

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



Untersuchung der Expression und Induzierbarkeit der Cytochrom P450 –Isoformen 2E1, 1A1 und 2B in der Rattenlunge

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

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

von Ines Alice Rachidi
geboren am 14.03.1973 in Nordhausen

Gutachter

1. Frau Prof. Dr. H. Foth
2. Frau Prof. Dr. U. Gundert-Remy (Berlin)
3. Herr Dr. J. G. Hengstler (Mainz)

19.03.2002

verteidigt am 10.07.2002

Referat und bibliographische Beschreibung

Es gilt heute als gesichert, dass die inhalative und systemische Belastung mit Inhaltsstoffen des Zigarettenrauches eine wesentliche Rolle in der pulmonalen Kanzerogenese spielt. Besondere Bedeutung kommt dabei den Nitrosaminen und den polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, wie dem Benzo(a)pyren, zu.

Es handelt sich hierbei um Kanzerogene, die ihre schädigende Wirkung erst nach Cytochrom P450-vermittelter Toxifizierung entwickeln. Das Cytochrom P450 gehört zum System der gemischt funktionalen Monooxygenasen und ist auf subzellulärer Ebene der Mikrosomenfraktion zugeordnet. Seine physiologische Funktion ist vor allem die Vermittlung der Phase I der Biotransformation sowohl für endogene als auch für exogene Substanzen. Ziel der Biotransformation ist die Überführung hydrophober in hydrophile, ausscheidbare Verbindungen. In der Phase I werden dazu an der betroffenen Substanz durch Sauerstoffinsertion funktionelle Gruppen, wie z.B. Hydroxyl-, Karboxylgruppen, generiert. Im Falle der genannten Kanzerogene können jedoch diese Reaktionen zur Toxifizierung der Fremdstoffe führen. Das Cytochrom P 450 umfasst eine Reihe verschiedener Isoformen, die sich durch unterschiedliche Substrataffinitäten und –spezifitäten sowie ein spezies-, organ- und gewebespezifisches Verteilungsmuster auszeichnen. So werden die Nitrosamine durch die CYP2E1 Isoform und das Benzo(a)pyren durch die Isoformen CYP1A1 und CYP2B metabolisiert. Ziel dieser Arbeit war es, die pulmonale Expression der Isoformen CYP2E1, 2B und 1A1 sowie ihre Veränderlichkeit am Tiermodell der Wistar-Ratte zu untersuchen. Dazu wurden in vitro Versuchsreihen an primären Alveolar Typ II-Zellkulturen sowie Ganztierversuche vorgenommen, das Modell der Isoliert Perfundierten Lunge wurde auf die Anwendbarkeit für metabolische Untersuchungen der Isoformen geprüft. Die Alveolar Typ II-Zellen sind deshalb von besonderem Interesse, da sich aus ihnen das bronchiolo-alveoläre Adenokarzinom der Lunge ableitet. Der prozentuale Anteil dieser Karzinomform an der Gesamtzahl der Lungenkrebsfälle hat seit zunehmendem Gebrauch von Filterzigaretten im Verlauf der letzten Jahre stetig zugenommen. Als ursächlich werden hierfür die Nitrosamine angesehen. Die Enzymexpressionen wurden unter Verwendung der Western- und Northern-Blot-Analytik untersucht. Für die Untersuchung des CYP2E1 in der Alveolar Typ II-Zellkultur wurde das Modell des Bioassays mittels Chlorzoxazonhydroxylierung erstmals an einer Primärzellkultur angewandt.

Im Rahmen der Induktionsversuche ließ sich in den Alveolar Typ II-Zellen durch Ciprofibrat und Permethrin keine Induktion des CYP2B nachweisen. Für beide Substanzen war aus der Literatur ein induktiver Effekt auf die CYP2B Expression in Rattenhepatozyten bekannt. Die CYP2E1 Proteinexpression war nach in vitro Behandlung mit Ciprofibrat der Alveolar Typ II-Zellen herabgesetzt, auch hier war aus der Literatur eine Induktion in Rattenhepatozyten beschrieben worden. Die Induktionsversuche wurden zu Vergleichszwecken parallel auch an primären Rattenhepatozyten vorgenommen, dabei fanden sich jeweils erhöhte CYP2B und 2E1 Proteinexpressionen. Im Ganztierversuch wurden Wistar-Ratten in therapeutischen Dosen mit Ciprofibrat vorbehandelt und im Anschluss Lungen- und Lebergewebe hinsichtlich der CYP2E1 Proteinexpression untersucht, diese war im Lungengewebe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erniedrigt und im Lebergewebe erhöht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erfordern die Überprüfung der gewonnenen Daten im humanen Gewebe. Lässt sich eine Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus aufzeigen, könnte hier die Basis einer medikamentösen Prophylaxe für durch Lungenkrebs besonders gefährdete Populationen liegen.

Rachidi, Ines Alice: Untersuchung der Expression und Induzierbarkeit der Cytochrom P450 Isoformen 2E1, 1A1 und 2B in der Rattenlunge.
Halle, Univ., Med. Fak. , Diss., 77 Seiten, 2002

Abkürzungsverzeichnis

A II Zellen	Alveolar Typ II-Zellen
APUD	amine and precursor uptake and decarboxylation
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
CFP	constant flow perfusion
CPP	constant pressure perfusion
CYP	Cytochrom P 450
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECL	enhanced chemoluminescence
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IPL	Isoliert Perfundierte Lunge
M	molar
min	Minute
MOPS	3(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NPV	negative pressure ventilation
NSCLC	non-small cell lung carcinom
PBS	phosphate buffered saline

