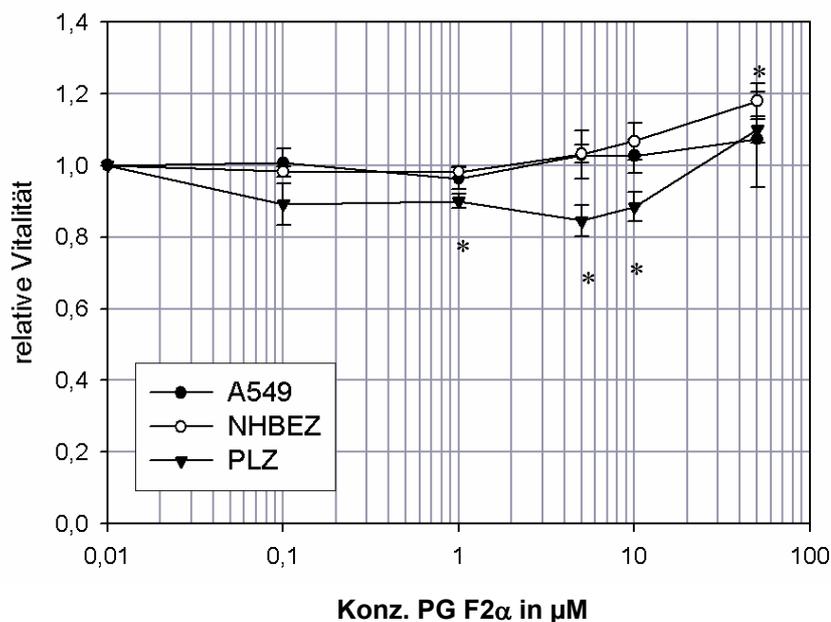


Abbildung 29: Vitalitätstest nach Behandlung humaner Lungenzellen (NHBEZ [n=3], PLZ [n=3] und A549[n=5]) mit Prostaglandin F2α. Die relative Vitalität wurde auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen; halblogarithmischen Auftragung der relative Vitalität ± SE, *p<0,05

Nach Behandlung mit Prostaglandin F2α für 24 h zeigten die Bronchialzellen eine signifikant gesteigerten Vitalität (p=0,008) bei 50 μm Prostaglandin F2α (Abb. 29). Die erhöhte Vitalität weist auf eine Stimulierung der Proliferation hin. Die peripheren Lungenzellen zeigten einen leichten, aber signifikanten Rückgang der Vitalität bei den Konzentrationen bis 10μM Prostaglandin F2α, jedoch nicht in zytotoxische Bereiche. Wie bei Prostaglandin E2 zeigte die Tumorzelle A549 keine veränderte Vitalität nach Behandlung mit Prostaglandin F2α. Zytotoxische Effekte konnten somit weder in den Primärkulturen noch in den Tumorzellen beobachtet werden.

4.3.2. Einfluss von Prostaglandin F2α auf die mRNA-Expression verschiedener MRP-Isoformen

Für die Bestimmung der Expression verschiedener MRP-Isoformen (MRP1, MRP3, MRP4, MRP5) wurden die Zellen über 24 h bzw. 72 h mit 1 und 10 μM Prostaglandin F2α exponiert. Die Konzentrationsbereiche sind angelehnt an die in der Literatur beschriebenen experimentellen Behandlungskonzentrationen [Ziemann et al., 2002]. Nach Behandlung

4. Ergebnisse

wurden die Zellen mit TRIzol G geerntet und die RNA isoliert. Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA eingesetzt. Die Bestimmung der Expression erfolgte semiquantitativ mit GAPDH als Referenzen.

In Abbildung 30 sind die Expressionsdaten für MRP1 in humanen Lungenzellen zusammengestellt.

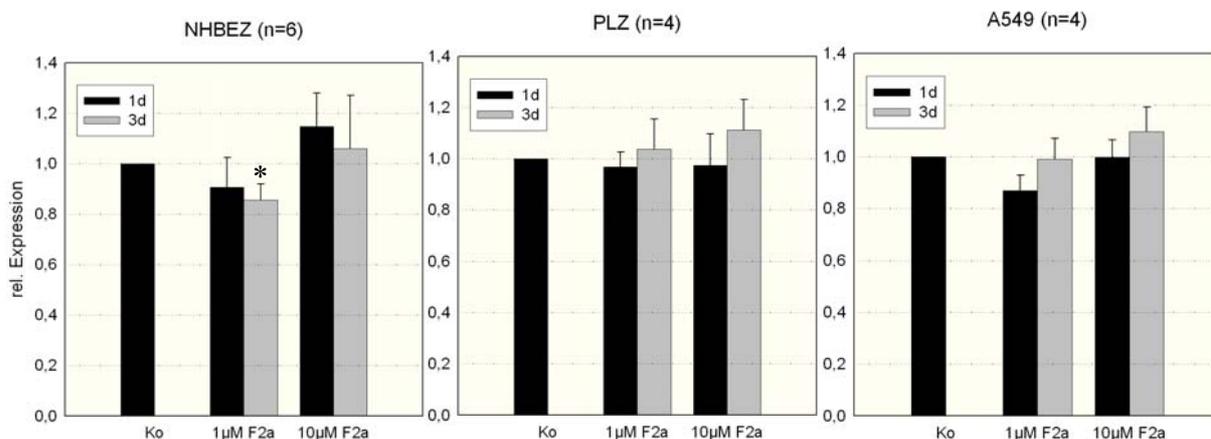


Abbildung 30: mRNA-Expression von MRP1 in humanen Lungenzellen (NHBEZ, PLZ, A549) nach Behandlung mit Prostaglandin F2α, semiquantitative Auswertung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle und GAPDH als Referenzen. Datendarstellung als relative Expression ± SE, * p<0,05

Bei 1 µM Prostaglandin F2α zeigten die Bronchialepithelzellen einen leichten, jedoch signifikanten Rückgang (p=0,014) der Expression mit einem Faktor von 0,9. Dieser geringe Unterschied ist physiologisch jedoch kaum von Bedeutung. Die peripheren Lungenzellen und die Tumorzellen reagierten nicht auf die Behandlung. Im Gegensatz zu der Prostaglandin E2 Behandlung musste keine Lösemittelkontrolle mitgeführt werden, da Prostaglandin F2α in Wasser löslich ist. Aus diesem Grund wurde die unbehandelte Kontrolle, die über den Behandlungszeitraum von 3 Tagen mitgeführt wurde, nach Abgleich gegenüber GAPDH, als Referenzgen auf einen Absolutwert von 1 gesetzt und alle behandelten Proben darauf bezogen.

Ebenso zeigten MRP3 (Abb. 31) (Faktor: 1,2±0,22 [NHBEZ]; 1,2±0,32 [PLZ]; 1,3±0,16 [A549]; Faktoren beziehen sich auf 72 h Behandlung mit 10 µM PG F2α), MRP4 (Abb. 31) (Faktor: 1,1±0,25 [NHBEZ]; 1,2±0,32 [PLZ]; 1,2±0,17 [A549]) und MRP5 (Abb. 31) (Faktor: 1,2±0,25 [NHBEZ]; 1,0±0,30 [PLZ]; 1,2±0,25 [A549]) keine Reaktion auf Prostaglandin F2α-Behandlung hinsichtlich ihrer RNA-Expression.

4. Ergebnisse

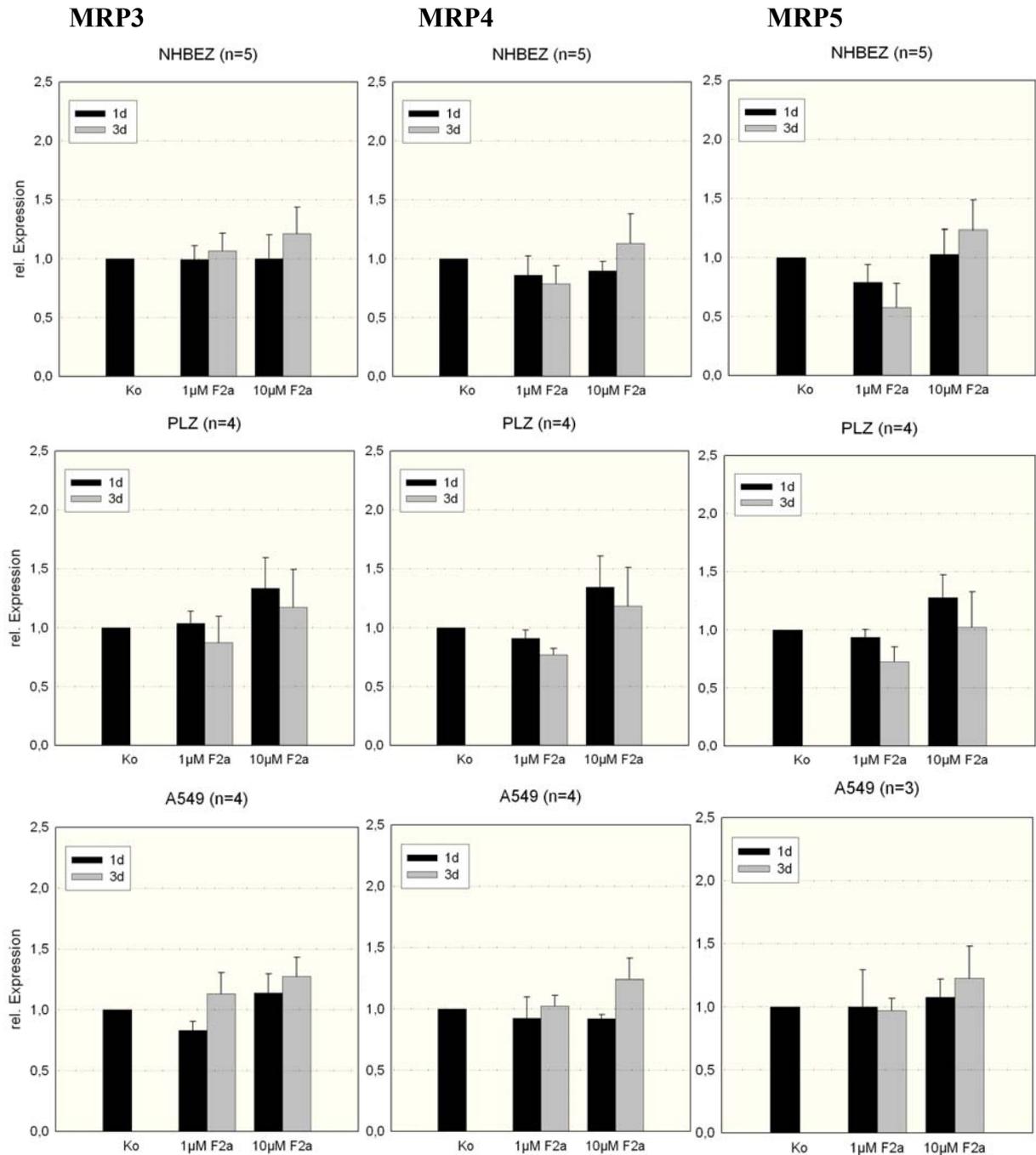


Abbildung 31: mRNA-Expression von MRP3, MRP4 und MRP5 in humanen Lungenzellen (NHBEZ, PLZ, A549) nach Behandlung mit Prostaglandin F2 α , semiquantitative Auswertung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle und GAPDH als Referenzen. Datenangabe: relative Expression \pm SE mit $p < 0,05$

Zieman et al. (2002) beschrieb für den ABC-Transporter MDR1b in Ratten- Hepatozyten eine Erhöhung der Expression und der Transportaktivität sowohl nach Prostaglandin E2- als auch F2 α -Behandlung. Im Gegensatz dazu konnte für die MRP-Transporter eine Erhöhung der Expression nicht beobachtet werden. Auch hier zeigen sich höhere Schwankungen der

mRNA-Expression in den Primärzellen im Vergleich zur Tumorzelle A549, was vermutlich auf Patientens-individuelle Varianz zurückzuführen ist.

4.3.3. Transportaktivität in Prostaglandin F₂α behandelten Lungenzellen

Für die MRP1-Transportaktivität wurden die Zellen für 24 und 96 h mit 2 verschiedenen Konzentrationen (5 und 10 µM) an Prostaglandin F₂α behandelt, um nicht transkriptionell bedingte Effekte auf MRP1 auszuschließen. Nach abgeschlossener Behandlung wurden die Zellen für 4 h mit dem für MRP1 spezifischen Fluoreszenz-Substrat CDF inkubiert. Die intrazelluläre Akkumulation wurde mittels Einzelzellfluoreszenzmessung bestimmt. Erhöhte Transportaktivität ist bedingt durch geringere Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes. In Abbildung 32 sind die experimentellen Daten der CDF-Akkumulation zusammengestellt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf die Kontrolle bezogen, deren Fluoreszenz auf 100% gesetzt wurde.

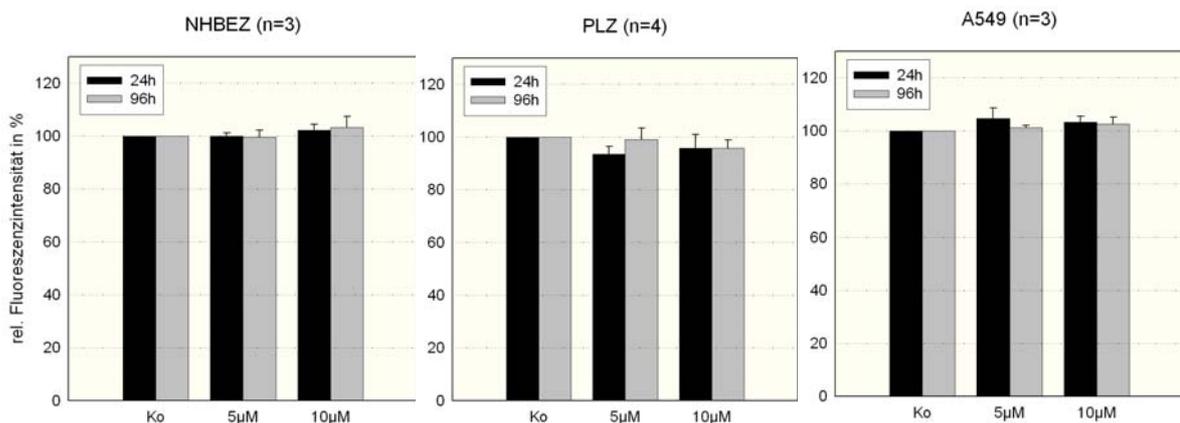


Abbildung 32: CDF-Akkumulation in humanen Lungenzellen nach Behandlung mit Prostaglandin F₂α. Gemessen wurde die zelluläre Akkumulation des spezifischen MRP1-Substrates CDF über Einzelzellfluoreszenzmessung. relative Fluoreszenzintensität in % ± SE

Es konnten keine Veränderungen des intrazellulären CDF-Gehaltes und somit keine veränderte Transportaktivität nach Prostaglandin F₂α-Behandlung in den 3 humanen Lungenzellkulturen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der MRP1-Expression (Abb. 30), die keine Veränderungen zeigte.

4.4. Einfluss des Wachstumsfaktors EGF auf MRP und verschiedene Zellparameter

Der Wachstumsfaktor EGF spielt eine wichtige Rolle in vielen Vorgängen der Zelle, wie Differenzierung, Proliferation und Angiogenese, Apoptoseregulation und Invasivität [Wu et al., 2002 a]. Seine Reaktionen werden über den EGF-Rezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität [Musallam et al., 2001] vermittelt. Viele Zellen reagieren mit erhöhter DNA-Synthese und Zellteilung [Bissig et al., 2000] auf die Behandlung mit EGF. Es gilt als Mitogen in vielen Geweben wie Hepatozyten und Cholangiozyten [Bissig et al., 2000] und wird bevorzugt in Speichel- und Brunnerdrüsen gebildet mit niedriger Syntheserate in Niere und anderen Geweben [Bissig et al., 2000, Xu et al., 2001]. Als Wachstumsfaktor ist EGF mit einer Konzentration von 0,5 ng/ml Medium im AECG-Medium für die primären Lungenzellen enthalten. Vorversuche mit Medium ohne EGF (Epith-o-ser, c-c-pro) zeigten kein Wachstum von peripheren Lungenzellen in Kultur.

4.4.1. Grundexpression des EGFR in Lungengewebe und Primärkultur

Die EGF-Rezeptor-Familie umfasst eine Gruppe von 4 strukturell ähnlichen Proteinen (EGFR, HER2/neu, ErbB-3 und ErbB-4), die durch Bindung von Liganden wie EGF und *Transforming-growth-factor* α dimerisieren [Franklin et al., 2002]. Über Autophosphorylierung wird das G-Protein Ras aktiviert und der MAPK-Signalweg angeschaltet [Kang et al., 2000]. Der EGF-Rezeptor konnte mittels *realtime*-RT-PCR (Abb. 33A) im Lungengewebe und im Western Blot (Abb. 33B) in Zellkultur nachgewiesen werden. Die Gewebe zeigen eine geringe Schwankungsbreite bis zum Faktor 2 in der mRNA-Grundexpression des EGF-Rezeptors im Verhältnis zu GAPDH als Referenzgen.

Zusätzlich wurden Zellkulturen der peripheren Lunge mit verschiedenen Konzentrationen an EGF über 24 h behandelt, um einen Einfluss auf die Expression des Rezeptors zu untersuchen (Abb. B). Cohan et al. (1986) beschreibt die proteolytische Degradierung des Rezeptors nach Bindung von EGF. Eine Verringerung des Proteingehaltes an EGFR konnte im Western Blot nicht festgestellt werden. Die Zellkulturen der Lunge zeigten eher eine leichte Erhöhung von EGFR, die aber mit einem Faktor von 1,3 (Mittelwert aus beiden Proben) keine physiologische Bedeutung hat.