PPV	positive pressure ventilation
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	saline dodecylsulfate
SCLC	small cell lung carcinom
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Lunge aus toxikologischer Sicht	1
1.2.	Das Cytochrom P 450	5
1.3.	Das Cytochrom P 450 2E1 (CYP2E1)	8
1.4.	Die Cytochrom P 450 Isoformen 2B und 1A1 (CYP2B und CYP1A1)	11
2.	Material und Methoden	14
2.1.	Versuchstiere	14
2.2.	Chemikalien und Biochemikalien	14
2.2.1.	Reagenzien für Organpräparation und Zellkultur	14
2.2.2.	Zellfärbungsreagenzien	15
2.2.3.	Reagenzien für die Western Blot Analytik	15
2.2.4.	Chemikalien für die Northern Blot Analytik	16
2.2.5.	Chemikalien für 2E1-Bioessay	16
2.2.6.	Chemikalien für Induktionsversuche	16
2.3.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
2.4.	Methoden	19
2.4.1.	Bereitung des Perfusionsmediums	19
2.4.2.	Präparation der Rattenlunge	20
2.4.3.	Präparation der Rattenleber	20
2.4.4.	Die Isoliert Perfundierte Lunge	21
2.4.5.	Isolierung von Alveolar Typ II-Zellen	22
2.4.6.	Differentielle Adhärenz	26
2.4.7.	Extrazelluläre Matrices	26
2.4.8.	Kultivierung von Alveolar Typ II-Zellen	27
2.4.9.	Zellfärbung	27
2.4.10.	Gewinnung der Mikrosomenfraktionen	28
2.4.11.	RNA-Isolierung	29

2.4.12.	Agarosegelelektrophorese der isolierten RNA	30
2.4.13.	RNA-Transfer auf Nylonmembranen	31
2.4.14.	Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot	32
2.4.15.	Proteinisolierung	34
2.4.16.	Proteinbestimmung	34
2.4.17.	Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
2.4.18.	Proteinnachweis im Western Blot	37
2.4.19.	Semitrocken-Transfer	37
2.4.20.	Immunchemischer Nachweis von Cytochrom P 450-Proteinen	39
3.	Ergebnisse	40
3.1.	Alveolar Typ II-Zellen in Primärkultur	40
3.2.	Cytochrom P 450 Expression im Lungengewebe	42
3.3.	CYP2B1 Induktion	44
3.4.	Exprimierung des CYP2E1 bei Alveolar Typ II-Zellen der Ratte in Primärkultur	48
3.5	Induzierbarkeit des CYP2E1 in der Rattenlunge versus Rattenleber	52
3.6	Beeinflussung der CYP2E1 Expression in den Alveolar Typ II-Zellen durch in vitro Behandlung mit Ciprofibrat	54
4.	Diskussion	56
4.1.	Alveolar Typ II-Primärzellkultur	56
4.2.	Die Isoliert Perfundierte Lunge (IPL)	57
4.3.	in vivo Induktionsversuche	58
4.4.	Induzierbarkeit des CYP2B1 in Alveolar Typ II-Primärzellkultur	60
4.5.	CYP2E1 Expression in der Rattenlunge und in Alveolar Typ II-Primärzellkultur	61
5.	Zusammenfassung	64
6.	Literaturverzeichnis	66
7.	Thesen	76

- A. 1.1.1.1 Anhang**
- A.1. Lebenslauf
- A.2. Selbstständigkeitserklärung
- A.3. Erklärung über frühere Promotionsversuche
- A.4. Danksagung

1. EINLEITUNG

1.1. Die Lunge aus toxikologischer Sicht

Nach wie vor ist der Lungenkrebs der häufigste Krebs des Mannes. Auch die Inzidenz bei Frauen hat im Laufe der letzten Jahrzehnte dramatisch zugenommen. Das Rauchen gilt hierfür als der wichtigste Risikofaktor. Dies ist anhand klinischer Studien wiederholt gezeigt worden. So postulieren Simonato et al., dass 90% der Lungenkrebserkrankungen des Mannes und 60% der Erkrankungsfälle der Frau auf das Rauchen zurückzuführen sind. (59, 85) Unter Einbeziehung der durch das Rauchen verursachten nicht malignen Erkrankungen, sind in Deutschland jährlich 110.000 Todesfälle im kausalen Zusammenhang mit dem Rauchen zu sehen. (67) 1998 rauchten in Deutschland 37% der Männer und 28% der Frauen. (40) Es besteht kein relevanter Unterschied im Krebsrisiko für Zigarettenraucher versus Zigarren-, Zigarillo- oder Pfeifenraucher. (6, 38) Dabei werden in Deutschland ohnehin zu 97% Zigaretten geraucht. (81)

Als ätiologisch wichtigste Faktoren in der mit dem Rauchen im Zusammenhang stehenden Kanzerogenese werden die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe und Nitraosamine im Tabakrauch angesehen. Offensichtlich erfolgt die Schädigung der Lunge durch die Rauchinhaltsstoffe nicht unmittelbar bei der Inhalation, sondern es bedarf einer metabolischen Aktivierung der Verbindungen, die zunächst im Blutkreislauf zirkulieren und vom Blut aus durch die Lunge aufgenommen werden. Ort der metabolischen Aktivierung ist dabei die Lunge selbst. (18, 29, 90, 92)

Ein weiterer relevanter Risikofaktor neben dem Rauchen ist die berufliche Exposition gegenüber die Lungen schädigenden Substanzen und Stoffgruppen. (85) Hierzu seien die laut Berufskrankheitenverordnung der Bundesrepublik Deutschland (Stand vom 18.12.1992) als Berufserkrankung anerkannten malignen Neoplasien der Atemwege und der Lunge nach chronischer beruflicher Exposition gegenüber Kokereigasen (Nr. 4110) bzw. halogenierten Kohlenwasserstoffen, wie Dichlordimethylether oder Dichlordiethylsulfid (Stickstofflost), die in der Industrie bei der Herstellung von Ionenaustauscherharzen anfallen (Nr. 1302), erwähnt. (82) Des weiteren gerät die Belastung unserer Umwelt mit zivilisatorisch bedingten Schadstoffen immer stärker in Verdacht, für die steigende Lungenkrebsinzidenz eine tragende Rolle zu spielen.