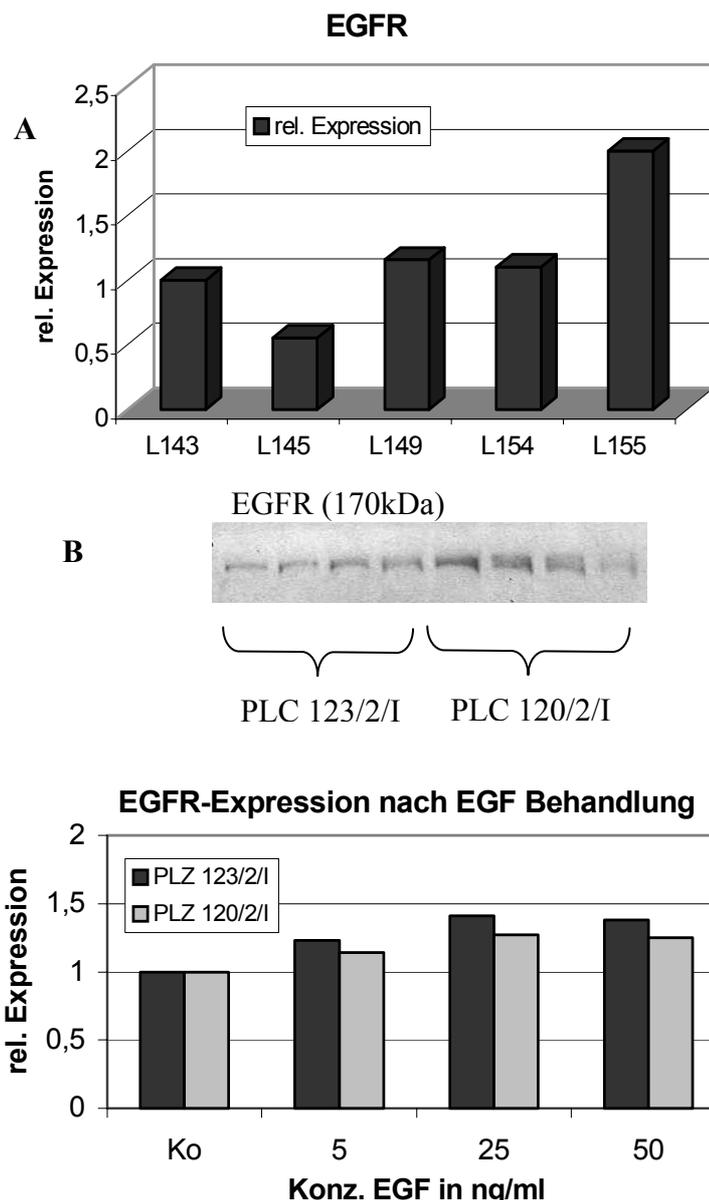


Abbildung 33: *realtime*- RT- PCR und Westernblot von EGFR A) semiquantitative RT-PCR mit GAPDH als Referenzgen in peripheren Lungengewebe (Pat-ID 143, 145, 149, 154, 155), B) repräsentativer Western Blot und densitometrische Auswertung von EGFR in peripheren Lungenzellen nach EGF- Behandlung (Pat- ID: 123 und 120, 2. Generation, 1. Passage)

4.1.2. Einfluss von EGF auf die Vitalität humaner Lungenzellen in Kultur

Aufgrund des Wachstums stimulierenden Effekts von EGF auf epidermale Zellen [Cohan et al., 1986] untersuchten wir den Einfluss von EGF auf die Vitalität der Primärkulturen der Lunge mittels MTT-Assay (siehe Kapitel 4.2.1). Eine Erhöhung der Vitalität durch die Behandlung im Vergleich zur Kontrolle gibt Hinweise auf erhöhte Zellzahlen. Für eine

4. Ergebnisse

genaue Beweisführung der Proliferation müssten Untersuchungen, wie die DNA-Syntheserate sowie FACS-Analysen des Zellzyklus erfolgen.

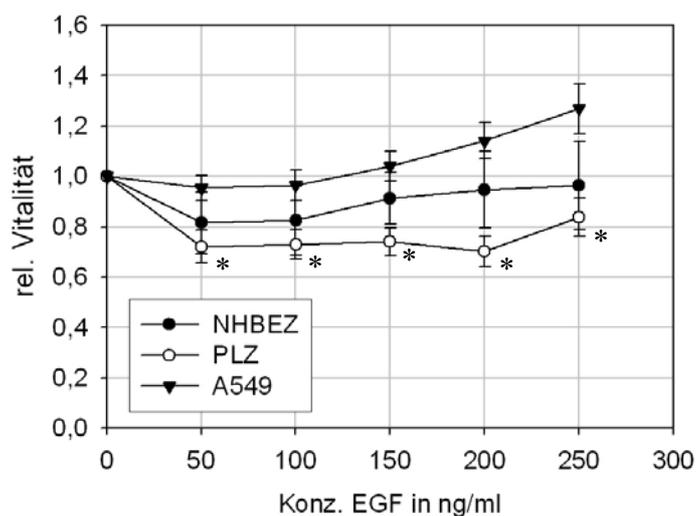


Abbildung 34: relative Vitalität nach 24h EGF-Behandlung in NHBEZ(n=3), PLZ (n=4) und A549 (n=6) gemessen im MTT-Test *p<0,05

Die Konzentrationsbereiche zwischen 50 und 250 ng/ml wurden gewählt, da bei niedrigeren Konzentrationen die Vitalität im Bereich zwischen 5 und 50ng/ml absank (Daten nicht gezeigt) und diese Daten von der klassischen Zytotoxizität mit konzentrationsabhängiger abnehmender Vitalität abgegrenzt werden mussten.

Die peripheren Lungenzellen ($p < 0,05$) und grenzwertig auch die Bronchialzellen zeigten eine verringerte Vitalität von EGF bei Konzentrationen bis 200 ng/ml, wobei die peripheren Lungenzellen am sensitivsten reagierten (Abb. 34). In der Literatur ist ein Wachstumsarrest in der Tumorzelle A431 über Gadd 45, ein Stress und DNA-Schäden erkennendes Protein durch Behandlung mit 50ng/ml EGF beschrieben [Fong et al., 2001]. Das ist möglicherweise ein Erklärungsansatz für die verringerte Vitalität der Primärkulturen. In den Tumorzellen (A549) zeigte sich eine grenzwertige Erhöhung der Vitalität bei 250 ng/ml ($p = 0,065$) nach Behandlung mit EGF. Somit zeigen sich Unterschiede in der Kultivierung zwischen Tumorzelle und Primärkultur. Gründe hierfür können in der Kultivierungsdauer der Zellkulturen, in der unterschiedlichen Zusammensetzung des Mediums (serumfreie Kultur mit 0,5 ng/ml EGF und 10 % FKS-haltigen Kulturmediums) sowie auch in der Reaktion von Tumorzellen und Primärkulturen gesunder Zellen liegen. So zeigen nicht-kleinzellige Tumore eine erhöhte EGFR-Expression [Franklin et al., 2002].

4.4.3. EGF moduliert den HGF-Rezeptor c-met

Die Lungenzellen in Kultur exprimieren den Wachstumsfaktor c-met in einem hohen Maße. Für diesen Rezeptor sind sowohl proliferative/antiapoptotische, wie auch proapoptotische Mechanismen beschrieben [Derksen et al., 2003, Matteucci et al., 2003].

Die Behandlung mit EGF zeigte Effekte in der Regulation der Expression des HGF-Rezeptors c-met. In der Zellkultur zeigte sich nach 24 h eine konzentrations-abhängige Verringerung des Rezeptors (Abb. 35).

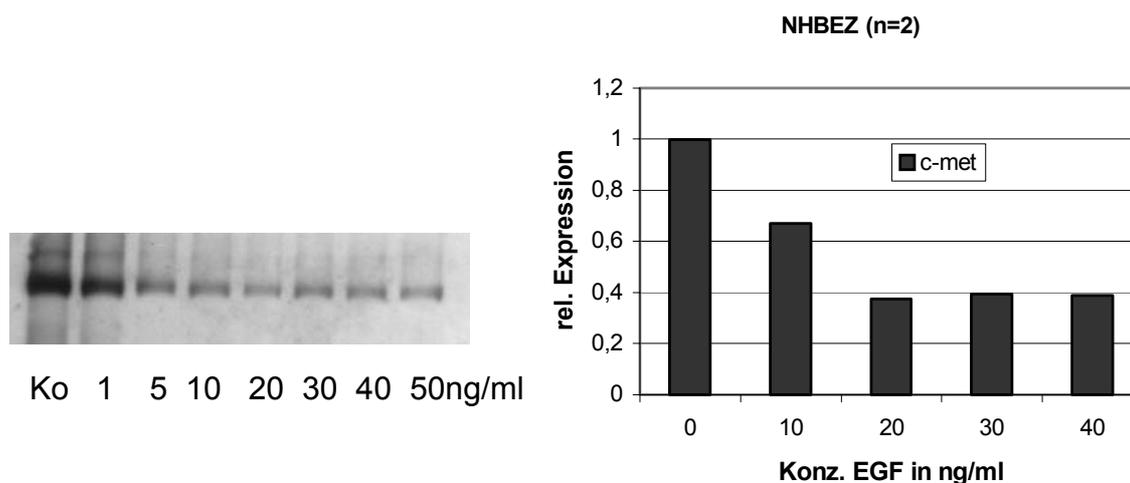


Abbildung 35: repräsentativer Western Blot und densitometrische Auswertung in Bronchialepithelzellen nach Behandlung mit EGF über 24 h

Die Hemmung der Expression von c-met kann eine Erklärung für die Hemmung der Vitalität der Zellen im MTT-Test darstellen. Der Wachstumsfaktor HGF mit seinem Rezeptor c-met weist ähnliche funktionelle Eigenschaften wie EGF auf. Er zeigt Einflüsse auf Proliferation, Apoptose sowie Differenzierung von Zellen. Ein Unterschied liegt in der Beteiligung in der Tumorentwicklung. Während in vielen Tumoren der EGF-Rezeptor erhöht vorkommt, hat die Coexpression von HGF, der normalerweise parakrin nur von Mesodermalzellen ausgeschüttet wird, mit dem c-met Rezeptor eine Bedeutung vor allem in der Brustkrebsentwicklung [Edakuni et al., 2001].

4.4.4. Cadmiumtoxizität und EGF

Sowohl EGF wie auch HGF beeinflussen die Proliferation und Apoptose. Cadmium als Schwermetall induziert Apoptose und wurde als Modellsubstanz eingesetzt für die

4. Ergebnisse

Regulierbarkeit der Zytotoxizität von Cadmium durch EGF. Um einen Einfluss auf die Toxizität zu untersuchen, wurden Vitalitätsstudien mittels MTT-Test durchgeführt nach Exposition von Bronchialzellen mit Cadmium. Cadmium beeinflusst die mitochondriale Dehydrogenase wie bereits in der Behandlung mit Prostaglandinen gezeigt. Die Primärkultur wurde verwendet, da sie sensitiver auf Cadmium reagiert. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

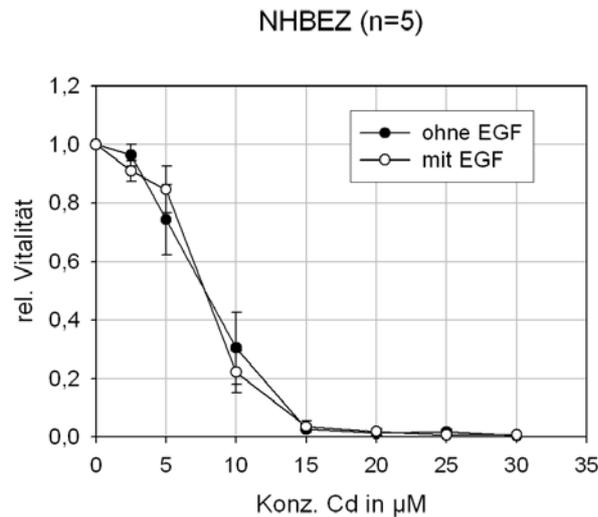


Abbildung 36: Vitalitätstest nach Behandlung mit CdSO_4 +/- EGF(20 ng/ml über 24 h) in humanen Bronchialepithelzellen in Kultur

Wie aus der Abbildung 36 ersichtlich ist, konnte kein Effekt der EGF-Behandlung auf die Toxizität von Cadmium nachgewiesen werden. Ein Einfluss pro- bzw. antiapoptotischer Einflüsse von EGF waren nicht zu erkennen. Erste cytotoxische Bereiche wurden bei 5 μM überschritten.

4.4.5. Einfluss von EGF auf die mRNA- Expression verschiedener MRP-Isoformen

In Cornealepithel von Kaninchen konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E2 durch EGF induziert wird [Kang et al., 2000]. Auch wurde beschrieben, dass Prostaglandin E2 über den EP2-Rezeptor den EGFR-Rezeptor transaktivieren kann [Hata et al., 2004]. Ziemann et al. (2002) beschrieb am *mdr1b* Gen in Rattenhepatozyten die Hochregulierung des Transporters durch EGF, wobei die Reaktion durch Verwendung von COX-Inhibitoren (Indomethazin, Meloxicam und NS-398) diese Überexpression inhibierte. Die *mdr1b* Überexpression durch

4. Ergebnisse

EGF war also Prostaglandinbiosynthese-abhängig. Das lässt den Schluss zu, dass EGF proinflammatorische Eigenschaften aufweist.

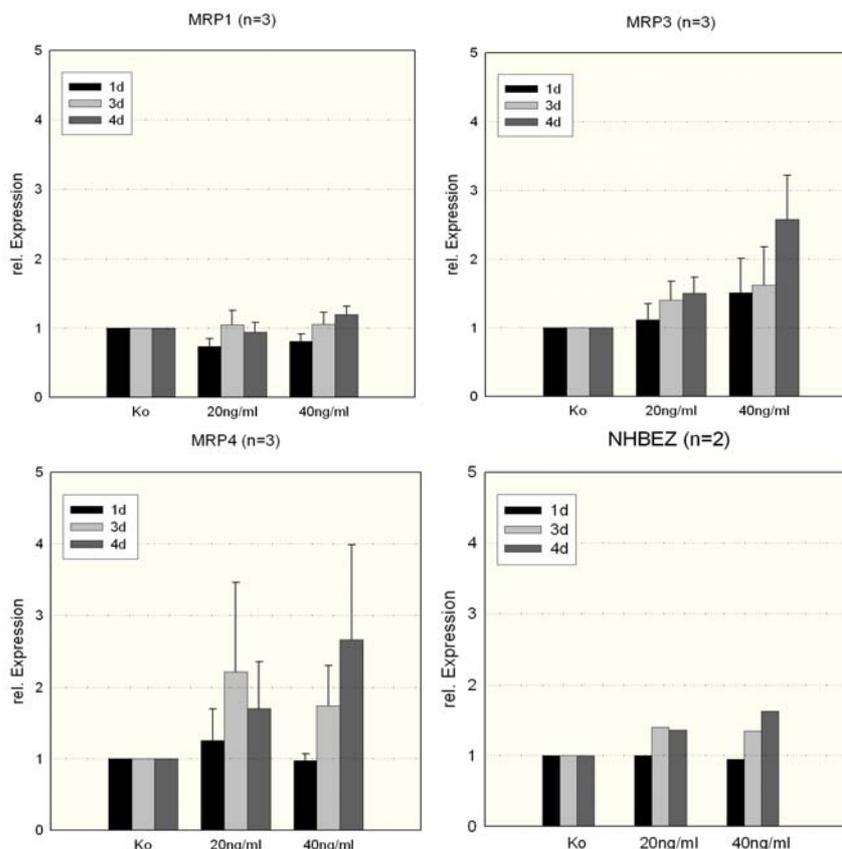


Abbildung 37: mRNA-Expression der MRP-Isoformen MRP1, MRP3, MRP4 und MRP5 in normalen humanen Bronchialepithelzellen nach Behandlung mit EGF über 1 bis 4 Tage semiquantitative Auswertung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Als Referenzgen diente GAPDH. relative Expression \pm SE

Aus diesen Gründen untersuchten wir den Einfluss von EGF auf die m-RNA-Expression von MRP1, MRP3, MRP4 und MRP5 in den Bronchialepithelzellen, welche in der Expression von MRP1 (Abb. 18) und auch MRP3 (Abb. 19) und MRP5 (Abb. 21) auf die Behandlung mit Prostaglandin E2 mit einer Erhöhung reagierten.

In Abbildung 37 sind die mRNA-Expressionsdaten nach Behandlung mit EGF dargestellt. Während bei MRP1 ($p > 0,05$) und MRP5 keine Expressionsänderungen zu sehen waren, zeigte MRP3 (Faktor: $2,6 \pm 0,65$, $p = 0,075$) und MRP4 ($2,7 \pm 1,33$, $p > 0,05$) nach 4 Tagen die Tendenz zur erhöhten Expression durch EGF. Für statistisch abgesicherte Aussagen ist es notwendig, eine größere Anzahl an Versuchen durchzuführen, um die individuellen Unterschiede auszugleichen. Es zeigten sich keine Parallelitäten der Effekte im Vergleich zwischen EGF und Prostaglandin E2. Deshalb gehen wir von 2 unterschiedlich vermittelten Signalwegen für die Induktion der MRP Expression durch EGF und Prostaglandin E2 aus.

5. Diskussion

5.1. Belastung der Lunge durch umweltbedingte Schadstoffe

Luftgetragene Schadstoffe sind ein wesentlicher Risikofaktor für kardiovaskuläre wie auch pulmonale Erkrankungen und Todesfälle. Langzeit- wie auch wiederholte Expositionen erhöhen das kumulative Risiko für chronische pulmonale (Entzündungen der Atemwege) und kardiovaskuläre Störungen (z. B. Arteriosklerose) [Pope et al., 2004]. Ozon, Partikel sowie Tabakrauch steigern vorhandene Asthmasymptome durch Förderung inflammatorischer Reaktionen [Tatum et al., 2005]. Luftgetragene Schadstoffe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften . So wird zwischen gasförmigen Schadstoffen (NO₂, SO₂, Ozon, CO, CO₂) und partikelgetragenen Luftschadstoffen (Russ, PAH, Metalle, Sulfate, Nitrate, Salze) unterschieden. In ihrer Toxizität unterscheiden sie sich in Verweildauer und Verteilung [Vineis et al., 2004].

Aufgrund der sich noch in der Entwicklung befindlichen Lunge müssen Kinder in der Schadstoffbelastung gesondert betrachtet werden. Kinder weisen eine erhöhte Anzahl an Minutenatemzügen sowie eine gesteigerte physische Aktivität auf [Kim et al., 2004]. Während bei Erwachsenen zunehmend Erkrankungen der Atemwege und des Herzens sowie die Entwicklung von Lungenkrebs im Vordergrund stehen, haben Luftschadstoffe bei Kindern vor allem Auswirkungen auf die Ausbildung und Symptomatik von Asthma sowie eine Verringerung der Lungenfunktion [Kim et al., 2004]. Eine große Studie über 8 Jahre, geführt im Süden Californiens mit 1759 Kindern im Alter zwischen 10 und 18 Jahren, zeigte eine deutliche Reduktion des Wachstums der Lungenfunktion aufgrund von Schadstoffbelastungen mit Stickstoffdioxid, Säuredämpfen, Partikeln mit einem Durchmesser kleiner 2,5µm und elementarem Kohlenstoff. Die Gründe könnten in einer direkten Reduktion der Alveolen bzw. in der Ausbildung von Entzündungsreaktionen (Bronchiolitis) liegen [Gauderman et al., 2004]. Andere Autoren konnten zusätzlich auch Einflüsse von Ozon auf die kindliche Lunge feststellen. Hier sind zu nennen verringerte Lungenfunktion, gesteigerte respiratorische Symptome, wie Husten und Verschlechterung asthmatischer Probleme [Kim et al., 2004]. Kim et al. geben die Empfehlung in der Abschätzung von Sicherheitsabständen zwischen Wirkschwellen und zugelassenen Grenzwerten partikelgetragener Schadstoffe, sich an Kindern als sensitivste Untergruppe zu orientieren.