Die Lunge ist ein Organ, das den Säugern die Atmung und damit das Leben an Land ermöglicht. Aufgrund ihrer Funktion hat sie eine besondere Position im Kreislauf inne. Sie nimmt das gesamte Auswurfvolumen des rechten Ventrikels auf. Sie ist damit das am

stärksten durchblutete Organ des Organismus neben dem Herzen und hat Kontakt zu allen im venösen Blut enthaltenen Substanzen, endogenen wie auch exogenen. Über die eingeatmete Luft ist die Lunge der direkten Einwirkung verschiedener potentiell gefährlicher meist anthropogener Substanzen ausgesetzt. Dazu zählen unter anderem Mineralstäube, Metalloxide und Gase, wie das Ozon oder das Phosgen. Eine Schädigung der Lunge kann somit sowohl durch inhalativ als auch durch systemisch verabreichte Verbindungen erfolgen. Aufgrund ihrer metabolischen Kapazität erfüllt sie neben der respiratorischen auch eine Reihe sogenannter nichtrespiratorischer Funktionen. Für diese ist ihre besondere Position im Kreislauf von großer Bedeutung.

Die Säugerlunge ist ein Organ, das sich durch eine ausgeprägte Kompartimentierung auszeichnet. Sie ist aus sehr heterogenen Zellpopulationen aufgebaut.

Dazu zählen immunkompetente Zellen, die einerseits im lymphatischen Gewebe verteilt auf den gesamten Respirationstrakt und andererseits im Lumen der Atemwege selbst, wie beispielsweise Alveolarmakrophagen oder Granulozyten, zu finden sind.

Das Endothel der pulmonalen Blutgefäße besitzt auf luminaler Seite unterschiedlich große Zellausläufer, die zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche mit dem Blutplasma führen. Dies ist wichtig für den Gasaustausch. Für den menschlichen Organismus schätzt man die Gesamtfläche des Endothels auf etwa 70m². (29) Die Aufnahme von im Blut zirkulierenden Verbindungen in das Lungengewebe wird durch das Endothel gesteuert. Diese Aufnahme kann insbesondere für lipophile Substanzen wie Fentanyl oder Verapamil passiv erfolgen. (74, 75, 76) Für einige endogene Verbindungen existieren aber auch spezifische Transporter, die zur aktiven Aufnahme aus dem Blut führen, so für die Prostaglandine PGE 1 und PGF 2 α . Die absorbierten Stoffe werden teilweise in der Lunge akkumuliert, zum Teil aber auch durch das Lungengewebe metabolisiert. (27, 29)

Der Bronchialbaum der Lunge trägt auf luminaler Seite ein Epithel, das sich aus mindestens acht verschiedenen Zelltypen zusammensetzt. Den größten Teil machen dabei die zilientragenden Epithelzellen aus, die für den Transport des Bronchialschleims mit allen darin enthaltenen Substanzen aus der Lunge sorgen. Im ziliären Epithel verstreut finden sich die sogenannten Becherzellen, Clara-Zellen und seröse Zellen, die alle neben den submukös gelegenen Drüsen an der Produktion des Bronchialschleims beteiligt sind, des weiteren die Basalzellen, neuroendokrine Zellen des APUD-Systems (amine and precursor uptake and decarboxylation) und andere. Die Clara-Zellen, die sich vor allem im distalen Abschnitt des Bronchialbaumes finden, zeichnen sich morphologisch durch ein besonders ausgeprägtes, apikal gelegenes, glattes endotheliales Retikulum sowie zahlreiche elektronendichte ovale

Granula aus. (10, 37, 53, 68, 69) Bei systemischer Gabe des Wirkstoffes 4-Ipomeanol wurde eine spezifische Schädigung der Clara-Zellen beschrieben. (8, 86) Außerdem werden sie zu den Progenitorzellen in der chemisch induzierten Tumorgenese gezählt. (29)

Zur epithelialen Auskleidung der Alveolen tragen vor allem die sogenannten Alveolar-Typ I Zellen bei. Es handelt sich um Plattenepithelzellen. Sie bedecken die Oberfläche der Alveolen zu 95%, obwohl sie absolut lediglich 4-5% der Zellen in den tiefen Lungenabschnitten stellen, ihr Zytosol ist Teil der Diffusionsstrecke beim Gasaustausch.

Die Alveolar Typ II-Zellen hingegen, die nur 5% der alveolären Oberfläche bedecken, stellen 10-12% der Zellen in diesem Abschnitt der Lunge. (9, 28) Es handelt sich dabei um kleine kuboidale Zellen mit einem organellenreichen Zytoplasma. Die Zellen zeigen in situ und in vitro eine apikal-basale Ausrichtung. Apikal gelegene, membrangebundene Natriumkanäle befähigen die Alveolar Typ II-Zellen zur aktiven Natriumaufnahme aus den Alveolen. (62) Die transepitheliale Bewegung von Natrium aus den Alveolen spielt eine große Rolle in der Homöostase der Flüssigkeitsverteilung im Gewebe und in der Verhinderung eines alveolären Ödems. Des Weiteren sind die Alveolar Typ II-Zellen in der Lage, vorzugsweise kleine Partikel aus dem Alveolarraum aktiv aufzunehmen. So konnte in vitro eine Aufnahme von inerten Latex-Partikeln einer Größe von 15 nm gezeigt werden. (33)

Die Alveolar Typ II-Zellen haben Stammzellfunktion und können bei Verlust der Alveolar Typ I-Zellen diese durch Änderung ihrer zellulären Morphologie ersetzen. (28) Ein besonderes Merkmal der Alveolar Typ II-Zellen sind die sogenannten Lamellar-Körperchen, die die Hauptbestandteile des Surfactant enthalten. Dabei handelt es sich um ein Stoffgemisch, das die Oberflächenspannung der Alveolen herabsetzt und damit deren freie Entfaltung bei der Atmung ermöglicht und der Entwicklung einer Atelektase entgegenwirkt. Das Surfactant besteht zu 90% aus Lipiden und zu etwa 10% aus Proteinen. Der größte Teil der Fette sind Phospholipide, insbesondere Lecithin. Der Proteinanteil ähnelt in der Zusammensetzung den Serumproteinen, enthält aber zusätzlich vier spezifische Surfactant-Proteine, SP-A, SP-B, SP-C und SP-D. (77, 78) Eine weitere Besonderheit der Alveolar Typ II-Zellen ist ihre hohe metabolische Kompetenz. Zeichen hierfür sind die zahlreich vorhandenen Mitochondrien, freien Ribosomen, das ausgeprägte endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat. (3, 15, 20) In vitro konnte für Alveolar Typ II-Zellen eine hohe Aktivität solcher Enzyme, wie beispielsweise der Aryl-Hydrokarbon-Hydroxylase, der Epoxid-Hydrolase oder der Gluthathione-S-Epoxid-Transferase nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wird ihnen neben den Clara-Zellen eine wichtige Rolle im Fremdstoffwechsel der Lunge zugeschrieben. (21, 22, 23)

In diesem Zusammenhang ist auch die direkte Schädigung der Alveolar Typ II-Zellen bei Exposition gegenüber Silikat-Stäuben, Ozon, Stickstoffdioxid oder Paraquat zu sehen. (51) Paraquat, ein Herbizid mit einem hohem Redoxpotential, wird beispielsweise sowohl bei inhalativer als auch systemischer Applikation aktiv durch Alveolar Typ II-Zellen aufgenommen und intrazellulär durch zyklische Oxidation-Reduktionsreaktionen mit molekularem Sauerstoff zu einem anionischem Superoxid und anderen reaktiven Sauerstoff-Spezies überführt. Dies kann zu einer disseminierten selektiven Alveolar Typ II-Zellnekrose führen. (11, 29, 70, 87, 88) Eine chronische Silikatstaubexposition kann zum Krankheitsbild der sogenannten Silikose führen, für die eine Alveolar Typ II-Zellhyperplasie typisch ist. (51, 54) Die Fähigkeit der metabolischen Aktivierung von Fremdstoffen macht die Alveolar Typ II-Zellen auch zum Ort der Schädigung durch die generierten reaktiven Verbindungen.

Resümierend hängt also das Verständnis der sogenannten nichtrespiratorischen Funktionen des Lungengewebes entscheidend von der Kenntnis der metabolischen Kompetenzen der einzelnen pulmonalen, morphologisch sehr heterogenen Zellpopulationen ab. Einen offensichtlich wichtigen Beitrag zur metabolischen Aktivität der Lunge leisten die Alveolar Typ II-Zellen. Eine hohe metabolische Kompetenz führt jedoch zu einer besonderen Vulnerabilität der Zellen gegenüber schädigenden Einflüssen durch Fremdstoffe beziehungsweise durch ihre toxischen Metabolite.

Wesentlich für Untersuchungen zur Pathogenese des Lungenkarzinoms ist, dass es sich hierbei um eine histopathologisch heterogenes Krankheitsbild handelt. Die verschiedenen Karzinomformen leiten sich dabei aus unterschiedlichen pulmonalen Zellpopulationen ab. Histologisch werden zwei Hauptgruppen unterschieden, das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC – small cell lung carcinoma), das sich aus den Zellen des bronchialen APUD-Systems ableitet und die sogenannten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC - non-small cell lung carcinoma), das in drei verschiedene Unterformen unterteilt wird:

- 1.) das Adenokarzinom, das sich in eine bronchogene und bronchioloalveoläre Form unterteilen lässt. Dabei leitet sich ersteres vom schleimbildenden Epithel der Bronchien und das zweite von den Clara-Zellen oder den Alveolar Typ II-Zellen ab. Insgesamt stellen die Adenokarzinome die dritthäufigste Lungenkrebsform dar und sind der häufigste Lungenkrebs der rauchenden Frauen. Mit zunehmendem Gebrauch von Zigarettenfiltern wurde eine relative Zunahme des Adenokarzinoms beobachtet.
- 2.) das Plattenepithelkarzinom, das sich aus metaplastischen Reservezellen der Bronchialschleimhaut ableitet, ist meist zentral in der Lunge lokalisiert

3.) das großzellige Bronchialkarzinom, das eine Mischform stark entdifferenzierter Plattenepithel- und Adenokarzinome darstellt. (52,72)

90% aller Lungenkrebsfälle können dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom zugeordnet werden. (56) In einer Metaanalyse aus 48 Studien im Zeitraum zwischen 1970 bis 1999 ließ sich zeigen, dass alle histologischen Formen des Lungenkarzinoms statistisch signifikant mit dem Rauchen assoziiert sind. (43)

1.2. Das Cytochrom P 450

1958 beschrieben Klingenberg und Garfinkle ein Pigment, das nach Bindung an Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm besitzt. Dieses Pigment, das ein Hämprotein ist, wurde später durch Omura und Sato als das Cytochrom P 450 bezeichnet. Gemeinsam mit der NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase hat es eine Schlüsselrolle im System der gemischt funktionalen Monooxygenasen. Es ist auf zellulärer Ebene der Mikrosomenfraktion zugeordnet, ausgenommen hiervon sind zwei mitochondriale Formen des Cytochroms P 450, die der Steroidsynthese der Nebenniere dienen. (32,63)

Die Existenz des Cytochrom P 450 Systems ist sowohl für Vertebraten, Insekten, Pflanzen, Bakterien als auch für Hefen belegt. (61) Es gibt artspezifische Formen aber auch sogenannte orthologe Formen, d.h. Formen unterschiedlicher Spezies, die sich in ihrem Genom und ihrer Funktion sehr stark ähneln. Es existieren in verschiedenen Spezies unterschiedliche Cytochrom P 450 Isoformen nebeneinander, die sich bezüglich ihrer Substratspezifität und -affinität unterscheiden. Auch die Stereoisomerie eines Substrats kann die Affinität zu einer Cytochrom P 450 Isoform bestimmen, so werden beim Menschen das R- und das S- Isomer des Warfarins vom Cytochrom P 450 1A2 bzw. 2C9 verstoffwechselt. (1) Genetisch betrachtet zeigt das Cytochrom P 450 im Verlauf der Evolution eine Instabilität, die der der Immunglobuline sehr nahe kommt, dies wird aus den sich ändernden metabolischen Anforderungen an die sich entwickelnden Arten abgeleitet. (32)