Ein großer Forschungsschwerpunkt liegt zur Zeit auf dem Gefährdungspotential von Feinstäuben. In Deutschland werden im Durchschnitt Werte zwischen 10 und 45µg/m³/d für

einen Partikeldurchmesser von $10 \mu\text{m}^3/\text{d}$ und $10\text{-}30 \mu\text{g}$ für einen Partikeldurchmesser von $2,5 \mu\text{m}$ gemessen. Einzelmessungen liegen bis zum fünffachen darüber [Kappos et al., 2004]. Langzeitexpositionen spiegeln sich in einer höheren kardiovaskulären bzw. höheren Säuglingssterblichkeit wieder. Aufgrund der größeren Eindringtiefe von Partikeln mit einem Durchmesser kleiner $2,5\mu\text{m}$ stellen diese ein erhöhtes gesundheitliches Problem dar [Kappos et al., 2004]. Hauptursachen erhöhter Partikelkonzentrationen sind starker Autoverkehr (vor allem Dieselabgase) besonders in Städten und Industrieballungsgebieten. Als Folge treten gesteigerte respiratorische Symptome bei Asthmaerkrankungen, Einflüsse auf chronische obstruktive pulmonale Erkrankungen (COPD) und Pneumonien auf. Aber es wird auch ein Einfluss auf die Lungenkrebsentstehung diskutiert [Kappos et al., 2004]. Mehrere amerikanische aber auch europäische Studien beschreiben einen Einfluss partikelgetragener Schadstoffe auf die Lungenkrebsentstehung. Eine italienische Studie zeigte einen Einfluss dieser Schadstoffbelastung auf die Entstehung kleinzelliger und großzelliger Karzinome, nicht jedoch auf das Plattenepithelkarzinom bzw. Adenokarzinom. Die amerikanischen Studien Harvard 6-Städte-Studie und die US-Studie ACS-II konnten ein deutlich konzentrationsabhängiges Risiko für Lungenkrebs von der Partikelkonzentration in der Luft ableiten [Vineis et al., 2004]. In den Niederlanden konnte eine Abhängigkeit zwischen kardiopulmonaler Sterblichkeit und der Nähe zu Hauptverkehrsstraßen und Autobahnen gefunden werden. Es werden eine reversible Erhöhung der Blutgerinnung und inflammatorischer Prozesse als Gründe für die gesundheitsschädigende Wirkung von Feinstäuben diskutiert [Kappos et al., 2004]. Einer epidemiologischen Studie im Utah Valley zufolge konnte nach der Schließung einer Stahlmühle eine erhöhte Rate entzündungsbedingter Erkrankungen des Respirationstraktes bei Personen, die gegenüber diesen Stäube exponiert waren, festgestellt werden [Ghio et al., 2004].

Hinsichtlich ihrer Konzentrationsunterschiede müssen Innenraum- und Freiluftgebiete unterschieden werden. In geschlossenen Räumlichkeiten muss auf höhere Konzentrationen an Substanzen, wie Tabakrauch, Partikel, NO_2 , CO_2 aber auch Allergene (Hausstaub) Rücksicht genommen werden. In Entwicklungsländern kommen Russbestandteile von Feuerstellen für Kochen und Heizen hinzu. Folgen können erhöhte Reizung der Lunge, allergische Sensibilisierung, aber auch das Risiko für akute und chronische respiratorische Schäden sein [Viegi et al., 2004]. Ein Problem für die Lungenkrebsentstehung stellt vor allem Radon in Räumlichkeiten dar. Radon entsteht beim natürlichen Zerfall von Uran-238 [Darby et al., 2005]. Radon erzeugt Mutationen, die demzufolge zu Krebserkrankungen führen können. Das Risiko steigt mit Konzentrationserhöhung und Dauer der Exposition. Besonders gefährdet

sind Personen, die im Alter zwischen 0 und 50 Jahren gegenüber Radon exponiert waren [Chen 2005]. Eine Metaanalyse aus 13 europäischen Studien mit 7148 Lungenkrebspatienten und 14208 Kontrollpersonen zeigte ein steigendes Lungenkrebsrisiko um 8,4 % pro 100 BQ/m³. Radon wird hier für 9 % der Lungenkrebssterbefälle und 2 % der Gesamttodesfälle an Krebs als Ursache angesehen [Darby et al., 2004].

5.2. Chemotherapieresistenzen bei Lungentumoren

Lungenkrebs ist der Hauptgrund für die Krebssterblichkeit in den westlichen Industrieländern. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen die Mehrzahl der Patienten bereits Metastasen auf [Gridelli et al., 2005], so dass die Behandlung mit Chemotherapeutika nach Operation neben Strahlentherapie ein wesentliches Behandlungsmittel darstellt. Hinsichtlich ihrer Eigenschaften werden das nicht-kleinzellige (NSCLC) und das kleinzellige Karzinom (SCLC) unterschiedlich behandelt. Während beim NSCLC noch die Operation mit dem Ziel der Tumorentfernung im Vordergrund steht und Chemotherapien vor allem bei Fernmetastasen eingesetzt werden, werden aufgrund der hohen Invasivität und der hohen Metastasierungsrate beim SCLC hauptsächlich Polychemotherapien und bei Vorliegen von Hirnmetastasen auch Strahlentherapie eingesetzt [Seeber et al., 1995]. Beiden Tumoren jedoch ist eine hohe Rate an Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika und eine Progression der Erkrankung in kurzen Zeitverläufen gemeinsam, welche kaum vermieden werden kann [Locke et al., 2003, Harada et al., 2003].

Aufgrund der hohen Resistenzausbildungsrate treten Einzeltherapien mit Medikamenten, wie Cisplatin, Vinorelbine, Paclitaxel, Docetaxel oder Gemcetabine [Gridelli et al., 2005] immer mehr in den Hintergrund. An ihre Stelle treten Kombinationstherapien mit Wirkstoffen, die an unterschiedlichen Endpunkten angreifen. Als Beispiele für Kombinationstherapien wären zu nennen: Cisplatin (Endpunkt: DNA-Schädigung)/Etoposid (Topoisomerase II-Hemmer); Cisplatin/Topotecan (Topoisomerase I-Hemmer); Cisplatin/Paclitaxel (übermäßige Stabilisierung von Tubulin) [Stewart, 2004(a), Stewart et al., 2004 (b)]; Gemcetabin (Antimetabolit, DNA-Einbau)/Vinorelbine (destabilisiert Tubulin) [Gridelli et al., 2005]. Neuere Behandlungsstrategien beinhalten Antikörperbehandlungen, zum Beispiel gegen den vaskulären Endothelwachstumsfaktor oder EGF-Rezeptor; Farnesyltransferaseinhibitoren; bcl2 antisense- Oligonukleotide; epigenetische Beeinflussung mittels Histon-Deacetylase-Inhibitoren oder Inhibitoren der Methylierung; gezielte Tyrosinkinaseinhibitoren sowie Inhibitoren von NF- κ B [Perrone et al., 2005, Pao et al., 2005, Bunn et al., 2002].

Verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika wurden für Lungenkrebs beschrieben. Stewart et al. (2004) teilt die Resistenzen in 2 Gruppen ein, die sogenannten „passiven Resistenzen“ die durch Defizite, Sättigung bzw. Mutation eines Zielgenes oder Prozesses entstehen. Als Beispiele gelten der Verlust der Regulierbarkeit von antiapoptotisch wirksamen Proteinen (Bsp. p53), die begrenzte zelluläre Aufnahme oder veränderte Zellzyklusbedingungen. Zu deren Überwindung werden Kombinationstherapien mit verschiedenen Endpunkten eingesetzt. Die zweite Gruppe sind die „aktiven Resistenzen, die durch Überexpression von Transporteffluxproteinen, erhöhte Detoxifikation durch hohe GSH-Spiegel aber auch durch erhöhte DNA-Reparatur entstehen. Hier kann man auch von einer *Multidrug*-Resistenz sprechen. Einige Beispiele für Chemotherapieresistenzen bei Lungenkrebs werden im folgenden näher beschrieben.

In vielen histologischen Typen von Lungenkrebs wurden Veränderungen in der Produktion von verschiedenen Wachstumsfaktoren (WF) und veränderte Expressionen verschiedener WF- Rezeptoren beschrieben [Bunn et al., 2002]. In NSCLC gilt ein besonderes Interesse dem EGF-Rezeptor. In normalem Gewebe beschränkt sich die Expression des Rezeptors auf die basale Seite proliferierender Zellen. Geringe oder ausgeprägte EGFR-Überexpression konnte jedoch in 65 % der Adenokarzinome, 68 % der großzelligen Karzinome und 85 % der Plattenepithelkarzinome beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die kleinzelligen Karzinome keine Überexpression [Bunn et al., 2002]. Zwei Behandlungsmöglichkeiten in Kombination mit Chemotherapien stehen für Patienten mit erhöhter EGFR-Expression zur Verfügung. Zum einen die Behandlung mit Antikörpern gegen EGFR, zum anderen mit niedermolekularen Tyrosinkinase- Inhibitoren (TKI), wie Gefitinib, Erlotinib [Bunn et al., 2002; Perrone et al., 2005; Pao et al., 2005]. Die Vorteile der TKI liegen in der oralen Gabe, wie auch in der fehlenden Immunreaktion [Bunn et al., 2002]. Die Behandlungserfolge sind jedoch begrenzt. Pao et al. (2005) beschrieben eine Mutation an der Aminosäure 790, in der Threonin gegen Methionin ausgetauscht ist, diese Mutation ist in Zelllinien für Resistenzen gegenüber Gefitinib bzw. Erlotinib verantwortlich. Es konnten aber auch Mutationen in Patienten mit besonders guter Response auf die Behandlung gefunden werden [Perrone et al., 2005].

Die Beteiligung verschiedener pro- und antiapoptotisch wirkender Faktoren wurde in Patienten mit NSCLC untersucht. Das Tumorsuppressorgen p53 wird kontrovers diskutiert, da sowohl erhöhte wie auch erniedrigte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika bei p53-Mutationen beobachtet wurde [Harrada et al., 2003]. BCL2, ein antiapoptotisch wirksames

Protein (verhindert Cytochrom c- Ausschüttung aus den Mitochondrien) kann die Zelle vor Chemotherapeutika schützen [Pakunlu et al., 2004].

Die Beteiligung des erhöhten Glutathion-Stoffwechsels wird ebenfalls diskutiert. Erhöhte Glutathion-S-Transferase-Aktivität wird bei Resistenzen gegenüber Doxorubicin, alkylierenden Reagenzien und Platinderivaten in NSCLC und in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen beschrieben [Ferruzzi et al., 2003]. In NSCLC wurde eine Korrelation zwischen klinischen Therapieerfolgen und immunhistochemischem Nachweis der GST-Pi gefunden. Dabei konnte eine höhere Sensitivität gegenüber Medikamenten in GST-Pi negativen Patienten gefunden werden [Bai et al., 1996]. Locke et al. (2003) beschrieben in der SCLC Tumormlinie H69 eine Resistenz, von Cisplatin, hervorgerufen durch höhere Glutathion-Konzentrationen sowie erhöhte GST- π -Expression.

Ein zweiter Resistenzmechanismus wird in der Erhöhung der DNA-Reparatur gesehen. Für Chemotherapieresistenzen sind vor allem die Nukleotidexcessions-Reparatur (NER) und die Basenexcessionsreparatur (BER) zu nennen. Aber auch *Mismatch*-Reparatur und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen spielen eine Rolle in Therapieresistenzen [Rossel et al., 2002]. Ein Defizit in der DNA-Reparatur begünstigt die Tumorentstehung, ist jedoch von Vorteil in der Chemotherapie mit DNA-schädigenden Substanzen. Eine Beteiligung der NER neben der *Mismatch*-Reparatur an Cisplatinresistenzen ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Ein Schlüsselenzym der NER ist das Protein ERCC1. In Patienten mit metastasierenden NSCLC konnte ein Zusammenhang zwischen ERCC1-Expression und der Überlebensrate der Patienten hergestellt werden. Bei erhöhten ERCC1-Spiegel waren geringere Überlebensraten zu verzeichnen [Rossel et al., 2003].

Eine der wichtigsten Mechanismen für Resistenzen ist der gesteigerte Efflux von Medikamenten aus der Zelle. Hierfür sind verschiedene Transporter verantwortlich. Die 2 wichtigsten Vertreter sind das P-Glycoprotein wie auch das *Multidrug resistance associated protein* (MRP), von dem inzwischen 9 Isoformen bekannt sind. Beide gehören zur ABC-Superfamilie. Eine Stilllegung der Transporter MRP1 und MDR1 mittels antisense-Oligonukleotide zeigten eine Verstärkung der apoptotischen Wirkung von Doxorubicin in Kombination mit bcl2 antisense-Nukleotiden [Pakunlu et al., 2003; 2004]. Eine Beteiligung des *lung resistance protein* (LRP) an Chemotherapieresistenzen ist umstritten. So konnten Harada et al. (2003) eine erhöhte Expression des LRP in NSCLC-Patienten mit geringer Reaktion auf Chemotherapeutika aus der Gruppe platinhaltiger Substanzen feststellen. Huffman et al. (2005) konnten jedoch durch knock-out des Proteins mittels si-RNA keine Veränderung der Zytotoxizität von Doxorubicin in NSCLC-Zellen feststellen. Der

Resistenzmechanismus liegt bei diesem Protein jedoch innerhalb der Zelle, indem es die zytotoxischen Substanzen aus dem Zellkern transportiert. Ein Transporter, der nicht der ABC-Familie zugeordnet wurde, konnte in Lungenzellen gefunden werden, das sogenannte RLIP76. Stuckler et al. (2005) berichteten über den RLIP76-abhängigen Transport von Vinorelbine, der ATP-abhängig ist. Eine Überexpression des Transporters führte zur verringerten Konzentration an Vinorelbine in der Zelle. Andere Substrate sind die *Vinca*-Alkaloide Vincristin, Vinblastin und Colchicin [Stuckler et al., 2005].

5.3. Einfluss von Prostaglandinen auf die Zellvitalität und die Regulation der Expression von MRP1 und MRP3-MRP5 durch Prostaglandine

Die *Multidrug resistance associated*-Proteine (MRP) werden für die Resistenz gegenüber verschiedenen Medikamenten verantwortlich gemacht. Methotrexat wurde zum Beispiel als Substrat für MRP1 identifiziert. Das MRP2-Substratspektrum beinhaltet Cisplatin, Vincristin und Doxorubicin. MRP3 transportiert zum Beispiel Methotrexat (MTX). MRP4 wurde als Transporter von Nukleosidanaloga (PMEA und AZTME; Medikamente gegen humane immunschwächende Viren) beschrieben [Borst et al., 2000]. Eine Beteiligung von MRP5 an Medikamentenresistenzen ist umstritten. Zwar konnten geringe Resistenzen gegenüber Thiopurinen und PMEA festgestellt werden, gegen viele andere Cytostatika, wie Anthrazykline, *Vinca*-Alkaloide oder MTX, jedoch nicht [Borst et al., 2000].

In 30 Lungenkrebszelllinien korrelierten die mRNA-Mengen der Transporter MRP1 und 3, nicht jedoch von MRP2 mit der Resistenz gegenüber Doxorubicin, Vincristin, Cisplatin und VP-16. Die Proteinmenge der 3 untersuchten Transporter waren in NSCLC- gegenüber SCLC-Zelllinien höher. [Young et al., 2001]. In Untersuchungen an Biopsie-Proben von 50 Lungenkrebspatienten mit SCLC zeigten 17 Patienten von 23 mit geringer Reaktion auf Chemotherapie einen detektierbaren Level an MRP1 [Hsia et al., 2002]. In unseren 3 verschiedenen Lungenzellkulturen konnten MRP1, MRP3, MRP4 und MRP5 (bisher jedoch nicht MRP2) auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Immunzytochemische Methoden konnten alle Isoformen MRP1 –5 in primären Bronchialepithelzellen in Kultur nachweisen [Torky et al., 2005]. Ein Vergleich der Zelltypen untereinander zeigte eine deutlich erhöhte Expression der Transporter MRP1, MRP3 und MRP4 in der Tumorzelllinie A549 verglichen mit primären Bronchialepithelzellen. Im Gegensatz dazu lag MRP5 in geringerer Menge vor im Vergleich zu den Primärzellkulturen. Gründe könnten im Unterschied zwischen Normalgewebe und Tumorzelllinie liegen, aber auch in der unterschiedlichen Kultivierung.

Lehmann et al. (2001) beschrieben eine gesteigerte MRP1-mRNA Expression in gesplitteten normalen humanen Bronchialepithelzellen in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Jedoch verhielt sich das Protein über die Zeit relativ konstant. Die gesteigerte MRP-Expression in der permanenten Zelllinie A549 ist vermutlich auf die Unterschiede zwischen Tumor- und Normalzellen zurückzuführen, da in Lungentumoren vor allem die Proteine MRP1 und MRP3 überexprimiert beschrieben sind. Um jedoch die Kultivierungsbedingungen als mögliche Begründung auszuschließen, sollten Versuche mit dem selben Kulturmedium durchgeführt werden.

Über die Regulation der Genexpression verschiedener MRP-Proteine ist wenig bekannt. In Ratten mit erhöhter Bilirubinproduktion wurde eine erhöhte MRP1 Genexpression beobachtet [Cekic et al., 2003]. Maeda et al. (2004) beschrieben eine erhöhte Genexpression von MRP1 nach Behandlung mit Cisplatin. Jedoch konnte diese Hochregulation durch Vorbehandlung mit Docetaxel verhindert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Redox-aktive Substanzen wie Quercetin, tert.-Butylhydrochinon, Pyrrolidinedithiocarbamat, Sulindac oder Menadion die Expression von MRP1 steigern [Haimeur et al., 2004].

In der humanen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP konnte mittels temperatursensibler p53 Mutante eine Suppression von MRP1 durch p53 beobachtet werden. Die funktionsunfähige Variante von p53 (bei 38°C) zeigte dabei eine erhöhte Expression des Transporters mit einer verringerten intrazellulären Akkumulation von Leukotrien C4 [Sullivan et al., 2000]. In 5 verschiedenen Gliom-Zelllinien wurde der Effekt von p53-Mutation auf die MRP1 Expression und Aktivität untersucht. In 2 der Zelllinien konnte eine Erhöhung der Expression und der Aktivität beobachtet werden. Eine der Zelllinien zeigte eine verringerte Expression, während 2 Zelllinien keine Reaktion zeigten. Die Behandlung mit Vinkristin (ein Substrat von MRP1) zeigte aber eine erhöhte Sensibilisierung der Zellen bei einer p53-Mutation [Bähr et al., 2001]. Das zeigt die Komplexität der Resistenzausbildung gegenüber Chemotherapeutika, die nicht nur auf einem Mechanismus beruhen. Der Mechanismus der MRP1-Unterdrückung ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise auf die Deaktivierung des Promotorbindungsfaktors SP1 durch p53 [Scotto et al., 2003].

In der Region des MRP1-Promotors wurde eine mutmaßliche AP1-Bindestelle identifiziert [Scotto et al., 2003]. In der hochresistenten SCLC-Zelllinie H96AR konnte nachgewiesen werden, dass die Transkriptionsfaktoren c-Jun und JunD an dem Proteinkomplex (AP1) beteiligt sind. Diese beiden Faktoren waren im Vergleich zu weniger resistenten Zellen hochreguliert [Kurz et al., 2001].

In Rattenhepatozyten konnte der Einfluss der Prostaglandine E2 und F2 α auf den Mdr1b-Transporter, ein ABC-Transporter nahe verwandt mit MRP, nachgewiesen werden [Ziemann et al., 2002]. Aufgrund der funktionellen und strukturellen Verwandtschaft der Transporter sollte der Effekt der Prostaglandine auf die MRP-Transporter in der Lunge untersucht werden. Die Testung der Reaktion von MRP auf mRNA-Ebene gibt Aufschluss über die transkriptionelle Regulation. Die Messung auf Western Blot-Ebene blieb bisher ohne Erfolg, ausgenommen für MRP3 in der Tumorzelle A549 (Daten nicht gezeigt), welche in der mRNA stark hochreguliert war gegenüber der Primärkultur. Die Testung der Transportaktivität für das MRP1 spezifische Substrat CDF gab anschließend Auskunft über die Auswirkung der Expressionserhöhung auf die Aktivität.

Zuerst wurde der Einfluss der Prostaglandine auf die Vitalität der Zellen untersucht. Dies geschah mittels MTT-Test, der die Umsetzung vom gelben Tetrazoliumbromid in das wasserunlösliche blaue Tetrazoliumsalz durch mitochondriale Dehydrogenasen misst. Die Umsetzung ist zur Zellzahl vitaler Zellen proportional. Während in Bronchialzellen und der Tumorzelle A549 kein direkter Einfluss von Prostaglandin E2 und dessen Lösungsmittel Ethanol auf die Vitalität nachgewiesen werden konnte, zeigten die peripheren Lungenzellen in den geringeren Konzentrationen von 1 und 5 μM eine Erniedrigung der Vitalität. In der Literatur ist hingegen eher eine Proliferations-steigernde Wirkung des Prostaglandins beschrieben. Am Epithel der Atemwege konnten Savla et al. (2001) eine Proliferations-stimulierung und somit gesteigerte Wundschlussreaktionen durch Prostaglandin E2 bei Konzentrationen von 0,01 bis 1 μM beobachten. Eine gesteigerte Proliferation konnte auch in Mäuse-Fibroblasten [Moreno et al., 1997] und in glomerulären Epithel von Ratten [Cybulsky et al., 1992] gezeigt werden. In glatten Muskelzellen von pulmonalen Arterien hingegen konnte ein proliferationsinhibierender Effekt durch gesteigerte Prostaglandinbiosynthese bei Hypoxie beobachtet werden [Yang et al., 2002]. Ebenso konnte in glatten Muskelzellen der Atemwege eine proliferationshemmende Wirkung nachgewiesen werden [Chembers et al., 2003]. Die Wirkunterschiede auf die Zellteilung sind vermutlich auf unterschiedliche Expression der Rezeptortypen von Prostaglandin E2 zurückzuführen.

Die Bronchialepithelzellen zeigten im MTT-Test nach Prostaglandin F2 α Behandlung die Tendenz zur Proliferationssteigerung. In Osteoblasten sind proliferationssteigernde Wirkungen von Prostaglandin F2 α beschrieben [Hakeda et al., 1991, Quarles et al., 1993]. Die Tumorzelle A549 zeigte keinen Einfluss von Prostaglandin F2 α auf die Vitalität der Zellen. Ebenso wie bei Prostaglandin E2 war in peripheren Lungenzellen bei geringen Dosen

an Prostaglandin F2 α ein Vitalitätsverlust zu verzeichnen, der jedoch nicht unter 80% lag. Dieser Effekt wurde in höheren Dosen nicht festgestellt.

MRP1: Mit einem Faktor von $2,4\pm 0,35$ konnte eine erhöhte Expression von MRP1 in Bronchialepithelzellen nach Behandlung mit Prostaglandin E2 über 72 h beobachtet werden. Diese Reaktion war nur bei einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ Prostaglandin E2 deutlich ausgeprägt. Die Tumorzelllinie A549 und die peripheren Lungenzellen zeigten keinen Effekt. Im Gegensatz zum *mdr1b* Gen [Ziemann et al., 2002] konnte kein Effekt von Prostaglandin F2 α auf die MRP1-Expression nachgewiesen werden. Gründe dafür könnten eine unterschiedliche Genexpressionsregulation der beiden Proteine, Spezies- und Organunterschiede sein. Die Transportaktivitäts-Messung der intrazellulären Akkumulation des MRP1 Substrates 5,6-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) bestätigte die mRNA-Expressionsexperimente. Die Regulation der MRP1 Expression beruht also auf der Steuerung der Genexpression. Während in Bronchialzellen nach 72 h eine verringerte Akkumulation nach Prostaglandin E2-Behandlung gemessen wurde, waren keine Unterschiede im intrazellulären CDF-Gehalt nach Behandlung mit Prostaglandin F2 α zu erkennen. Auch hier zeigten Tumorzelllinie und periphere Lungenzellen keine veränderte Reaktion.

Die Beteiligung von Entzündungsreaktionen an der Regulation von MRP1 wird viel diskutiert. So konnte in der kolorektalen Tumorzelllinie HT29 eine Induktion von MRP1 durch Interleukin 1 β beobachtet werden [Ikegami et al., 2000]. Diese Reaktion wurde über Stickstoffmonoxid (NO) abhängige Signalwege vermittelt. In humanen Hepatozelllinien (HuH7 und HepG2) zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung von MRP1 nach Behandlung mit Interleukin 1 β und Interleukin 6 [Lee et al., 2003]. Ebenso konnte in verschiedenen Zellkulturen eine Beteiligung von TNF α an der Induktion von MRP1 nachgewiesen werden [Stein et al., 1997, Lee et al., 2003]. Lipopolysaccharide sind in Infektionserkrankungen Vermittler akuter Entzündungsreaktionen. Sie stimulieren die Bildung inflammatorischer Zytokine, z.B. TNF α . Im Tierversuch konnte eine Erhöhung des Transporters MRP1 durch LPS beobachtet werden [Cherrington et al., 2004]. Eine Behandlung mit Dexamethason, das die Synthese von Zytokinen hemmt, verhinderte die MRP Überexpression. Im AECG-Medium ist ein anderes Glucocortikoid Hydrocortison ($0,5\mu\text{g/ml}$) enthalten, möglicherweise zeigt Hydrocortison auch Einfluss auf die geringere Expression von MRP1, MRP3 und MRP4 im Vergleich zur Tumorzelllinie A549.

MRP3: Die Behandlung von Bronchialzellen mit Prostaglandin E2 zeigte sowohl in Bronchialepithelzellen (Faktor: $2,6\pm 0,75$) wie auch in peripheren Lungenzellen ($2,9\pm 0,97$) einen stimulierenden Einfluss auf die Genexpression von MRP3. Dieser Effekt war jedoch

aufgrund der hohen interindividuellen Varianzen nicht signifikant. Für signifikante Ergebnisse sollte die Patientengruppe vergrößert werden. Während bei den normalen humanen Bronchialzellen alle Kulturen, jedoch im unterschiedlichen Ausmaß reagierten, zeigten 2 Kulturen der peripheren Lunge keine Reaktion auf die Prostaglandin E2 Behandlung (Abbildung 38). Der Vergleich der beiden Patienten mit der reagierenden Patientengruppe hinsichtlich der Patienten-individuellen Vorgeschichte brachte jedoch keinen Aufschluss.

MRP3-Transkription kann durch verschiedene Xenobiotika, wie β -Naphthoflavon, 2-Acetylaminofluoren [Haimeur et al., 2004], oder Arzneimittel wie Phenobarbital [Cherrington et al., 2003] und nichtsteroidale anti-inflammatorisch wirksame Medikamente induziert werden [Haimeur et al., 2004]. Untersuchungen an der Promotorregion deuten auf eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren SP1, SP3 und α -1-Fetoprotein an der Regulation der MRP3-Transkription hin [Scotto et al., 2003].

Inflammatorische Reaktionen zeigen ebenfalls wie bei MRP1 einen Einfluss auf die MRP3-Expression. So konnte eine erhöhte Expression nach Lipopolysaccharid-Exposition festgestellt werden [Cherrington et al., 2004, Donner et al., 2004]. Die Beteiligung von TNF α konnte ebenfalls nachgewiesen werden [Bohan et al., 2003, Lee et al., 2003]. Zytokine (Interleukin 1 β und Interleukin 6) zeigen eine Induktion der MRP3 Expression. In Mäusen konnte ein gegenteiliger Effekt von Interleukin 6 und LPS beobachtet werden. Hier wurde eine verminderte Expression von MRP3 beobachtet [Siewert et al., 2004].

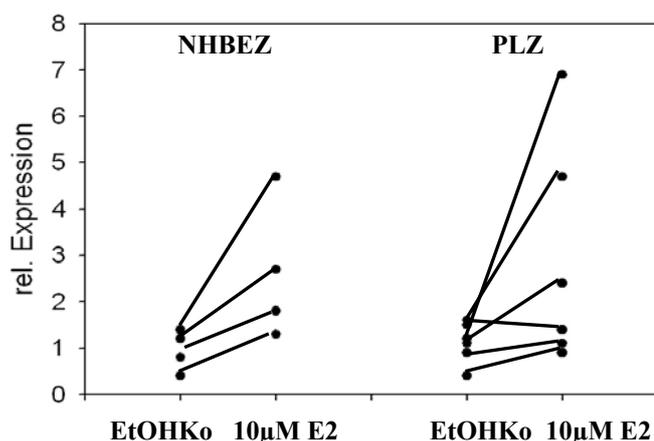


Abbildung 38: Dotblotanalyse der Einzelversuche zur MRP3-Expression nach Exposition gegenüber Prostaglandin E2 im Vergleich zur Ethanolkontrolle

MRP4: MRP4 zeigt einen unterschiedlichen Aufbau im Vergleich zu MRP1 und MRP3, da eine Transmembrandomäne fehlt [Haimeur et al., 2004, Borst et al., 2000]. Der Transport von zyklischen Monophosphaten, wie cAMP und cGMP konnte in MRP4 transfizierten HEK293-

Zellen gezeigt werden [Wielinga et al., 2003]. Dieser Transport war Glutathion-unabhängig und konnte durch Prostaglandin A1 sowie E1 gehemmt werden. Dabei gelten die zyklischen Monophosphate als Substrate niedriger Affinität, da der intrazelluläre cGMP-Spiegel durch erhöhten Transport kaum verändert wurde [Wielinga et al., 2003]. Bai et al. (2004) konnten den Transport von Biman-Glutathion in MRP4 transfizierten HepG2-Zellen nachweisen und somit die Möglichkeit des Transportes von Glutathion-Konjugaten durch MRP4. In Membranvesikeln der Zelllinie HEK293 konnte der Transport von Prostaglandin E1 und E2 nachgewiesen werden [Reid et al., 2003]. Als mögliche Substrate werden auch Prostaglandin F1 α , F2 α , A1 und Thromboxan A2 genannt. Nichtsteroidale Antiphlogistika, wie Indomethazin oder Ketoprofen wirkten inhibierend auf den Transport.

Die Beteiligung von MRP4 an Chemotherapieresistenzen ist umstritten. Kool et al. (1997) konnten keinen Zusammenhang zwischen Überexpression von MRP4 und Resistenzen gegenüber Cisplatin und Doxorubicin feststellen. In einer Cisplatin-resistenten kleinzelligen Lungenkrebszelllinie konnten im Vergleich zur Cisplatin-sensitiven Parentalzelllinie 2 zusätzliche Punktmutationen im MRP4-Gen festgestellt werden. Der Nachweis der Beteiligung des mutierten MRP4 an der Resistenz konnte jedoch nicht geführt werden [Savaraj et al., 2003]. Steinbach et al. (2003) konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen MRP4-Expression und Reaktion auf Chemotherapie bei Kindern mit akuter myeloider Leukämie feststellen. Leggas et al. (2004) konnten eine Beteiligung von MRP4 am Transport von Topotecan im Gehirn beobachten. Sie schreiben MRP4 zwei Funktionen im Schutz vor der Zytotoxizität zu, zum einen den Schutz durch verminderte intrazelluläre Akkumulation, zum anderen die Verringerung der Penetration von Topotecan über die Blut-Hirn Schranke ins Gehirn. Leggas et al. (2004) weisen damit auf eine mögliche Beteiligung an Therapieresistenzen gegenüber Hirntumoren hin.

Über die Induzierbarkeit des Transporters ist nur wenig bekannt. In der Leber der Ratte waren erhöhte MRP4-Konzentrationen durch die EpRE (elektrophiles Responseelement)-Aktivatoren Ethoxiquin und Oltipraz zu finden. Auch der Cytochrom P450 2E1 Aktivator Streptozotosin zeigte einen Einfluss auf die Induktion von MRP4 [Chen et al., 2004]. Im Unterschied dazu konnte in der Niere nur ein Effekt von β -Naphthoflavon (Ah-Rezeptor-Ligand) auf die Induktion des MRP4-Transporters nachgewiesen werden [Chen et al., 2004]. Dies weist auf unterschiedliche Regulationsmechanismen in unterschiedlichen Organen hin. Eine erhöhte MRP4 Expression konnte ebenfalls in Ratten mit obstruktiver Cholestasis (Gallengangverschluss) beobachtet werden. Aufgrund unveränderter mRNA-Expression sind hierfür wahrscheinlich posttranskriptionale Prozesse verantwortlich [Denk et al., 2004]. Wir

untersuchten den Einfluss von Prostaglandin E2 und F2 α auf die mRNA-Expression von MRP4 in humanen Lungenzellen. Weder Prostaglandin E2 noch F2 α zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Expression. Ein leichter Trend war nach 72 h bei den Bronchialzellen nach Behandlung mit PG E2 zu sehen, der jedoch physiologisch kaum von Bedeutung sein dürfte. Eine Induktion von MRP4 durch Lipopolysaccharide konnte in der Rattenleber nicht nachgewiesen werden [Donner et al., 2004].

MRP5: Wie MRP4 besteht MRP5 aus 4 Proteindomänen, 2 Transmembrandomänen und 2 Nukleotidbindedomänen. Überexpression von MRP5 in Medikamenten resistenten Tumoren wurde eher selten gefunden [Haimeur et al., 2004]. Bei Kindern mit akuter myeloider Leukämie konnte keine Assoziation zwischen MRP5 Expression und Behandlung der Krebsart festgestellt werden [Steinbach et al., 2003]. Ebenso konnten Kool et al. (1997) in resistenten Zelllinien keine korrelierende Aussage zur MRP5-Expression und Resistenz zu Cisplatin und Doxorubicin treffen. König et al. (2005) hingegen konnten erhöhte MRP5-mRNA-Konzentrationen in pankreatischen Karzinomen im Vergleich zu Normalgewebe feststellen. Diese Erhöhung war im Gegensatz zu MRP3 unabhängig vom Tumorstadium und Differenzierungsgrad. Er postuliert eine mögliche Ursache für Therapeutikaresistenzen, wie Gemcitabin, in einer Überexpression von MRP5.

Der Transport von zyklischen Monophosphaten (cGMP und cAMP) konnte in MRP5 transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Ebenfalls war keine deutliche Verringerung des intrazellulären cGMP-Gehaltes durch MRP5 Überexpression im Vergleich zu MRP4 zu verzeichnen, weshalb der Transporter als *low Affinity*-Transporter beschrieben wird [Wielinga et al., 2003]. In Trophoblasten der Plazenta postulieren Meyer zu Schwabedissen et al. (2005) eine Regulationsfunktion von cGMP durch MRP5. Sie konnten an isolierten Basalmembranen den Nachweis (Lokalisation von MRP5) eines vesikulären, ATP-abhängigen Transportes mittels radioaktiv markiertem c-GMP führen. Ebenso konnte sie zeigen, dass die MRP5 Expression variierte in Abhängigkeit von der Schwangerschaftsdauer. Damit schreiben sie MRP5 eine Rolle in der Plazentaentwicklung zu. Wir untersuchten die Induzierbarkeit von MRP5 durch Prostaglandin E2 in verschiedenen Lungenzellen. Hier konnte nur eine grenzwertige geringe Erhöhung (Faktor: $1,8 \pm 0,61$) in den Bronchialepithelzellkulturen nach Behandlung mit Prostaglandin E2 beobachtet werden. Davon zeigten 2 Patienten kaum eine Reaktion, während 2 Patienten deutliche Unterschiede zeigten. In Abbildung 39 sind die Einzelwerte dargestellt. Aufgrund hoher individueller Schwankungen war die statistische Signifikanz nicht nachweisbar.

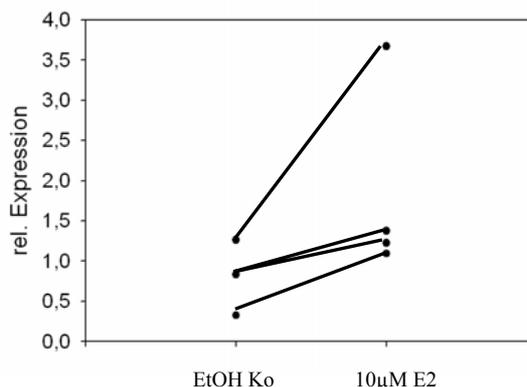


Abbildung 39: Dotblotanalyse der Einzelversuche zur MRP5-Expression in NHBEZ nach Exposition gegenüber Prostaglandin E2 im Vergleich zur Ethanolkontrolle

Die peripheren Lungenzellen und die Tumorzelle zeigten keine Reaktion. Ein Effekt von Prostaglandin F₂α war nicht nachzuweisen. Über die Induzierbarkeit von MRP5 ist bisher nur wenig bekannt. Donner et al. (2004) zeigten in der Rattenleber die Erhöhung der mRNA-Expression von MRP5 durch Lipopolysaccharide. Aufgrund der Erhöhung der cGMP-Produktion durch LPS vermuteten sie die Beteiligung von MRP5 an der cGMP-Homöostase als *Overflow*-Pumpe. Im Gegensatz zu MRP4 zeigt MRP5 in dermalen Fibroblasten keinen Effekt auf das proinflammatorische Zytokin Onkostatin M ebenso wie auf die Behandlung mit Interleukin 6 [Dreuw et al., 2004]. Der Kontakt mit HIV als infektiösem Erreger zeigt eine Erhöhung der Expression von MRP5 in Makrophagen. Diese Erhöhung wurde in einem unterschiedlichen Zeitfenster beobachtet im Vergleich zu MRP4, was möglicherweise auf einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus hinweist. Da die MRP4 Transkription sich gleichermaßen mit der TNF-α Produktion nach HIV-Infektion überschneidet, ist die Beteiligung proinflammatorischer Zytokine möglicherweise für die Hochregulation von MRP4 verantwortlich. Diese Korrelation war für MRP1 und 5 nicht zu beobachten. [Jurajuria et al., 2004]. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse und der wissenschaftlichen Literatur [Donner et al., 2004] ist eine Beteiligung inflammatorischer Reaktionen auf die Regulation von MRP5 nicht auszuschließen.