Bisher sind 481 verschiedene Cytochrom P 450 Gene und 22 Pseudogene bekannt. Diese werden in 74 verschiedene Genfamilien unterteilt, von denen 14 bei Säugetieren nachgewiesen werden konnten. Diese 14 Genfamilien bestehen aus 26 Mammalia-Subfamilien. Es wird inzwischen eine einheitliche Nomenklatur für die einzelnen Gene benutzt, die auf dem von Nebert und Nelson entwickelten System basiert. (6) Die Genfamilie wird mit einer arabischen Ziffer und die Subfamilie nachgestellt mit einem Buchstaben (für das Gen selbst klein geschrieben, für das zugehörige Genprodukt groß geschrieben) festgelegt. Eine sich anschließende weitere arabische Ziffer bezeichnet das spezielle Gen in

der Subfamilie. Für die Isoformen der Maus und von Drosophila wird vor diese Bezeichnung die Abkürzung „Cyp“ für die Isoformen aller anderen Spezies die Abkürzung „CYP“ vorangestellt. (61)

Das Cytochrom P 450 Enzymsystem spielt eine wichtige Rolle sowohl im Fremdstoffwechsel als auch im Metabolismus endogener Substanzen, neben einer weniger ausgeprägten Funktion als anaboles Enzym in der Steroidbiosynthese. Zu den durch das Cytochrom P 450 System verstoffwechselten endogenen Stoffe zählen verschiedene Fettsäuren, Prostaglandine, Steroide und Ketone, zu den Fremdstoffen Medikamente wie Nifedipin, Mephenytoin, Codein, Midazolam, Cyclosporin und Warfarin. (1, 32)

Das Cytochrom P 450 Enzymsystem katalysiert überwiegend Reaktionen, die zur Insertion eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff in die exogenen oder endogenen hydrophoben Verbindungen führen. Dabei handelt es sich je nach Substanz um eine oxidative Dehalogenierung, N-Hydroxylierung und N-Oxidation, oxidative Desaminierung, S-, N- oder O-Dealkylierung, aliphatische oder aromatische Hydroxylierung. (32) Diese Reaktionen dienen im Allgemeinen dazu, aus den hydrophoben Ausgangsverbindungen über weitere Reaktionsschritte hydrophile und damit über Galle und Urin ausscheidbare Substanzen zu erzeugen. Diesen Prozess der Umwandlung hydrophober in hydrophile Verbindungen, der der Detoxifizierung dient, bezeichnet man als Biotransformation. Sie wird in zwei Phasen unterteilt. In der ersten Phase, zu der die oben benannten Cytochrom P 450 vermittelten Reaktionen zählen, werden zunächst funktionelle Gruppen wie -OH, -SH, -NH und -COOH an der jeweiligen zu metabolisierenden hydrophoben Verbindung generiert. In der sich anschließenden zweiten Phase der Biotransformation können diese funktionellen Gruppen zur Konjugation durch UDP-Glucuronyl-, Glutathion-S-, N-Acetyl- und Sulfotransferasen sowie anderer Enzyme genutzt werden und letztlich hydrophile Verbindungen entstehen. (4)

Ausnahmsweise kann die der Entgiftung dienende Biotransformation jedoch auch zur Toxifizierung von Fremdstoffen im Sinne einer Gentoxizität führen. Dies betrifft im Allgemeinen die Reaktionen der ersten Phase der Biotransformation. So können vermittelt durch das Cytochrom P 450 System aus inerten Xenobiotika toxische Metabolite generiert werden. Xenobiotika mit einer solchen potentiellen Toxizität nennt man Karzinogene. Dazu zählen unter anderem polyzyklische Aromate, Nitrosamine, Hydrazine und Arylamine. Ihre Metabolite sind entweder selbst gentoxisch wirksam, sogenannte ultimate Karzinogene, oder aber es handelt sich um instabile Zwischenstufen, sogenannte proximale Karzinogene, die spontan in ultimate Karzinogene zerfallen. Man unterscheidet dabei zwischen gentoxischen Karzinogenen, die direkt zu einer Schädigung der DNA führen und nichtgentoxischen

Karzinogenen oder auch epigenetische Faktoren. Diese stören die Zell-zu-Zell-Interaktionen, damit kann es zu einer Autonomie der betroffenen Zellen kommen. Bei den Mutagenen handelt es sich um elektrophile Verbindungen, die an die nukleophilen Regionen der DNA, RNA aber auch anderer zytoplasmatischer Makromoleküle binden. Folge dieser Bindung kann eine Störung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen sein, in deren Folge es zu Fehlpaarungen und damit zur Mutation kommen kann. (73) Tabelle 1 soll einen kurzen Überblick über einige Karzinogene geben, die durch das Cytochrom P 450 System vermittelt in ihre toxischen Metabolite überführt werden.