5.4. Prostaglandin E2 und Cadmiumtoxizität

Um einen funktionellen Effekt der MRP5 Expression nachzuweisen, untersuchten wir den Einfluss von Prostaglandin E2 auf die Cadmiumtoxizität. Mc-Aller et al. (1999) beschreiben eine geringere Sensitivität gegenüber Cadmium in MRP5 transfizierten Zellen im Vergleich

zur Parentalzelllinie. Cadmium ist ein stark toxisches Schwermetall. Es kommt an Industriearbeitsplätzen (Metallindustrie) vor, ist ein Hauptbestandteil von Zigarettenrauch und ist als Verunreinigung in Nahrungsmitteln aufgrund hoher Speicherkapazität an Proteinen zu finden [Lopez et al., 2003]. Cadmium als Schwermetall steht in seiner Toxizität noch vor Quecksilber. Cadmium wurde als kanzerogen mit der Klassifikation A2 eingestuft [Eikmann et al., 2002]. Die Hauptaufnahmequelle von Cadmium beim Menschen ist das Rauchen, die Lunge das Hauptaufnahmeorgan für Cadmiumverbindungen. Es induziert Lungentumore, pulmonale Fibrosen und Emphyseme in der Lunge [Lag et al., 2002]. Neben Schäden des Respirationstraktes wurden auch renale, vaskuläre sowie Schäden im Skelettgerüst beschrieben [Shih et al., 2003]. Verschiedene Mechanismen für die Cadmium Zytotoxizität wurden beschrieben. So bindet Cadmium an Thiolgruppen in Proteinen oder es kommt zum Austausch von Zink in Zink-haltigen Proteinen. Das kann zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der Proteine führen. Auch wurden Einflüsse auf den Energiemetabolismus und die Proteinbiosynthese beschrieben [Wätjen et al., 2002]. Induzierte reaktive Sauerstoffspezies durch Cadmium können DNA-Schäden hervorrufen [Filipie et al., 2004]. Die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies in der Toxizität von Cadmium ist jedoch umstritten. Hart et al. [1999] postulierten im Gegensatz zu Lag et al. (2002) einen Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Toxizität von Cadmium aufgrund der Hochregulierung oxidativer Stressenzyme, wie Glutathion-S-Transferase a, der γ -Glytamylcystein-Synthetase und Metallothionein-1 sowie Induktion oxidativer Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B und Modulation von GSH. Jimi et al. (2004) berichteten über die Beteiligung von Glutathion an Cadmium-Resistenzen. Cadmium hat genregulatorische Eigenschaften, wie zum Beispiel auf die Protoonkogene c-fos und c-jun. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften zu Kalzium ist der Einfluss von Cadmium auf Kalziumkanäle und -pumpen beschrieben. In niedrigen Konzentrationen stimuliert Cadmium die DNA-Synthese und das Zellwachstum [Wätjen et al., 2002].

Hinsichtlich der Toxizität wurden 2 verschiedene toxikologische Endpunkte untersucht: 1) Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen mittels MTT-Assay aufgrund des proteindenaturierenden Potentials von Cadmium und 2) Apoptoseinduktion mittels Messung der Aktivität der Effektorcaspasen 3/7. Der MTT-Test zeigt, dass Cadmium ab Konzentrationen größer 5 μ M zytotoxisch wirkt. Unterschiede in der Toxizität zwischen Prostaglandin E2 vorbehandelten und unvorbehandelten Proben konnten nicht festgestellt werden.

Die Induktion von Caspase 3 durch die Behandlung mit Cadmium konnte in dieser Arbeit in Bronchialepithelzellen der menschlichen Lunge nachgewiesen werden, was auf einen Caspase-abhängigen Mechanismus hinweist. Eine Aussage, über welchen Apoptosesignalweg (Rezeptor vermittelte oder mitochondriale Signalkaskade) der Zelltod gesteuert wird, kann aufgrund der Beteiligung von Caspase 3 in beiden Signalwegen nicht ermittelt werden. Vergleicht man die Reaktion der Prostaglandin E2 vorbehandelten und unvorbehandelten Zellen, so lassen sich keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Toxizität erkennen. Ein Effekt von erhöhtem Cadmium-Efflux durch höhere MRP5-Expression lässt sich somit nicht ableiten. Shi et al. (2003) beschreiben in humanen normalen Lungenzellen erstmals eine Caspase-unabhängige Induktion der Apoptose, da in Gegenwart von Caspaseinhibitoren keine Veränderung in der Toxizität von Cadmium gefunden werden konnte. Diese Aussage kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da eindeutig nach 24 h Cadmiumbehandlung Caspase 3-Aktivität erhöht vorlag.

Es werden unterschiedliche Signalkaskaden für die Cadmium induzierte Apoptose diskutiert. In humanen Lymphomzellen konnten Li et al. (2000) zeigen, dass die Apoptose über 2 verschiedene Signalkaskaden induziert wird, zum einen über einen Caspase 8-abhängigen Signalweg und zum anderen über den Ca^{2+} - Calpain abhängigen Signaltransduktionsweg. Es konnte ebenso eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials wie auch die Verringerung des antiapoptotischen Bcl xl-Proteins beobachtet werden. In Myokardzellen, Zellen der glatten Muskulatur sowie in Gliazellen konnte Apoptoseinduktion durch Cadmium nachgewiesen werden. Hier wurde Chromtinkondensation, die Aktivierung der Caspase 3 aber auch eine Erhöhung des proapoptotischen Bad-Proteins und eine Verringerung des antiapoptotischen Bcl2-Proteins beobachtet [Choi et al., 2002]. Lopez et al. (2003) beschrieben eine Konzentrations-abhängige Aktivierung der Apoptose (Translokation von Phosphatidylserin, Caspase 3-Aktivierung) bei niedrigen Konzentrationen bzw. eine Stimulierung der Nekrose (LDH- und ATP-Ausschüttung) bei hohen Konzentrationen. Cadmium induzierte Nekrose konnte durch Zugabe von Serum vermutlich durch die Bindung an Plasmaproteine verringert werden. Durch die Aktivierung von Caspase 9 und dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials in C6 Gliomzellen der Ratte wird die Beteiligung der mitochondrialen Caspase-Kaskade in der Cadmium induzierten Apoptose diskutiert [Wätjen et al., 2002]. In Alveolar-Typ II und Clara-Zellen der Ratte zeigte sich eine Erhöhung der proapoptotischen Proteine p53 und Bax durch Behandlung mit Cadmium. Diese Veränderungen waren jedoch nicht mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und der antioxidativen Abwehr assoziiert [Lag et al., 2002].

Einen direkten Einfluss zeigt der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4E (eIF4E), welcher essentiell für die Proteinbiosynthese benötigt wird, auf die Cadmiumtoxizität. EIF4E wird vermutlich aufgrund des Abbaus durch Ubiquitinylierung nach Cadmium-Behandlung inhibiert. Inhibierung des Translationsfaktors mittels siRNA zeigte Toxizität bis hin zum Zelltod, während die Überexpression zu Resistenzen gegenüber CdCl₂ führte. Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4E wurde als Protoonkogen beschrieben, spielt aber aufgrund der Inhibierung durch Cadmium bei dessen Kanzerogenese keine entscheidende Rolle [Othumpangat et al., 2005].

5.5. Grundexpression der Prostaglandin E2 Rezeptoren in den humanen Lungenzellkulturen

Für die Vermittlung Prostaglandin E2 abhängiger Signale sind 4 membranständige Rezeptortypen EP1 bis EP4 verantwortlich. Die verschiedenen Wirkungen von Prostaglandin E2 werden über die verschiedene Rezeptorausstattung der verschiedenen Gewebe reguliert. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Lungenzellen hinsichtlich der Induktion der MRP-Transporter auf die Prostaglandin E2 Behandlung wurde die Rezeptorausstattung in den Bronchialzellen, den peripheren Lungenzellen und der Tumorzelllinie A549 mittels Western Blot und Immunzytochemie analysiert.

Die Ergebnisse zeigten auf, dass die Tumorzelllinie deutlich geringere Rezeptormengen exprimiert als die Primärkulturen. Hinsichtlich ihrer funktionell notwendigen Lokalisation an der Zellmembran war EP3 als einziger Rezeptor membranständig exprimiert. Auch hier zeigten sich Unterschiede zur Tumorzelllinie A549, da diese den Rezeptor intrazellulär exprimierten. EP4 konnte in der Tumorzelllinie nicht identifiziert werden. Die Ergebnisse erklären vor allem das Fehlen der Reaktion der MRP-Isoformen auf die Prostaglandin E2-Behandlung in der Tumorzelllinie. Der Bezug im Vergleich zwischen den Primärkulturen war nicht eindeutig, da die Expressionsunterschiede zur Kultur normaler Bronchialepithelzellen eher gering waren. Aus diesem Grund müssen weitere Untersuchungen hinsichtlich der Aufklärung des Mechanismus Prostaglandin E2 induzierter MRP-Überexpression erfolgen.

Strukturell gehören die Prostaglandin E2 Rezeptoren zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren vom Rhodopsin Typ [Narumiya et al., 1999]. Sie weisen 7 Transmembrandomänen auf. Hinsichtlich ihrer Funktion werden sie in 3 Klassen eingeordnet. EP1 gehört zu den kontraktilen Rezeptoren, während EP2 und EP4 zu den relaxierenden

Rezeptoren zählen. EP3 wird zu den inhibitorischen Rezeptoren gezählt [Narumiya et al., 1999].

Aufgrund der Vielzahl physiologischer Funktionen wird im Folgenden einzeln auf die Rezeptorsubtypen eingegangen.

EP1-Rezeptor: EP1 als kontraktiler Rezeptor vermittelt die Signalübertragung über Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes [Hata et al., 2004, Narumiya et al., 1999]. Das G-Protein für die intrazelluläre Signalübertragung von EP1 ist bis heute nicht identifiziert [Hata et al., 2004]. In der Maus wurde EP1-mRNA in Niere, Lunge [Watabe et al., 1993] und Magen [Narumiya et al., 1999] gefunden. In der Ratte konnte EP1 im ZNS, genauer im Spinal-Dorsal Horn, nachgewiesen werden [Nakayama et al., 2002]. In EP1-Knockoutmäusen wurden signifikant weniger Darmtumore durch Azoxymethan induziert als in den Wildtypmäusen [Kawamori et al., 2004]. Der Proliferationsmarker NOR (*nukleolar organizer region protein*) war heruntergesetzt. Auch war die Apoptoserate in Tumoren von Mäusen ohne EP1 Rezeptor deutlich höher, was EP1 möglicherweise zu einem neuen Ziel für die Chemoprävention von Darmkrebs macht. Stock et al. (2001) zeigten, dass EP1-Knockout Mäuse lebens- und fortpflanzungsfähig zur Welt kamen. Die Schmerzempfindlichkeit war um 50% heruntergesetzt im Vergleich zum Wildtyp. Neben dem Schmerzempfinden waren ein verringerter systolischer Blutdruck, sowie erhöhte Renin-Angiotensin-Aktivität feststellbar. Darum schreiben sie EP1 eine Funktion in der kardiovaskulären Homöostase zu.

Induktion von Entzündungsreaktionen durch Carrageenin, ein Zellwandpolysaccharid mit Sulfatseitengruppe, zeigten eine Erhöhung von Prostaglandin E2 sowie von Kalzium-Ionen im Spinal dorsal-Ganglion des Rückenmarks nach 15 h in der Ratte neben erhöhtem Schmerzempfinden und Pfotenödemen an der Injektionsstelle [Nakayama et al., 2002]. Die Behandlung mit dem EP1-Antagonisten ONO-8711 zeigte eine Verringerung der Kalziumkonzentrationen und somit die Beteiligung von EP1 an der Schmerzleitung in Carrageenin induzierter Hyperalgesie. Im Gastrointestinaltrakt wurde EP1 in der *muscularis mucosae*-Schicht des Magens mit vermutlicher Funktion in Beweglichkeit und Faltung der *mucosa*, in der Speiseröhre und im Darm nachgewiesen [Narumiya et al., 1999].

Der Nachweis auf Proteinebene ergab, dass der Prostaglandin E2-Rezeptors EP1 in primären Bronchialepithelzellen am höchsten exprimiert vorlag. Am deutlichsten waren die Unterschiede zur Tumorzelle A549, welche nur sehr geringe Mengen an EP1 zeigte. Eine tendenziell geringere Expression von EP1 zeigte sich auch bei den peripheren Lungenzellen. Während EP1 immunzytochemisch in der Tumorzelle nicht nachgewiesen werden konnte, zeigten die Primärkulturen der Lunge in hauptsächlich großlumigen Zellen intrazellulär

lokalisierte Fluoreszenzsignale. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen lag zwischen circa 20 – 40%. Für die funktionelle Aktivität und die Vermittlung intrazellulärer Signalkaskaden ist es notwendig, dass der Rezeptor in der Membran sitzt. Das konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

EP2-Rezeptor: EP2 ist nur im geringen Maße in Geweben der Niere, Lunge, Blase, Gebärmutter und Gehirn vorhanden, wird aber durch inflammatorisch wirkende Substanzen induziert [Narumiya et al., 1999, Desai et al., 2000]. So konnte in Maus peritonealen Makrophagen nach LPS Stimmulierung [Ikegami et al., 2001] eine Erhöhung des EP2 Rezeptors auf mRNA-Ebene nach 3 h beobachtet werden.

EP2 spielt eine Rolle auch in der Schwangerschaft, da Untersuchungen in weiblichen EP2-Knockout- Mäusen eine hohe Fehlerrate in der frühen Schwangerschaft aufwiesen [Narumiya et al., 1999].

Eine Beteiligung an inflammatorischer Exsudatakkumulation in EP2-Knockoutmäusen konnte nachgewiesen werden [Yuhki et al., 2004]. Die Regulation der Rezeptor-Aktivität spielt eine wesentliche Rolle in der Reaktion auf Prostaglandin E₂-Behandlung. Während EP₄ bereits nach wenigen Minuten von der Rezeptoroberfläche ins Zellinnere gebracht wird und somit die Aktivität gestoppt wird, zeigt EP₂, welches sehr nah mit EP₄ verwandt ist, diese Reaktion nicht [Desai et al., 2000]. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass EP₂ vermittelte Signalkaskaden eher für Reaktionen mit langanhaltenden Effekten von Prostaglandin E₂ verantwortlich ist.

Scherstress im Knochen induziert Prostaglandinausschüttung [Cherian et al., 2003]. So konnte in der Zelllinie MLO-Y4 gezeigt werden, dass nach Scherstress durch Prostaglandin E₂ GAP-junction-Funktion reguliert, sowie die Connexin43-Expression gesteigert wird. Dieser Effekt wird über EP₂-Aktivierung und über eine cAMP abhängige Proteinkinase-A Signalkaskade vermittelt [Cherian et al., 2003].

Dem Rezeptor EP₂ wird auch eine Funktion in der Invasivität von Eierstockkarzinomen zugesprochen. So ist die durch Endothelin 1 induzierter Prostaglandin E₂ Ausschüttung über EP₂ an der Induktion des vaskulären Endothelwachstumsfaktors (VEGF) beteiligt, welcher in der Zellmigration eine wesentliche Rolle spielt [Spinella et al., 2004]. Ebenso konnte die Transaktivierung des EGF-Rezeptors sowie eine erhöhte Invasivität der Zellen nach Behandlung mit Prostaglandin E₂ und Endothelin nachgewiesen werden [Hata et al., 2004].

Es wurden für den EP₂ Rezeptor sowohl pro- als auch antiinflammatorische Reaktionen beschrieben. Als proinflammatorische Reaktionen werden LPS-stimmulierende oxidative Schäden sowie das Aktivieren von Immunglobulin E in B-Lymphozyten beschrieben.

Antiinflammatorische Effekte sind die Inhibierung von T-Zellproliferation sowie die Inhibierung dendritischer Zellfunktionen in krebsassoziierten Immundefekten [Hata et al., 2004].

Der Prostaglandin E2-Rezeptor EP2 konnte in allen 3 Lungenzellkulturen nachgewiesen werden. Während sich die Expression des Rezeptors in Lungenzellen im Zytoplasma in Membrannähe bei den peripheren Lungenzellen befand konnte der Rezeptor wahrscheinlich als Vorstufe im Zellkern der Bronchialzellen sowie der Tumorzelle nachgewiesen werden. Eine Erklärung für das Vorkommen im Zellkern liefert die Literatur nicht. Aus diesem Grund kann eine Funktionstüchtigkeit des Proteins nicht nachgewiesen werden. Im Western Blot war EP2 mit einer Größe von 52kDa in allen Lungenzellen nachweisbar. Die densitometrische Analyse ergab, dass die Bronchialzellen die höchsten Proteinmengen aufwiesen. EP2 war in peripheren Lungenzellen grenzwertig in geringeren Proteinkonzentrationen vorhanden im Vergleich zu den Bronchialkulturen. Deutliche Unterschiede waren bei der Tumorzelle nicht festzustellen.

EP3-Rezeptor: Vom EP3 Rezeptor sind 8 unterschiedliche humane Spleißvarianten bekannt. Identifiziert wurde der Rezeptor durch die Hemmung der cAMP-Biosynthese. Inzwischen ist bekannt, dass die verschiedenen Spleißvarianten an unterschiedliche G-Proteine (G_s -, G_i -, G_q -Typ) koppeln und dadurch unterschiedliche Reaktionen, wie Inhibierung der Adenylatzyklase (G_i), Aktivierung der cAMP-Produktion (G_s) aber auch Phosphatidylinositol-Signalwege (G_q) auslöst [Narumiya et al 1999]. Für den Menschen sind 8 verschiedene Isoformen bekannt. Sie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit β -Arrestin (spezifischer Agonist) induzierter Internalisierung [Bilson et al., 2004] und somit wahrscheinlich hinsichtlich ihrer physiologischen Funktionen.

EP3 ist beteiligt an induzierter Hyperalgesie durch niedrige Dosen an Prostaglandin E2 [Minami et al., 2001]. Ebenfalls konnte eine Beteiligung von EP3 an Carrageenin induzierter Exsudatbildung in Mäusen nachgewiesen werden [Yukhi et al., 2004].

In proinflammatorischen Reaktionen ist EP3 an der Antigen-stimulierten Mastzellen-Degranulation beteiligt [Hata et al., 2004]. In der Tumorzelle A549 konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E2 das Zellwachstum über EP3 und damit verbundener Phosphorylierung von Src und Stat3 als Signalvermittler stimuliert [Yamaki et al., 2004]. Diese Signalkaskaden weisen Ähnlichkeiten zu Wachstumsfaktor EGF und HGF stimulierter Proliferation auf. Ebenso wie EP2 ist EP3 an der Regulierung von VEGF beteiligt. So konnte in Implantationsexperimenten von Sarcoma-Zellen in die Schilddrüse eine Beteiligung des EP3 Rezeptors an der Angiogenese und Entwicklung von Tumoren nachgewiesen werden

[Amano et al., 2003]. Hierbei zeigten EP3-Knockoutmäuse neben verringerter Angiogenese und Tumorstadium eine verringerte Menge an VEGF. Die Behandlung mit dem EP3-Antagonisten ONO-AE3-240 inhibierten das Tumorstadium und die Angiogenese in Wildtyp Mäusen nicht in EP3-Knockoutmäusen.