Das Verteilungsmuster der Cytochrom-Formen ist sowohl spezies- als auch organabhängig. Dabei gibt es Unterformen, die konstitutiv zum Enzymspektrum des jeweiligen Organs gehören und andere, die sich reaktiv auf Umwelteinflüsse in ihrer Expression verändern. (12) Solche Umwelteinflüsse umfassen physiologische Bedingungen, wie hormonelle Einflüsse, Nahrungszusammensetzung und Ernährungszustand, aber auch induzierend wirksame anthropogene Substanzen. (46) Die Veränderlichkeit eines Organsystems in seinem Cytochrom P 450 Muster determiniert somit seine Empfindlichkeit gegenüber der genotoxischen Potenz der einzelnen Karzinogene. So konnte in vitro an Hepatozyten, die aus mit Aceton und Ethanol vorbehandelten Mäusen isoliert worden waren, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber einer Inkubation mit Dichlorethylen als in der unbehandelten Kontrolle gezeigt werden. (41) Dies wird auf eine Induktion der mikrosomalen CYP2E1 Expression zurückgeführt. (50)

Die verschiedenen Organsysteme können bei Verabreichung eines potentiellen Induktors ihr Cytochrom P 450 Muster ganz unterschiedlich verändern. So beschreiben zum Beispiel Paolini et al. bei intraperitonealer Gabe des Pestizids Methylthiofanat an Ratten für die Leber eine ausgeprägte CYP2B1 Induktion sowie eine diskrete CYP-1A2-Induktion, für die Niere jedoch eine starke CYP1A1 und leichte CYP2E1 Induktion und eine CYP2B1 Reduktion, für die Lunge schließlich eine ausgeprägte CYP 3A Induktion und eine leichte CYP2B1 Reduktion. (64)

Die Empfindlichkeit eines Gewebes oder Zelltypes gegenüber Kanzerogenen wird jedoch nicht ausschließlich durch die Enzyme bestimmt, die zur Generierung der gen- oder zytotoxischen Metabolite führen, sondern auch durch die katalytische Potenz der sich anschließenden Weiterverstoffwechslung der reaktiven Metabolite zu hydrophilen und damit über Galle und Urin ausscheidbaren Verbindungen. Die vermittelte Toxizität ist somit eine Frage der Balance zwischen der ersten und der zweiten Phase der Biotransformation.

Tabelle 1: Auswahl zur Beteiligung des Cytochrom P 450 Enzymsystem an der Aktivierung von Karzinogenen

<i>Stoffgruppe/ Karzinogen</i>	<i>Vorkommen d. Karzinogens</i>	<i>beteiligte CYP-Form</i>	<i>Initiiertes Karzinom</i>
Aromaten - Benzol	Rohöl, Benzin, Farben, Lösungsmittel u.a.	2E1	Leukämien (2, 16)
Polyzykl. Aromaten - Benzo(a)pyren	Russ, Zigarettenrauch, Autoabgase u.a.	1A1	Hautkrebs, Lungenkrebs (29, 73)
FCKW - Vinylchlorid	PVC-Herstellung	2E1	Leber-Angiosarkom, Glioblastome (34, 73)
Nitrosamine - NNK	Zigarettenrauch	2E1	Neoplasien d. Leber, Pankreas, Nasenhöhle u. Lunge (29)
Aromat. Amine - Anilin	Farben	2E1	Blasenkarzinom (35, 73)
Mykotoxine - Aflatoxin	Schimmelpilz z.B. bei Getreidelagerung	3A4 2B1	Leberzell-Karzinom (34, 73)

1.3. Das Cytochrom P 450 2E1 (CYP2E1)

Bei dem Cytochrom P 450 der Familie 2E handelt es sich um 51.000 - 52.000 kDa schwere Hämproteine. (93) Für Ratte und Mensch ist jeweils ein Gen der Familie, das CYP2E1, bekannt. Die Expression des CYP2E1 ist unter anderem für die Ratte in Leber-, Niere- und Lungengewebe sowie im nasalen olfaktorischen Epithel, für den Menschen in Leber-, Plazenta-, Lungen-, Haut- und Nervengewebe sowie im Darm, für Hamster im Lungengewebe und für Mäuse in Leber- und in Lungengewebe untersucht und nachgewiesen. (7, 24, 26, 49) Die Expression des CYP2E1 ist in den einzelnen Geweben unterschiedlich ausgeprägt, so ist die relative Verteilung im Rattengewebe im Verhältnis Leber zu Niere zu Lunge wie 1 zu 0,1 zu 0,02, für humanes Gewebe ist das Expressionsverhältnis mit 1 zu 0,3 zu 0,2 für Leber zu Lunge zu Plazenta beschrieben. (7, 31) Dies macht die einzelnen Gewebe unterschiedlich empfindlich für die toxische Wirkung bestimmter CYP2E1 Substrate.

Die Bedeutung des CYP2E1 liegt aus toxikologischer Sicht in seinem Substratspektrum, das neben Chemikalien wie Ethanol, Styren, Vinylchlorid, Tertachlorkohlenwasserstoff,

Acetaminophen eine Reihe von Kanzerogenen umfasst, die durch das Cytochrom einer Bioaktivierung zugeführt werden können. (7, 31) Hierzu sei die Verstoffwechslung des Benzols, das im Rohöl und im Benzin enthalten ist und weite Verwendung in der Erzeugung von Gummi, Schmiermitteln, Farben, Lösungsmitteln und Pestiziden findet, des Dichlorethylens, das zur Herstellung von Plastik verwandt wird sowie von Alkylnitrosaminen aus dem Zigarettenrauch beispielhaft genannt. (16, 26, 31) Tabelle 2 zeigt eine Auswahl von Fremdstoffen, an deren Metabolismus CYP2E1 beteiligt ist.

Die Rolle des CYP2E1 in der Aktivierung von Karzinogenen macht eine genaue Untersuchung seines Expressionsmusters und dessen Beeinflussbarkeit durch die Umwelt zum Verständnis der Kanzerogenese verschiedener Organe notwendig. Es wurde eine Vielzahl von Chemikalien beschrieben, die zu einer Induktion des CYP2E1 führen und damit als Kofaktoren in der Kanzerogenese fungieren können.