In den Bronchialzellen, in den peripheren Lungenzellen sowie in der Tumorstadium A549 konnte EP3 sowohl im Western Blot als auch in der Immunzytochemie nachgewiesen werden. Während in den primären Lungenzellen EP3 in ähnlichen Mengen vorlag, waren bei der Tumorstadium A549 geringere Mengen vorhanden. Auch war in der Tumorstadium die Fluoreszenz im Gegensatz zu den primären Kulturen intrazellulär lokalisiert, wo der EP3-Rezeptor in der Zellmembran nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse weisen auf eine intakte Funktion des Rezeptors in der Primärkultur hin. Yano et al. (2002) konnten in der Tumorstadium A549 ebenfalls EP3-Expression auf mRNA-Ebene nachweisen. Seinen Versuchen zufolge ist EP3 an der Aktivierung des Ras-Signalweges und an der Stimulation des Zellwachstums beteiligt. Einen Effekt von Prostaglandin E₂ auf die Proliferation bzw. die Vitalität konnte im MTT-Test in unserer A549 Zelllinie nicht beobachtet werden, möglicherweise als Folge der intrazellulären Lokalisation des Rezeptors.

EP4: EP4 weist ähnliche Eigenschaften wie EP2 auf und wurde ursprünglich aufgrund der Aktivierung der Adenylatzyklase auch als EP2-Rezeptor beschrieben. Die Strukturaufklärung und die unterschiedliche Substrataffinität zu den Agonisten AH13205 und Butaprost sowie dem Antagonisten AH23848 führten zur Identifizierung von EP4 [Narumiya et al., 1999]. Strukturaufklärungen zeigten eine längere C-terminale Domäne sowie eine Verlängerung des 3. intrazellulären Loops im Vergleich zu EP2. Die verlängerte C-terminale Domäne ist verantwortlich für die schnelle Internalisierung des Rezeptors [Desai et al., 2000]. Neben der Stimulation der cAMP-Synthese sind verschiedene Signalwege beschrieben. So beschrieben Pozzi et al. (2004) die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-abhängige Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK) durch den Prostaglandin E₂-EP4 Signalweg. Diese Signalkaskade führte zur Stimulation der Proliferation von Colonkarzinom-Zellen. Die Expression des EGR-1 (*early growth response factor 1*) wird über PI3K/ERK-Signalwege durch Prostaglandin E₂/EP4 Signaltransduktion induziert [Fujino et al., 2003]. Während die Signalwege von EP2 hauptsächlich über Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung verlaufen, werden EP4 Signale über PI3Kinase vermittelt [Fujino et al., 2002]. Die Phosphorylierung der Glycogen-synthase-3-Kinase konnte sowohl in EP2, wie auch in EP4 transfizierten Zellen nachgewiesen werden [Fujino et al., 2002]. Im Gegensatz zu Yano et al. (2002) konnte EP4 in der Tumorstadium A549 nicht nachgewiesen werden. Die

Primärkulturen der Lunge exprimierten EP4 in allen Patienten. Bei den peripheren Lungenzellen zeigte sich eine leicht geringere jedoch signifikante Expression von EP4 im Western Blot. Die Fluoreszenz lag intrazellulär im Membran-nahen Bereich. Die funktionelle Aktivität des Rezeptors kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Daten der Rezeptorexpression liefern einen Erklärungsansatz für die fehlende Induktion der MRP-Isoformen durch Prostaglandin E2 in den Tumorzellen A549, nicht jedoch für die fehlende Reaktion in peripheren Lungenzellen, obwohl die Rezeptoren EP1, EP2 und EP4 die Tendenz zur geringeren Expression zeigten. Aufgrund der tendenziellen Induktion von MRP3 im Gegensatz zu MRP1 und MRP5 ist es möglich, dass die Expression der verschiedenen MRP-Isoformen über unterschiedliche Signalwege durch Prostaglandin E2 induziert werden. Um die Rezeptoren zu identifizieren, welche für die Induktion der MRP-Proteine verantwortlich sind, sollten Versuche mit spezifischen Anta- und Agonisten erfolgen. Aufgrund der Lokalisation der Prostaglandin E2-Rezeptoren in der Zelle, kann EP3 nur als funktionell aktiver Rezeptor in den Kulturen ohne Prostaglandin E2-Behandlung eindeutig angesehen werden. Inwieweit die Rezeptoren nach Behandlung aktiviert werden, soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.6. EGF: Einfluss auf die Lungenzellkultur und auf die MRP-Expression

EGF und HGF weisen Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion auf. Zum einen fördern sie die Proliferation verschiedener Zellkulturen [Runge et al., 1999 a, Cohan et al., 1986] Beide Wachstumsfaktoren beeinflussen die Metastasierung [Hamada et al., 1999, Nakopoulou et al., 2000, Yi et al., 2000, Mine et al., 2003]. Es werden für beide Rezeptoren sowohl proapoptisch vermittelnde Signalkaskaden [Matteucci et al., 2003, Fong et al., 2001] aber vor allem protektive Mechanismen gegen Apoptose beschrieben [Musallam et al., 2001, Derksen et al., 2003, Xiao et al., 2000]. Beide haben Einfluss auf die Zelldifferenzierung in verschiedenen Zellen [Stefan et al., 2001, Barka et al., 2005].

Die Funktion in der Tumorentwicklung liegt bei EGF an der Überexpression des EGF-Rezeptors [Franklin et al., 2002]. Die Beteiligung des HGF/c-met an der Kebsentstehung wurde vor allem bei Brustkrebs beschrieben, hierbei spielt die Coexpression von HGF und c-met und damit die autokrine Exkretion von HGF eine wesentliche Rolle. HGF wird im Normalgewebe nur von Mesenchymalzellen gebildet und sezerniert [Edakuni et al., 2001]. Auch an Rattenhepatozyten konnten Runge et al. (1999, b) zeigen, dass autokrin ausgeschüttetes hHGF den Zellen einen Wachstumsvorteil vermittelt im Gegensatz zur

neoplastischen Zelllinie HepG2, welche durch transfizierte HGF-Produktion ihr Wachstum verlangsamte. Möglicherweise gibt es Unterschiede in der Vermittlung von HGF-Signalen in neoplastischen und normalen Hepatozyten. In unserem Zellkultursystem waren in den primären Zellkulturen sowohl der EGF- wie auch der HGF-Rezeptor exprimiert. Untersuchungen mit EGF-Behandlung zeigten keinen Unterschied in der EGFR-Expression (Abb. 33) nach Behandlung im Gegensatz zum beschriebenen Abbau des EGF/EGFR-Komplexes bei Cohan et al. (1986). Der HGF-Rezeptor hingegen zeigte eine Runterregulierung durch EGF im Western Blot in Bronchialepithelzellen (Abb. 35).

Die Untersuchung der Vitalität nach EGF-Behandlung zeigte in hohen Dosen eine grenzwertige Erhöhung der Vitalität in der Tumorlinie, während in den Primärkulturen besonders den peripheren Lungenzellen die Vitalität erst absank und bei besonders hohen Konzentrationen wieder anstieg. Während überwiegend Proliferations-stimulierende Eigenschaften von EGF beschrieben wurden [Runge et al., 1999, a, Cohan et al., 1986], wurde in EGFR hochexprimierenden A432 Zellen ein Wachstumsarrest mittels Gadd45 bei einer EGF-Konzentration von 50 ng/ml beschrieben. Möglicherweise zeigen die Primärkulturen ebenso einen Wachstumsarrest, was die verringerte Vitalität erklären könnte. Für die Prüfung dieser Hypothesen müssten Zellzyklusanalysen für die Primärkulturen erstellt werden.

Da EGF sowohl Schutzmechanismen, wie auch proapoptotische Eigenschaften aufweist, wurde der Einfluss von EGF auf die Cadmiumtoxizität aufgrund der Apoptoseauslösung durch Cadmium [Stohs & Bagchi, 1995; Hassoun & Stohs, 1996; Choi et al., 2002, Watjen et al., 2002, Lopez et al., 2003; Shih et al., 2003] in Bronchialepithelzellen untersucht. Es konnten jedoch keine Hinweise für eine veränderte Toxizität von Cadmium im MTT-Test gefunden werden.

EGF beeinflusst inflammatorische Reaktionen. So induziert EGF die Prostaglandin E2 Synthese und Ausschüttung [Kang et al., 2000]. Ein weiterer Zusammenhang zwischen Prostaglandin E2 und EGF besteht in der Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch den Prostaglandin E2 Rezeptor EP2 [Hata et al., 2004]. Ziemann et al (2002) beschrieben am *mdr1b* Gen und im Funktionalitätstest in Rattenhepatozyten die Hochregulierung des Transporters durch EGF, wobei die Reaktion durch Verwendung von COX-Inhibitoren (Indomethazin, Meloxicam und NS-398) inhibiert wurde. Aus diesem Grund untersuchten wir die Induktion der MRP-Expression in Bronchialepithelzellen. Der Vergleich mit der Prostaglandin E2-Behandlung (Abbildung 18-21) ergab eine unterschiedliche Regulation der Transporter. Während MRP1 und MRP5 keine Reaktion auf die EGF Behandlung zeigten,

waren grenzwertige Reaktionen bei den Transportern MRP3 und MRP4 zu erkennen. Aus dem Grund der unterschiedlichen Induktion verschiedener MRP-Isoformen durch EGF im Vergleich zu Prostaglandin E2 ist anzunehmen, dass die Regulation der MRP-mRNA in Bronchialepithelzellen über unterschiedliche Signalkaskaden verläuft.

5.6. Vorteile im Umgang mit Primärkulturen zur permanenten Zellkultur

Primärkulturen bieten den Vorteil, als Modell näher der *in vivo* Situation angepasst zu sein. Viele Zelllinien, die über Jahre hinweg kultiviert werden, zeigen schon Unterschiede hinsichtlich des Wachstumsverhaltens im Vergleich zur Ausgangskultur. So nimmt die Zellwachstumsrate mit Dauer der Zellkultur in vielen Zellkultursystemen zu, was auf Kosten der Differenzierung geht [Morgan et al., 1994]. Als Beispiel wäre hier die humane promyelozyte Leukämie-Zelllinie HL-60 in ihrer Fähigkeit hinsichtlich der Dedifferenzierung mittels Dimethylsulfoxid im Vergleich zur Ausgangskultur und nach 10 Jahren Kulturdauer zu nennen. Hierbei zeigte die Langzeit-kultivierte Zelllinie deutlich weniger Reaktion auf DMSO wie die Ausgangszelllinie [Collins et al., 1979, Schwartzmann et al., 1987]. Schon in der Grundexpression der mRNA der verschiedenen MRP-Isoformen waren deutliche Unterschiede im Vergleich zwischen Primärkultur und Tumorlinie feststellbar. Auch reagierte die Tumorlinie A549 nicht auf die Behandlung mit Prostaglandin E2 mit einer MRP-Überexpression im Gegensatz zu den Bronchialepithelzellen. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf die veränderte Expression der Prostaglandin E2 Rezeptoren zurückzuführen.

Die Unterscheidung zwischen peripheren Lungenzellen und Bronchialepithelzellen ist in der unterschiedlichen Belastung durch Schadstoffe begründet. Während das gasleitende System den gesamten Schadstoffen ausgesetzt ist, kommen aufgrund des geringeren Querschnitts im Bereich des Gasaustausches und der Reinigungsmechanismen im gasleitenden System nicht alle Schadstoffe in die unteren Bereiche der Lunge. Jedoch sind Schadstoffe im gasleitenden System durch eine längere Verweilzeit gekennzeichnet. Es zeigten sich vor allem Unterschiede in der Regulierbarkeit von MRP1 durch Prostaglandin E2, da MRP1 in Prostaglandin E2 behandelten peripheren Lungenzellen weder in der Expression noch in der Akkumulation von CDF Unterschiede zur Kontrolle zeigte.

Patientenunterschiede hinsichtlich der Anamnese können sich auf die Expression vieler Proteine im Gewebe und in der Zellkultur auswirken. So konnte zum Beispiel bei weiblichen Rauchern mit Lungenkrebs eine erhöhte Cytochrom P450 1A1-Expression ermittelt werden,

welche Einfluss auf die Bildung von DNA-Addukten hat [Mollerup et al., 1999]. Chemotherapien mit Cisplatin können die MRP-Expression erhöhen [Maeda et al., 2004]. Die Beteiligung inflammatorischer Mediatoren an der Regulation von MRPs wurde bereits beschrieben [Cherrington et al., 2004, Donner et al., 2004]. Aus diesen Gründen ist es erforderlich, dass die Hintergründe der einzelnen Patienteninformationen in die Arbeit mit einfließen. Aufgrund geringer Patientenzahlen für die einzelnen Versuche war der Interindividual-Ansatz mit den Ergebnissen wie bei der MRP3-Expression gezeigt nicht deutlich korrelierbar.

6. Zusammenfassung

In vielen Arten von Lungenkrebs sind erhöhte Werte an Prostaglandin E2 aufgrund fehlerhafter Expression des Prostaglandinsynthese-Enzymes COX II zu finden. Ebenso zeigen viele Lungentumore Chemotherapieresistenzen mit erhöhter MRP-Expression. Ein Zusammenhang wurde bisher nicht untersucht. Aufgrund dieses Sachverhaltes sollten in dieser Arbeit der Einfluss von Prostaglandin E2 und dessen Gegenspieler Prostaglandin F2 α in der Lunge auf die Genexpression der verschiedenen MRP-Isoformen MRP1, MRP3, MRP4 und MRP5 untersucht werden.

Wir verwendeten als Untersuchungsmodell 3 verschiedene Lungenzellkulturen, 2 primäre Lungenzellkulturen (NHBEZ und PLZ) sowie die Adenokarzinomzelllinie A549. Die Gewebeauswuchskulturen primärer Lungenzellen weisen in ihrer Kultivierungsdauer und Generationenanzahl hohe inter-individuelle Varianzen auf. Die humanen Bronchialepithelzellen zeigen im Vergleich zu den peripheren Lungenzellen eine höhere durchschnittliche Generationenanzahl bei gleicher Kultivierungsdauer. Aus der immunzytochemischen Färbung kann man ableiten, dass die Bronchialepithelzellen einen zu über 95% epidermalen Charakter aufweisen. Die peripheren Lungenzellen sind eine Mischzellkultur mit 70-80% Anteil an epidermalen Zellen.

Im Vergleich zwischen der Tumorzelllinie A549 und den Primärkulturen der Lunge zeigte die Tumorzelllinie einen deutlich erhöhten Gehalt an MRP1-, MRP3- und MRP4-mRNA, während MRP5 in geringeren Mengen vorhanden war.

Die MRP1-mRNA Expression wurde in primären Bronchialepithelzellen durch Prostaglandin E2 nicht jedoch durch Prostaglandin F2 α stimuliert. Die Ergebnisse korrelieren mit der erhöhten Transportaktivität von MRP1. Deutliche Hinweise für eine Erhöhung der MRP3- und MRP5- Expression durch Prostaglandin E2 zeigten die Bronchialzellen. Auch zeigten die peripheren Lungenzellen eine Induktion der MRP3-Expression durch Prostaglandin E2, jedoch mit starken interindividuellen Varianzen.

Die fehlende Reaktion der verschiedenen MRP-Isoformen in der Tumorzelllinie A549 kann mit der verringerten Prostaglandin E2-Rezeptorausstattung (EP1, EP3, EP4 war nicht nachweisbar) gegenüber den Primärkulturen aus den Western Blot Experimenten erklärt werden. Die immunzytochemische Lokalisierung der Rezeptoren weist EP3 als einzigen membranständigen Rezeptor aus. Aufgrund der membrannahen Expression des EP4-Rezeptors ist eine funktionelle Aktivität nicht auszuschließen.

6. Zusammenfassung

In humanen Bronchialepithelzellen zeigte Prostaglandin E2 keinen Einfluss auf die Cadmiumtoxizität und Apoptoseinduktion. Somit konnte kein Bezug zwischen Prostaglandin E2 induzierter MRP5-Expression und dem in der Literatur beschriebenen gesteigerten Cadmiumefflux hergestellt werden.

Aufgrund fehlender Induktion der MRP1-Expression durch EGF konnte kein Zusammenhang zwischen EGF induzierter Prostaglandinausschüttung (in der Literatur beschrieben) und MRP1-Überexpression ermittelt werden. Aufgrund möglicher Erhöhung der MRP3 und MRP4 Transkription durch EGF ist zu vermuten, dass die durch EGF und Prostaglandin E2 vermittelte Induktion der beschriebenen MRP-Isoformen unabhängig voneinander verläuft.

Für die Untersuchung der Prostaglandin E2 gesteuerten Erhöhung der MRP-Expression sind aufgrund der veränderten Prostaglandin E2-Rezeptoren und MRP-Ausstattung die Primärkulturen besser geeignet als die Tumorzelllinie A549.

Die Induktion von MRP1 durch Prostaglandin E2 kann als mögliche Ursache für die Erhöhung der MRP1 Expression in Lungentumoren mit schlechter Behandlungsprognose angesehen werden, da auch viele Lungentumore eine erhöhte Prostaglandinbiosynthese zeigen. Eine Kombinationsbehandlung mit spezifischen Cyclooxygenase II-Hemmern wie Indomethazin könnten somit die Erfolgchancen für Chemotherapeutika erhöhen.