Tabelle 2: Auswahl beschriebener CYP2E1 Substrate

<i>Karzinogene</i>	<i>Pharmaka</i>	<i>andere Fremdstoffe</i>
Benzol	Enfluran	Ethanol
Styren	Halothan	Glycerol
Acrylonitril	Acetaminophen	Butanol
Vinylcarbammat,-chlorid,-bromid	Chlorzoxazon	Propanol
Chloroform		Phenol
Carbontetrachlorid		Aceton
Ethylcarbammat		Acetol
Di- und Trichlorethylen		
N-Nitrosodimethylamin,-diethylamin		
4-Methylnitrosamino-1-3-pyridyl-butanon (NNK)		

(34, 45)

Das CYP2E1 zeigt eine spezie- und gewebeabhängige Induzierbarkeit, die auf drei unterschiedlichen Ebenen stattfinden kann

- a) durch Steigerung der Transkription,
- b) durch Steigerung der Translation und
- c) durch posttranslationale Proteinstabilisierung.

So konnte für den Menschen und die Ratte gezeigt werden, dass pränatal in Lunge, Leber und Niere keine CYP2E1 Expression nachweisbar ist, es jedoch postnatal durch Demethylierung von CpG-Regionen am 5' Ende im CYP2E1-Gen zur Aktivierung der Transkription kommt. (39) Bei Ratten, die durch Streptozotocin oder durch Alloxan in eine diabetische Stoffwechsellaage gebracht wurden oder einer Nahrungsrestriktion ausgesetzt waren, konnten die mRNA-Niveaus im Lebergewebe angehoben werden. Man postulierte eine RNA-

Stabilisierung durch Ketonkörper. (32) Zangar et al. beschreiben einen mRNA-Anstieg unter in vitro Induktion mit dem Derivat der Fibratsäure, dem Ciprofibrat, für Rattenhepatozyten. Dabei kam es gleichzeitig auch zu einer Induzierung der CYP2B1 Transkription. Es handelt sich bei dem Ciprofibrat um ein Medikament, das bei Dyslipidämien Anwendung findet. (94) Des Weiteren wurden verschiedene Xenobiotika beschrieben, die in vivo und in vitro zur Elevation des Proteins im Sinne posttranslationaler Mechanismen führten. Tabelle 3 fasst eine Auswahl in der Literatur beschriebener Induktionsversuche und die jeweils zugrundeliegende Wirkebene des Induktors zusammen. Beim Menschen wurden erhöhte CYP2E1 Expressionen für Diabetiker, Alkoholiker sowie Patienten unter Isoniazid-Therapie beschrieben. (7)

Es wird deutlich, dass einerseits die Expression des CYP2E1 durch Einwirkung alltäglich vorkommender Umwelttoxine im Sinne einer Induktion verändert werden kann und dass andererseits diese Induktionen auf unterschiedlichen Ebenen in der Genexpression stattfinden. Die Induktion ist dabei nicht nur speziesspezifisch, sondern auch gewebespezifisch. Dies legt unterschiedliche organgebundene zelluläre Kontrollmechanismen der Expression nahe. Deren Untersuchung ist von großem Interesse, da sie die Empfindlichkeit des jeweiligen Gewebes gegenüber der kanzerogenen Potenz eines Fremdstoffes beeinflussen. Es können kausale Zusammenhänge für die spezifische Schädigung einzelner Organsysteme abgeleitet werden.

Aufgrund der verschiedenen möglichen Induktionsebenen ist die Bestimmung der mRNA, wie beispielsweise durch die Northern Blot Technik, nicht ausreichend zur Erfassung von Induktionsmechanismen des CYP2E1. Die Bestimmung des Enzyms durch Immunoblotanalytik wie den Western Blot ist in ihrer Aussagefähigkeit ebenfalls eingeschränkt, da sie nicht zwischen Holo- und Apoenzym unterscheiden kann. Eine objektive quantitative Aussage über funktionell wirksame Induktionen der CYP2E1-Genexpression lässt sich am ehesten durch Bioassays treffen. Dabei handelt es sich um die Erfassung von Umsatzraten bei für das jeweilige Enzym spezifischen Reaktionen. Die Umsatzraten korrelieren direkt mit der Quantität des induzierten Enzyms. Für das CYP2E1 sind bisher drei solcher spezifischer Reaktionen beschrieben:

- Demethylierung von N,N Dimethylnitrosamin
- Hydroxylierung von P-Nitrophenol
- Hydroxylierung von Chlorzoxazon. (45)

Dabei ist die Bestimmung des Chlorzoxazon-Umsatzes zehnfach sensitiver gegenüber den beiden voran genannten Methoden. Auch ist das Chlorzoxazon mit einer vergleichsweise geringeren Toxizität behaftet als Phenole oder Nitrosamine, dies hat sogar den Einsatz der

Methode in vivo ermöglicht. (45) Peter et al. beschrieben 1990 erstmals den Einsatz dieses zentral wirksamen Muskelrelaxans zur Bestimmung der katalytischen Aktivität des CYP2E1 in humanen Lebermikrosomenfraktionen. (66) Der Einsatz an einer Primärkultur ist bisher nicht belegt.

Tabelle 3: Auswahl beschriebener CYP2E1 Induktoren und ihre Wirkungsebene

<i>Transkriptionssteigerung</i>	<i>Translationssteigerung</i>	<i>Proteinstabilisierung</i>
Jones et al. Demethylierung am 5' CpG Leber und Lunge, Ratte und Mensch (39)		
<u>Goasduff et al.</u> in vivo Behandlung d. Ratte durch Aceton mit Methylcholanthren oder Pyridin mit Methylchlanthren, Induktion im Nierengewebe		
In vivo Behandlung der Ratte mit Pyridin, Niere	in vivo Behandlung der Ratte mit Pyridin, Niere und Leber	in vivo Behandlung der Ratte mit Aceton, Niere und Leber (31)
<u>Zangar et al.</u> In vitro Inkubation von Rattenhepatozyten mit Ciprofibrat	in vitro Behandlung von Rattenhepatozyten mit Ethanol, Aceton, Pyridin (94)	
	<u>Gonzalez et al.</u> Diabetische Stoffwechsel-lage (spontan oder iatrogen) der Ratte durch RNA-Stabilisierung	in vivo Behandlung von Ratten mit Aceton, Ethanol, Pyrazol (32)