7. Referenzen

Amano H, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Yaruyama T, Kobayashi M, Satoh K, Narita M, Sugimoto Y, Murata T, Yoshimura H, Narumiya S, Majima M: Host prostaglandin E2-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* 197 (2) (2003), 221-232

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland: Krebs in Deutschland, Häufigkeit und Trends (2004), 40-43, Internetadresse: www.rki.de/Krebs

Bähr O, Wick W, Weller M: Modulation of MDR/MRP by wild-type and mutant p53. *Journal of Clinical Investigation* 107 (5) (2001), 643-645

Bai F, Nakanishi Y, Kawasaki M, Takayama K, Yatsunami J, Pei XH, Tsurata N, Wakamatsu K, Hara N : Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase-Pi can predict chemotherapy response in patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 78 (1996), 416-421

Bai J, Lai I, Yeo HC, Goh BC, Tan TMC. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates efflux of bimeane-glutathione. *International journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (2004), 247-257 (33)

Barka T, Gresik ES, Miyazaki Y: Differentiation of a mouse submandibular gland-derived cell line (SCA) grown on matrigel. *Epidermal Cell Research* (2005, in press)

Bilson HA, Mitchell DL, Ashby B: Human prostaglandin EP3 receptor isoforms show different agonist-induced internalisation patterns. *FEBS Letters* 572 (2004), 271-275

Bissig K-D, Marti U, Solioz M, Forestier M, Zimmermann H, Lüthi M and Reichen J: Epidermal growth factor is decreased in liver of rats with biliary cirrhosis but does not act as paracrine growth factor immediately after hepatectomy. *Journal of Hepatology*; 33 (2000), 275-281

Bohan A, Chen WS, Denson LA, Held MA, Boyer JL: Tumor necrosis factor a dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3 (Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis. *Journal of Biological Chemistry* 278 (38) (2003), 36688-36698

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 92 (16) (2000), 1295-1302

Bunn PA, Franklin W: Epidermal growth factor receptor expression, signal pathway, and inhibitors in non-small cell lung cancer. *Seminars in Oncology* 29 (5 Suppl. 14) (2002), 38-44

Carmichael J, De Graff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchel JB: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Research* 47 (4) (1987), 943-946

7. Referenzen

- Cekic D, Bellarosa C, Garcia-Mediavilla MV, Rigato I, Pascolo L, Ostrow JD, Tiribelli C. Upregulation in the expression of multidrug resistance protein Mrp1 mRNA and protein by increased bilirubin production in rat. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 311 (2003), 891-896
- Chambers LS, Black JL, Ge Q, Carlin SM, Au WW, Poniris M, Thompson J, Johnson PR, Burgess JK: PAR-2 activation, PGE₂, and COX-2 in human asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285 (2003), L619-L627
- Chen C, Klaassen CD: Rat multidrug resistance protein 4 (Mrp4, Abcc4): molecular, cloning, organ distribution, postnatal renal expression and chemical inducibility. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 317 (2004), 46-53
- Chen J: Estimated risks of radon-induced lung cancer for different exposure profiles based on the new EPA model. *Health physics* 88 (4) (2005), 323-333
- Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX: Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 278(44) (2003), 43146-43156
- Cherrington NJ, Slitt AL, Li N, Klaassen CD: Lipopolysaccharide-mediated regulation of hepatic transporter mRNA levels in rats. *Drug metabolism and Disposition* 32 (7) (2004), 734-741
- Choi MK, Kim BH, Chung YY, Han MS: Cadmium-induced apoptosis in H9c2, A7r5, and C6-Glial cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69 (2002), 335-341
- Chomczynski P, Mackey K: Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* 19(6) (1995), 942-945
- Cohan S: Epidermal growth factor. *Biosci Rep.* 6 (12) (1986), 1017-1028
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. : Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258 (1992), 1650-1654
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE and Gallo RC: Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *Journal of Experimental Medicine*, Volume 149 (1979), 969-974
- Courtois A, Payen L, Lagadic D, Guillouzo A, Fardel O : Evidence for a multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)-related transport system in cultured rat liver biliary epithelial cells. *Life Science* 64 (9) (1999), 763-774
- Cruz-Gervis R, Stecenko AA, Dworski R, Lane KB, Loyd JE, Pierson R, King G, Brigham KL: Altered prostanoid production by fibroblasts from the lungs of human subjects with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* 3 (1) (2002)
- Cybulsky AV, Goodyer PR, Cyr MD, Mc Tavish AJ: Eicosanoids enhance epidermal growth factor receptor activation and proliferation in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Fluid Elektrolyte Physiol* 262 (1992), F639-F646

7. Referenzen

- Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, Deo H, Falk R, Forastiere F, Hakama M, Heid I, Kreienbrock L, Kreuzer M, Lagarde F, Mäkeläinen I, Muirhead C, Oberaigner W, Pershagen G, Ruano-Ravino A, Ruosteenoja E, Schaffrath Rosario A, Tirmarche M, Tomasek L, Whitley E, Wichmann HE, Doll R: Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* 330 (2005), 223-229
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R: The human ATP-binding cassette [ABC] transporter superfamily. *Genome research* 11 (2001), 1156-1166
- Denk GU, Soroka CJ, Takeyama Y, Chen WS, Schuetz JD, Boyer JL: Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *Journal of Hepatology* 40 (2004), 585-591
- Derksen PWB, de Gorter DJJ, Meijer HP, Bende RJ, van Dijk M, Lokhorst HM, Bloem AC, Spaagaren M, Pals ST: The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Leukemia* 17 (2003), 764-774
- Desai S, April H, Nwaneshiudu C, Ashby B: Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Molecular Pharmacology* 58 (6) (2000), 1279-1286
- Donner MG, Warskulat U, Saha N, Häussinger D: Enhanced expression of basolateral multidrug resistance protein isoforms Mrp3 and Mrp5 in rat liver by LPS. *Biol. Chem.* 385 (2004), 331-339
- Dreuw A, Hermanns HM, Heise R, Jousen S, Rodriguez F, Marquardt I, Jugert F, Merk HF, Heinrich PC, Baron JM: Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHK and dermal fibroblasts. *J invest Dermatol* 124 (2005), 28-37
- Edukani G, Sasatomi E, Satoh T, Tokunaga O, Miyazaki K: Expression of the hepatocyte growth factor/c-Met pathway is increased at the cancer front in breast carcinoma. *Pathology International* 51 (2001), 172-178
- Eikmann T, Heinrich U, Heinzow B, Konietzka R: Gefährdungsabschätzung von Umweltschadstoffen Band 1 Kapitel D172 Cadmium und Verbindungen Erich Schmidt Verlag (1999). 1- 35
- Etzel CJ, Amos CI, Spitz MR: Risk for smoking-related cancer among relatives of lung cancer patients. *Cancer Research* 63 (2003), 8531-8535
- Ferruzi E, Franceschini R, Cazzolato G, Geroni C, Fowst C, Pastorino U, Tradati N, Tursi J, Dittadi R, Gion M: Blood glutathion as a surrogate marker of cancer tissue glutathione S-transferase activity in non-small cell lung cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck. *European Journal of cancer* 39 (2003), 1019-1029
- Filipic M, Hei TK: Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutation Research* 546 (1-2) (2004), 81-91

7. Referenzen

- Fong WF, Laung CH, Lam W, Wong NS, Cheng SH: Epidermal growth factor induces Gadd45 (growth arrest and DNA damage inducible protein) expression in A431 cells. *Biochim Biophys Acta* 26. 1517 (2) (2001): 250-256
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (7. Auflage) Kapitel 13.6: Derivate des Arachidonsäurestoffwechsels Spektrum-Verlag (1996), 337-345
- Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA: Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Seminars in Oncology* 29 (1) (2002), pp3-14
- Fujino H, West KA, Regan JW: Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *Journal of Biological Chemistry* 277 (4) (2002), 2614-2619
- Fujino H, Xu W, Regan JW: Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Biological Chemistry* 278 (14) (2003), 12151-12156
- Funk CD: Prostaglandins and leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* 294 (2001), 1871-1875
- Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, Vora H, Thomas D, Berhane K, McConnell R, Kuenzli N, Lurmann F, Rappaport E, Margolis H, Bates D, Peters J: The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *New England Journal of Medicine* 351 (11) (2004), 1057-1067
- Ghio AJ: Biological effects of Utah valley ambient air particles in humans: a review. *Journal of Aerosol Medicine* 17 (2) (2004), 157-164
- Gridelli C, Aapro M, Ardizzoni A, Balducci L, De Marinis F, Kelly K, Le Chavalier T, Manegold C, Perrone F, Rosell R, Sheperd F, De Petris L, Di Maio M, Langer C: Treatment of advanced non-small-cell lung cancer in the elderly: results of an international expert panel. *Journal of Clinical Oncology* 23 (13) (2005), 3125-3137
- Grimsrud TK, Berge SR, Haldorsen T, Andersen A: Can lung cancer risk among nickel refinery workers be explained by occupational exposures other than nickel. *Epidemiology* 16 (2005), 146-154
- Haimour A, Conseil G, Deeley RG, Cole SPC: The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Current Drug Metabolism* 5 (2004), 21-53
- Hakeda Y, Harada S, Matsumoto T, Tezuka K, Higashino K, Kodama H, Hashimoto-Goto T, Ogata, Kumegawa M: Prostaglandin F_{2α} stimulates proliferation of clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells by up-regulation of insulin-like growth factor I receptors. *Journal of Biological Chemistry* 266 (31) (1991), 21044-21050
- Hamada J, Ren J, Hosokawa M: Malignant progression of a weakly malignant rat mammary tumor cell line, ER-1, by tumor microenvironmental factors. *Med Electron Microsc*. 32 (2), (1999): 87-93

7. Referenzen

- Harada T, Ogura S, Yamazaki K, Kinoshita I, Itoh T, Isobe H, Yamashiro K, Dosaka-Akita H, Nishimura M: Predictive value of expression of P53, Bcl2 and lung resistance-related protein for response to chemotherapy in non-small cell lung cancers. *Cancer Science* 94 (4) (2003), 394-399
- Hart BA, Potts RJ, Lee CH, Shukla GS, Shukla A, Osier M, Eneman JD, Chiu JF: Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology* 133 (1999), 43-58
- Hassoun EA, Stohs SJ: Cadmium induced production of superoxid anion and nitric oxid, DNA single strand brakes and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Toxicology* 112 (1996), 219-226
- Hata AN, Breyer RM: Pharmacology and signalling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & Therapeutics* 103 (2004), 147-166
- Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K: Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* 55 (4) (1998), 487-496
- Hsia TC, Lin CC, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Relationship between chemotherapy response of small cell lung cancer and P-glycoprotein or multidrug resistance-related protein expression. *Lung* 180 (2002), 173-179
- Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao J, Zhu L, Miller P, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM: Non small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Research* 59 (1998), 1208-1216
- Huffman KE, Corey DR: Major vault protein does not play a role in chemoresistance or drug localization in a non-small cell lung cancer cell line. *Biochemistry* 44 (2005), 2253-2261
- Ikegami R, Sugimoto Y, Segi E, Katsuyama M, Karahashi H, Amano F, Maruyama T, Yamane H, Tsuchiya S, Ichikawa A: The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* 166 (2001), 4689-4696
- Ikegami Y, Tatabe S, Lin-Lee YC, Xie QW, Ishikawa T, Kuo MT: Induction of MRP1 and γ -glutamylcysteine synthetase gene expression by interleukin 1 β is mediated by nitric oxide-related signalings in human colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* 185 (2000), 293-301
- Inokuchi A, Hinoshita E, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M, Uchiyama T: Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. *Journal of Biological Chemistry* 276 (50) (2001), 46822-46829
- Jimi S, Uchiyama M, Takaki A, Suzumiya J, Hara S: Mechanisms of cell death induced by cadmium and arsenic. *Ann NY Acad Sci.* 1011 (2004), 325-331
- Juliano RL, Ling V: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica and Biophysical Acta* 455 (1976), 152-162

7. Referenzen

- Jurajuria S, Dereuddre-Bosquet N, Naissant-Storck K, Dormont D, Clayette P: Differential expression levels of MRP1, MRP4 and MRP5 in response to human immunodeficiency virus infection in human macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (5) (2004), 1889-1891
- Kam PCA, See AUL: Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 55 (2000), 442-449
- Kang SS, Li T, Xu D, Reinach PS and LU L: Inhibitory Effect of PGE₂ on EGF-Induced MAP kinase activity and rabbit corneal epithelial proliferation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41 (8), (2000), 2164-2169
- Kappos AD, Bruckmann P, Eikmann T, Englert N, Heinrich U, Höpfe P, Koch E, Krause GHM, Kreyling WG, Rauchfuss K, Romnout P, Schulz-Klemp V, Thiel WR, Wichmann HR: Health effects of particles in ambient air. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2007 (2004), 399-407
- Kawamori T, Kitamura T, Watanabe K, Uchiya N, Maruyama T, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K: Prostaglandin E receptor subtype EP1 deficiency inhibits colon cancer development. *Carcinogenesis* (2004) (prepublished Manuscript)
- Kim JJ, Shannon MW, Best D, Binns HJ, Johnson CL, Mazur LJ, Reynolds DW, Roberts JR, Weil WB, Balk SJ, Miller M, Shea KM: Ambient air pollution: health hazards to children. *Pediatrics* 114 (2004), 1699-1707
- König J, Hartel M, Nies AT, Martignoni ME, Guo J, Büchler MW, Friess H, Keppler D: Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *International Journal of Cancer* 115 (2005), 359-367
- Kool M, de Haas M, Scheffler GL, Scheper RJ, van Eijk MJT, Juijin JA, Baas F, Borst P: Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Research* 57 (1997), 3537-3547
- Kurz EU, Cole SPC, Deeley RG: Identification of DNA-protein interactions in the 5' flanking and 5'untranslated regions of the human multidrug resistance protein (MRP1) gene: evaluation of a putative antioxidant response element/AP-1 binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 285 (2001), 981-990
- Lag M, Westley S, Lerstad T, Bjornsrud C, Refsnes M, Schwarze PE: Cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells: involvement of Bax and p53, but not of oxidative stress. *Cell Biology and Toxicology*. 18 (2002), 29-42
- Largo R, Díez-Ortego I, Sanchez-Pernaute O, López-Armada MJ, Alvarez-Soria, MA, Egido J, Herrero-Beaumont G: EP₂/EP₄ signalling inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production induced by interleukin 1 β in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 63 (2004), 1197-1204
- Lechner JF, LaVeck MA: A serum free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J Tissue Cult Methods* 9 (2) (1985), 43-48

7. Referenzen

- Lee G, Piquette-Miller M: Cytokines alter the expression and activity of the multidrug resistance transporters in human hepatoma cell lines; analysis using RT-PCR and cDNA microarrays. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (11) (2003) 2152-2163
- Leggas M, Adachi M, Scheffer GL, Sun D, Wielinga P, Du G, Mercer KE, Zhuang Y, Panetta JC, Johnston B, Scheper RJ, Stewart CF, Schuetz JD: MRP4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol.* 24 (17) (2004), 7612-7621
- Lehmann T, Köhler C, Weidauer E, Taeye C, Foth H: Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology* 167 (2001), 59-72
- Lehmann T, Torky AW, Stehfest E, Hofmann S and Foth H: Expression of lung resistance related protein, LRP, and multidrug resistance related Protein MRP1, in normal human lung cells in long term culture. *Arch Toxicol.* (2005) [Epub ahead print]
- Li M, Kondo T, Zhao Q-L, Tanabe K, Arai Y, Zhou Z-C and Kasuya M: Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+} -calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry* 275 (50) (2000), 39702-39709
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17 (1) (1976), 62-70
- Littman AJ, Thornquist MD, White E, Jackson LA, Goodman GE, Vaughan TL: Prior lung disease and risk of lung cancer in a large prospective study. *Cancer Causes and Control* 15 (2004), 819-827
- Locke VL, Davey RA, Davey MW: Modulation of drug and radiation resistance in small cell lung cancer cells by paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* 14 (2003), 523-531
- Lopez E, Figueroa S, Oset-Gasque MJ, Gonzalez MP: Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *British Journal of Pharmacology* 138 (5) (2003), 901-911
- Lubin JH, Boice JD: Lung Cancer Risk From Residential Radon: Meta-analysis of eight epidemiologic studies. *Journal of the National Cancer Institute* 89 (1997), 49-57
- Maeda S, Sugiura T, Saikawa Y, Kubota T, Otani Y, Kumai K, Kitajima M: Docetaxel enhances the cytotoxicity of cisplatin to gastric cancer cells by modification of intracellular platinum metabolism. *Cancer Science* 95 (2004), 679-684
- Matteucci E, Modora S, Simone M, Disiderio MA: Hepatocyte growth factor induces apoptosis through the extrinsic pathway in hepatoma cells: favouring role of hypoxia-inducible factor-1 deficiency. *Oncogene* 22 (2003), 4062-4073
- McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N: 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. *Journal of Biological Chemistry* 274 (33) (1999), 23541-23548
- Meyer zu Schwabedissen HEU, Grube M, Heydrich B, Linnemann K, Fusch C, Kroemer HKM, Jedlitschky G: Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter

7. Referenzen

for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts. *American Journal of Pathology* 166 (1) (2005), 39-48

Minami T, Nakano H, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Ito S: Characterization of EP receptor subtypes responsible for prostaglandin E₂-induced pain responses by use of EP1 and EP3 receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology* 133 (2001), 438-444

Mine S, Fujisaki T, Kawahara C, Tabata T, Iida T, Yasuda M, Yoneda T, Tanaka Y: Hepatocyte growth factor enhances adhesion of breast cancer cells to endothelial cells in vitro through up-regulation of CD44. *Experimental Cell Research* 288 (2003), 189-197

Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A: Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Research* 59 (1999), 3317-3320

Moreno JJ: Regulation of arachidonic acid release and prostaglandin formation by cell-cell adhesive interactions in wound repair. *Pflügers Archives* 433 (1997), 351-356

Morgan SJ, Darling DC: Kultur tierischer Zellen. Spectrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, Kapitel 6: Primärkulturen (1994), 81-99

Muhle H., McClellan RO: Respirationstrakt. (Kapitel 16) in Marquardt H, Schäfer S: Lehrbuch der Toxikologie (2. Auflage). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2004) 365-382 .

Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Bilodeau M: Role of EGF receptor tyrosine kinase activity in antiapoptotic effect of EGF in mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (6) (2001), G1360-G1369

Nakayama Y, Omote K, Namiki A: Role of prostaglandin receptor EP1 in the spinal dorsal horn in carageenan-induced inflammatory pain. *Anesthesiology* 97 (2002), 1254-1262

Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Mavrommatis J, Davaris PS: c-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal β -catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 36 (2000), 313-325

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F: Prostanoid receptors: structures, properties and function. *Physiological Reviews* 79 (4) (1999), 1193-1226

Nowak D, Ochmann U, Huber RM, Diederich S: Screening des Lungenkarzinoms - aktueller Stand. *Pneumologie* 59 (2005), 178-191

O'Connor R, Heenan M, Connolly L, Larkin A, Clynes M: Increased anti-tumour efficacy of doxorubicin when combined with sulindac in a xenograft Model of an MRP-1-positive human lung cancer. *Anticancer Research* 24 (2004), 457-464

Othumpangat S, Kashon M, Joseph P: Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. *Journal of Biological Chemistry* (2005) (Manuscript in Press)

7. Referenzen

- Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Medicine* 2 (3) (2005), 225-235
- Pauk N, Kubik A, Zatloukal P, Krepela E: Lung cancer in woman. *Lung Cancer* 48 (2005), 1-9
- Paumi CM, Wright M, Townsend AJ, Morrow CS: Multidrug resistance protein (MRP)1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentone prostaglandin, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2 in MCF7 breast cancer cells. *Biochemistry* 42 (2002), 5429-5437
- Perrone F, Di Maio M, Budillon A, Normanno N: Targeted therapies and non-small cell lung cancer: methodological and conceptual challenge for clinical trials. *Current Opinions in Oncology* 17 (2005), 123-129
- Pope CA: Air pollution and health-good news and bad. *New England Journal of Medicine* 351 (11) (2004), 1132-1134
- Pozzi A, Yan X, Marcias-Perez I, Wei S, Hata AN, Breyer RM, Morrow JD, Capdevila JH: Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *Journal of Biological Chemistry* 279 (28) (2004), 29797-29804
- Pakunlu RI, Cook TJ, Minko T: Simultaneous modulation of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense by MDR1 and BCL2 targeted antisense oligonucleotides enhances the anticancer efficacy of doxorubicin. *Pharmaceutical research* 20 (3) (2003), 351-359
- Pakunlu RI, Wang Y, Tsao W, Pozharov V, Cook TJ, Minko T: Enhancement of the efficacy of chemotherapy for lung cancer by simultaneous suppression of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense: novel multicomponent delivery system. *Cancer Research* 64 (2004), 6214-6224
- Quarles LD, Haupt DM, Davidai G, Middleton JP: Prostaglandin F2 α -induced mitogenesis in MC3T3-E1 osteoblasts: role of protein kinase-C-mediated tyrosine phosphorylation. *Endocrinology* 132 (4) (1993), 1505-1513
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, Wijnhold J, Borst P. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *PNAS* 100 (16) (2003), 9244-9249
- Riedl K, Krysan K, Pold M, Dalwadi H, Heuze-Vourc'h N, Dohadwala M, Liu M, Cui X, Figlin R, Mao JT, Strieter R, Sharma S, Dubinett SM: Multifaceted roles of cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Drug Resistance Updates* 7 (2004), 169-184
- Rossel R, Lord RVN, Taron M, Reguart N: DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung cancer* 38 (2002), 217-227
- Rossel R, Taron M, Barnadas A, Scagliotti G, Sarries C, Roig B: Nucleotide excision repair pathways involved in cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Cancer Control* 10 (4) (2003), 297-305

7. Referenzen

- Runge DM, Runge D, Dorko K, Pizarov LA, Leckel K, Kostrubsky VE, Thomas D, Strom SC, Michalopoulos GK: Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes. *Journal of Hepatology* 30 (1999), 265-274 [a]
- Runge DM, Bowen WC, Katyal S, Runge D, Suski V, Michalopoulos GK: Expression of the human hepatocyte growth factor cDNA in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 257 (1999), 199-205 [b]
- Runge DM, Stock TW, Lehmann T, Taeye C, Bernauer U, Stolz DB, Hofmann S, Foth H: Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol culture. *Archives of Toxicology* 75 (6) (2001), 332-345
- Savaraj N, Wu C, Wangpaichitr M, Kuo MT, Lampidis T, Robles C, Furst AJ, Feun L: Overexpression of mutated MRP4 in cisplatin resistant small cell lung cancer cell line: Collateral sensitivity to azidothymidine. *International Journal of oncology* 23 (2003), 173-179
- Savla U, Appel HJ, Sporn PHS, Waters CM: Prostaglandin E2 regulates wound closure in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280 (2001), L421-L431
- Schwartzmann G, Pinedo HM, Leyva A.: Resistance of HL-60 promyelocytic leukemia cells to induction of differentiation and its reversal by combination treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 23 (6), (1987), 739-734
- Scotto KW: Transcriptional regulation of ABC drug transporter. *Oncogene* 22 (2003), 7496-7511
- Seeber S, Schütte J: *Therapiekonzepte Onkologie* (2. Auflage) Kapitel: Kleinzelliges Karzinom, 420-445; Kapitel Nicht-kleinzelliges Karzinom, 446-473. Springer Verlag (1995)
- Sheffield LG: Epidermal growth factor as an autocrine modulator of stress response in mammary epithelial cells. *Journal of Endocrinology* 159 (1998), 111-116
- Shih CM, Wu JS, Ko WC, Wang LF, Wei YH, Liang HF, Chen YC, Chen CT: Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by cadmium in normal human lung cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 89 (2003), 335-347
- Siewert E, Dietrich CG, Lammert F, Heinrich PC, Matern S, Gartung C, Geier A: Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response. *Biochemical and Biophysical research Communication* 322 (2004), 232-238
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1) (1985), 76-85
- Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A: Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. *Journal of Biological Chemistry* 279 (45) (2004), 46700-46705
- Stefan M, Koch A, Mancini A, Mohr A, Weidners KM, Niemann H, Tamura T: Src homology 2-containing inositol 5-phosphatase 1 binds to the multifunctional docking site of

7. Referenzen

c-Met and potentiates hepatocyte growth factor-induced branching tubulogenesis. *J Biol Chem* 276 (5) (2001):3017-3023

Stein U, Walther W, Laurencot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH: Tumor necrosis factor-alpha and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP. *Journal of the National Cancer Institute* 89 (11) (1997), 807-813

Steinbach D, Lengemann J, Voigt A, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A. response to chemotherapy and expression of the genes encoding the multidrug resistance-associated proteins MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, and SMRP in childhood acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 9 (2003), 1083-1086

Stewart DJ: Update on the role of topotecan in the treatment of non-small cell lung cancer. *The Oncologist* 9 (Suppl. 6) (2004), 43-52 (a)

Stewart DJ, Tomiak E, Shamji FM, Maziak DE, MacLeod P: Phase II study of alternating chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 44 (2004), 241-249 (b)

Stock JL, Shinjo K, Burkhardt J, Roach M, Taniguchi K, Ishikawa T, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, McNeish JD, Audoly LP: The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *Journal of Clinical Investigation* 107 (3) (2000), 325-331

Stock T: Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen und ihre toxikologische Anwendungsprüfung. Dissertation an der Med. Fakultät der Martin-Luther Universität Halle/Saale 2002

Stohs SJ, Bagchi D: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med.* 18 (1995), 321-336

Stuckler D, Singhal J, Singhal SS, Yadav S, Awasthi YC, Awasthi S: RLIP76 transports vinorelbine and mediates drug resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 65 (3) (2005), 991-998

Sullivan GF, Yang JM, Vassil A, Yang J, Bash-Bubula J, Hait WN: Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells. *Journal of Clinical Investigation* 105 (9) (2000), 1261-1267

Tatum AJ, Shapiro GG: the effects of outdoor air pollution and tobacco smoke on asthma. *Immunol Allergy Clin North Am.* 25 (1) (2005), 15-30

Takeshita A, Shinjo K, Naito K, Matsui H, Shigeno K, Nakamura S, Horii T, Maekawa M, Kitamura K, Naoe T, Ohnishi K, Ohno R: P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) are induced by arsenic trioxide (As₂O₃), but are not the main mechanism of As₂O₃-resistance in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia* 17 (2003), 648-650

Torky AR, Stehfest E, Viehweger K, Taege C, Foth H: Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture. *Toxicology* 207 (2005), 437-450

7. Referenzen

- Vineis P, Forastiere F, Hoek G, Lipsett M: Outdoor air pollution and lung cancer: recent epidemiologic evidence. *International Journal of Cancer* 111 (2004), 647-652
- Viegi G, Simoni M, Scognamiglio A, Baldacci S, Pistelli F, Carrozzi L, Annesi-Maesano I: Indoor air pollution and airway disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8 (12) (2004), 1401-1415
- Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, Ichikawa A: Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *Journal of Biological Chemistry* 268 (27) (1993), 20175-20178
- Wätjen W, Cox M, Biagioli M, Beyersmann D: Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Mediation by caspase 9-activation. *BioMetals* 15 (2002), 15-25
- Wielinga PR, van der Heijden I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J, Borst P. Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *Journal of Biological Chemistry* 278 (20) (2003), 17664-17671
- Wu W, Jaspers I, Zhang W, Graves LM, Samet JM: Role of Ras in metal-induced EGF receptor signaling and NF-kappaB activation in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282 (5) (2002), L1040-L1048 [a]
- Wu W, Graves LM, Gill GN, Parsons SJ, Samet JM: Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *Journal of Biological Chemistry* 277 (27) (2002), 24252-24257 [b]
- Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR: Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *PNAS* 98 (1) (2001), 247-252
- Xu H, Collins JF, Bai L, Kiela PR, Lynch RM, Ghishan FK: Epidermal growth factor regulation of rat NHE2 gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (2), (2001), c504-c513
- Yamaki T, Endoh K, Miyahara M, Nagamine I, Huong NTT, Sakurai H, Pokorny J, Yano T: Prostaglandin E2 activate Src signaling in lung adenocarcinoma cell via EP3. *Cancer Letters* 214 (2004), 115-120
- Yang X, Sheares KKK, Davie P, Upton PD, Taylor GW, Horsley J, Warthon J, Morrell NW: Hypoxic induction of Cox-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27 (2002), 688-696
- Yano T, Zissel G, Muller-Quernheim J, Shin SJ, Satoh H, Ichikawa T: Prostaglandin E2 reinforces the activation of Ras signal pathway in lung adenocarcinoma cells via EP3. *FEBS Letters* 518 (2002), 154-158
- Yi S, Tsao MS: Activation of hepatocyte growth factor-Met autocrine loop enhances tumorigenicity in a human lung adenocarcinoma cell line. *Neoplasia* 2 (3) (2000), 226-234
- Young LC, Campling BG, Cole SPC, Deelay RG, Gerlach JH. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1 and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clinical Cancer Research* 7 (2001), 1798-1804

7. Referenzen

Yuhki KY, Naraba H, Kojima F, Ushikubi F, Narumiya S, Oh-Ishi S: Prostaglandin receptors, EP2, EP3 and IP, mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (prepublished manuscript) (2004)

Ziemann C, Schäfer D, Rüdell G, Kahl GF, Hirsch-Ernst K: The cyclooxygenase system participates in functional Mdr1b overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Hepatology* 35 (2002), 579-588

Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung	DMEM:	<i>Dulbeccos modified Eagle Medium</i>
ABC:	<i>ATP-binding cassette</i>	DMSO:	Dimethylsulfoxid
Adenoc:	Adenokarzinom	DNA:	Desoxyribonukleinsäure
ADH:	Alkoholdehydrogenase	DTT:	Dithio-threitol
AECG:	<i>airway epithelial cells growth medium</i>	dNTP:	desoxy-Nukleotid-triphosphat
Ak.:	Antikörper	ECL:	Enhanced chemiluminescence
Akt.:	Aktivität	EGF:	<i>Epidermal growth factor</i>
ATP:	Adenosintriphosphat	EGFR:	EGF-Rezeptor
AZTME:	Azidothymidinmonophosphat	EGTA:	<i>Ethylenglycol-bis (2-aminoethyl)-N,N,N,N Tetraacetic acid</i>
BC:	Bronchialkarzinom	Elisa:	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
BCA:	Bicinchinonsäure	EP:	E-prostanoid Rezeptor
BER:	Basen-Excesions-Reparatur	ERCC1:	<i>excision-repair cross-complementing protein1</i>
BPE:	Bovine pituitary extract	ERK:	<i>extracellular signal-related Kinase</i>
BSA:	Rinderserumalbumin	EtOH:	Ethanol
Bsp, B:	Beispiel	FKS:	foetales Kälberserum
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat	FP:	F-prostanoid-Rezeptor
Casp:	Caspase	Fr:	Frau
Cd:	Cadmium	GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
cDNA:	cloning Desoxy-ribonukleinsäure	G-Protein:	GTP-Bindeprotein
CDF:	Carboxydichlorfluoreszein	GSH:	Glutathion
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat	GST:	Glutathion-S-Transferase
Colonc:	Kolonkarzinom	HBSS:	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
Cox:	Cyclooxygenase	HPLC:	<i>High pressure liquid Chromatography</i>
cPL A2:	cytosolische Phospholipase A2	HRP:	<i>horse radish peroxidase</i>
Cy 3:	Cyanin 3	IP3:	Inositol-3-Phosphat
CYP1A1:	Cytochrom P450 1A1	k. A.:	keine Angaben
DAG:	Diazylglycerol		
DEPC:	Diethylpyrocarbonat		

Anhang-Abkürzungsverzeichnis

Konz:	Konzentration	PLZ:	periphere Lungenzellen
LDH:	Lactatdehydrogenase	PMAE:	9- (2-Phosphonyl-
Li:	linker		methoxyethyl)-
LPS:	Lipopolysaccharide		Adenin
LRP:	<i>Lung resistance</i> Protein	prim.:	primär
m:	männlich	Re:	rechter
Metast:	Metastase	Rel:	relativ
MDR:	<i>Multidrug resistance protein</i>	RH:	Rundherd
MRP:	<i>Multidrug resistance</i> associated Protein	RNA:	Ribonukleinsäure
MTT:	Dimethyl-diphenyl- Tetrazoliumbromid	RT:	Raumtemperatur
MTX:	Methotrexat	RT-PCR:	Reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion
Narbenc:	Narbenkarzinom	SCLC:	kleinzelliges Karzinom
NER:	Nukleotid- Excisionsreparatur	SDS:	Natriumdodecyl-sulfat
Neuroend.		SE:	<i>Standarderror</i>
Carc:	Neurenodkrines Karzinom	sek:	sekundär
NHBEZ:	normale humane Bronchial- Epithelzellen	SiRNA:	silencer RNA
Nierenc:	Nierenkarzinom	TBS:	<i>Tris buffered Saline</i>
NR:	Nichtraucher	TGF:	<i>Transforming growth factor</i>
NSCLC:	nichtkleinzelliges Karzinom	TKI:	Tyrosinkinaseinhibitor
OA :	Oberarzt	TNF α	Tumornekrosefaktor α
OL :	Oberlappen	TNS:	<i>Trypsin Neutralisation</i> <i>Solution</i>
PAGE:	Polyacrylamid- gelelektrophorese	Transp.:	Transport
PAK:	polyaromatische Kohlen- wasserstoffe	TRD:	technische Richtkonzentration
PBS:	<i>Phosphate buffered saline</i>	Tris	Thrimethamin
PCR:	Polymerasekettenreaktion	Ul	Unterlappen
Pen/Strep:	Penicilin/Streptomycin	Ulz:	Ulzerierendes
PG:	Prostaglandin	VEGF:	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
PI3K:	Phosphatidylinositol-3- Kinase	w:	weiblich
Platten- epithelc:	Plattenepithelkarzinom	WB:	Western Blot
		WF:	Wachstumsfaktor
		Z:	Zigaretten
		Zentr.	Zentral

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidi Foth für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit am Institut für Umwelttoxikologie die Arbeit anzufertigen. Mit Ihrer freundlichen Unterstützung und wissenschaftliche Anleitung bei der Erstellung dieser Promotionsarbeit war sie mir eine große Hilfe.

Ich möchte auch den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes Herrn Dr. Stehfest und Herrn Glahn für die Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei der Klärung experimentell bedingter Probleme danken. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Torkey bei der Unterstützung in der Einzelzellfluoreszenzmessung und immunzytochemischen Färbung.

Bei den medizinisch-technischen Assistenten des Institutes Frau Grygerie, Frau Funk, Frau Hensel und Frau Röder bedanke ich mich für die tägliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor und der Zellkultivierung.

Bei Frau Regener, Frau Martin und Herrn Auffarth bedanke ich mich für Ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima am Institut.

Bei Frau Dr. Taege und dem Institut für Pathologie bedanke ich mich für die Durchführung der immunzytochemischen Färbung für die Zellcharakterisierung

Bei der Abteilung für Herz/Thoraxchirurgie besonders bei OA Dr. Hofmann bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Patientendatenanalyse.

Bei meinen Eltern Gudrun und Peter Renniecke und meinem Ehemann Winfried Rämisch bedanke ich mich für die Unterstützung im Haushalt und bei der Kinderbetreuung, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anja Rämisch, geb. Rennicke
Geburtsdatum: 07.01.1977
Geburtsort: Dresden
Familienstand: verheiratet
Kinder: Marcel Rämisch, geb. 26.10.2001
Nationalität: deutsch
Eltern: Peter Rennicke, geb. 18.04.1942
Diplom-Gesellschaftswissenschaftler, jetzt Rentner
Gudrun Rennicke, geb. Burmann, geb.04.02.1942
Technische Zeichnerin, jetzt Rentnerin

Spezielle Qualifikationen

1999 Sachkundenachweis nach Chemikalienverbotsordnung (§ 5 Abs. 2)
2002 Sachkundenachweis: Tierschutz/Versuchstierkunde
2004 Weiterbildungskurse für Fachtoxikologen der DGPT
„Fremdstoffmetabolismus/Toxikokinetik“
„Versuchstierkunde I/Biostatistik“
2005 Weiterbildungskurse für Fachtoxikologen der DGPT
„ Molekulare Zelltoxikologie“
„ Versuchstierkunde II“

Schulbildung

09/1983-08/1989 110. Polytechnische Oberschule: „Theodor Körner“, Dresden
09/1989-08/1995 Vitzthum-Gymnasium, Dresden
Abschluß: Abitur mit allgemeiner Hochschulreife

Berufsausbildung

10/1995-09/2000 Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
11/2000- wissenschaftlicher Mitarbeiter am Inst. f. Umwelttoxikologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, assoziierter
Graduiertenkollegiat: „Adaptive physiologisch-biochemische
Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“

Anja Rämisch

Publikationsliste

Veröffentlichungen in Fachartikeln

Rennicke A, Voigt W, Mueller T, Fruehauf A, Schmoll HJ, Beyer C, Dempke W.: Resistance mechanisms following cisplatin and oxaliplatin treatment of the human teratocarcinoma cell line 2102EP. *Anticancer Res.* 25(2A) (2005), 1147-1155

Weidauer E, Lehmann T, Rämisch A, Rohrdanz E, Foth H.: Response of rat alveolar type II cells and human lung tumor cells towards oxidative stress induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Toxicol Lett.* 151(1) (2004), 69-78

Kongressbeiträge/Poster

Rennicke A., Lehmann T., Müller SP., Foth H: Transporters in hepatocytes and lung cells treated with ubiquinone (CoQ10) nanodispersion and hydrogen peroxide. Naunyn *Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl.) (2001) R161 DGPT-Frühjahrstagung Mainz (2001)

Rennicke A, Voigt W, Mueller T, Fruehauf A, Schmoll HJ, Dempke W: Different Resistance Mechanisms Following Cisplatin (CDDP) and Oxaliplatin (OXA) Treatment of the Human Teratocarcinoma Cell Line 2102EP. *Proceedings of AACR* 42 (2001), 930, 92nd Annual Meeting AACR 2001 New Orleans

Rämisch A, Runge DM, Müller SP, Foth H: The Influence of HGF and EGF on human lung cells and their possible physiological. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 592, Suppl (2003), 515. DGPT-Frühjahrstagung Mainz (2003)

Rämisch A, Glahn F, Stehfest E, Foth H: The Influence of EGF on Cadmium Induced Toxicity in Human Lung Cells. *Toxicology Letters* 144, Suppl. 138 (2003), EUROTOX-Congress 2003 Florence.

Rämisch A, Stehfest S, Foth H: EGF Doesn't play a role in cadmium induced cyto-toxicity in human lung cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 119, Suppl. (2004), 473. DGPT-Frühjahrstagung Mainz (2004)

Rämisch A, Torky AW, Hofmann S, Foth H: The influence of prostaglandins F2 α and E2 on different MRP-transporters and cadmium toxicity in normal human bronchial epithelial cells *Toxicology and Applied Pharmacology* 197(2004), 344, EUROTOX-Congress 2004 Tampere.

Torky AW, Stehfest E, Raemisch A, Hofmann S, Foth H: Cyclooxygenase-Prostaglandin system is a modifying factor for MRP function. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, Suppl. 345(2004), EUROTOX-Congress 2004 Tampere.

Rämisch A, Torkey AW, Hofmann S, Foth H: Prostaglandin E2 but not prostaglandin F2 α modulate the MRP1 expression in normal human bronchial epithelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 101, Suppl. 423 (2005). DGPT-Frühjahrstagung Mainz (2004)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Daten die aus anderen Quellen stammen, sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet und in den Referenzen aufgeführt.

Halle/Saale den 07.07.2005

Anja Rämisch