1.4. Die Cytochrom P 450 Isoformen 2B und 1A1 (CYP2B und CYP1A1)

Bei der Cytochrom P 450 Isoform 2B unterscheidet man die drei Subtypen 2B1, 2B2 und 2B3, wobei die letztere eine konstitutiv exprimierte Unterform der Leber ist. Für das CYP2B1 und 2B2 ist eine ähnliche Substratspezifität beschrieben, beide haben eine siebenundneunzigprozentige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz. Es handelt sich dennoch um zwei verschiedene Gene mit eigener Gen-Regulation. Das CYP2B2 wird in der Leber konstitutiv exprimiert und ist dort im Gegensatz zum CYP2B1 nicht durch Phenobarbital induzierbar. (32) Die vorherrschend in Nagerlungen exprimierte Isoform ist das CYP2B1. In der Lunge ist das CYP2B1 jedoch nicht durch Phenobarbital induzierbar. Das CYP2B1 hat bei der Verstoffwechslung einiger Substrate eine deutlich höhere katalytische Aktivität als das CYP2B2, so zirka fünffach höher bei der Metabolisierung von Benzphetamin

und Testosteron sowie zweifach höher in der des polyzyklischen Aromaten Benzo(a)pyren. (29, 32) Bekannt ist ein pathophysiologischer Zusammenhang des CYP2B1 mit dem Leberzellkarzinom bei Exposition gegenüber Aflatoxin. (44)

Das in der Nagerlunge konstitutiv nur in geringen Mengen exprimierte CYP1A1 ist durch Liganden des sogenannten Dioxin- oder TCDD-Rezeptors, wie beispielsweise durch 3-Methylcholanthren, im Sinne einer Transkriptionssteigerung induzierbar. (42) Beim Menschen konnten erhöhte CYP1A1 Aktivitäten in Lungenbiopsaten von Rauchern und in primären Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden. (58, 84) Außerdem wurden für den Menschen phäno- und genotypische Polymorphismen des CYP1A1 mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko in Zusammenhang gebracht. (52)

Gesichert ist die Rolle des CYP1A1 bei der Toxifizierung polyzyklischer Aromaten, wie des Benzo(a)pyrens, durch Überführung in kanzerogene Epoxide. Das Benzo(a)pyren ist ein Kanzerogen, das bei unvollständiger Verbrennung fossiler Brennstoffe und Pflanzen entsteht. Es ist neben den Nitrosaminen das wichtigste Kanzerogen des Zigarettenrauches und sowohl oral als auch transdermal gut resorbierbar. (29, 90) Seine metabolische Aktivierung findet insbesondere in der Lunge selbst unter Mitwirkung des CYP1A1 statt. Das Benzo(a)pyren ist jedoch Substrat sowohl für das CYP1A1 als auch das CYP2B1. Dabei werden bei Biotransformation durch das CYP2B1 nichttoxische Metabolite generiert. Aus diesem Grund ist das CYP2B1 / 1A1-Verhältnis wesentlich für die Empfindlichkeit eines Gewebes gegenüber der kanzerogenen Wirkung des Benzo(a)pyrens.

In Versuchen an Ratten, die inhalativ mit m-Xylen behandelt worden waren, konnte eine erhöhte Empfindlichkeit des Lungengewebes gegenüber Benzo(a)pyren nachgewiesen werden. Dabei war das CYP2B1/1A1-Verhältnis durch Hemmung der CYP2B1 Expression gesenkt worden. (29, 30) Die Expression des CYP2B1 und 1A1 steht deshalb also in einem engen Zusammenhang zueinander und ist aufgrund des Substratspektrums der beiden Isoformen insbesondere in der Pathophysiologie des Lungenkrebses von großem Interesse.

Aufgrund populationsbezogener Studien bezüglich auftretender Polymorphismen der humanen CYP1A1 und 2E1 Gene konnte ein kausaler Zusammenhang einerseits zwischen dem bronchialen Plattenepithelkarzinom und einer chronischen Belastung mit polyzyklischen Aromaten, die durch CYP1A1 bioaktiviert werden und andererseits zwischen den Nitrosaminen, die durch CYP2E1 metabolisch aktiviert werden, und dem bronchialen Adenokarzinom postuliert werden. Die zunehmende Inzidenz des Adenokarzinoms wurde auf eine relativ höhere Belastung mit Nitrosaminen im gefilterten Zigarettenrauch zurückgeführt. (79)

Dennoch bleiben Untersuchungen zur Expression und Induzierbarkeit beider Cytochromisoformen von großem Interesse in der der Erforschung der pulmonalen Kanzerogenese

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die Präparation von Lungenzellen wurden männliche Wistar-Ratten (Zentrale Tierzucht der Universität Göttingen) mit einem Gewicht von 100-150 g eingesetzt, für alle weiteren Versuche wurden Tiere mit einem Gewicht von 200-400 g verwendet. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit abwechselnden Hell- und Dunkelperioden von jeweils 12 Stunden gehalten und erhielten Standardfutter (Altromin Standard, Nr. 13324, Lage, Lippe) und Wasser *ad libitum*. Für Induktionsexperimente *in vivo* erhielten die Tiere zur CYP1A1 Induktion 48 h vor der Präparation 80 mg/kg 3-Methylcholanthren in 2,66 ml/kg Erdnussöl durch intraperitoneale Gabe, die Kontrolltiere erhielten ausschließlich 2,66 ml/kg Erdnussöl. In den Versuchen zur *in vivo* Induktion des CYP2E1 wurden die Tiere der Verumgruppe 72, 48 und 24 h vor Organpräparation oral über Schlundsonde mit 2,875µg Ciprofibrat pro g Körpergewicht gelöst in HEPES behandelt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten zu den gleichen Zeitpunkten identische Volumina HEPES per os.

2.2. Chemikalien und Biochemikalien

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

2.2.1. Reagenzien für die Organpräparation und Zellkultur

N-Acetylcystein	Sigma, Deisenhofen
Deoxyribonuclease I	Sigma, München
DMEM Trockensubstanz	Gibco, Berlin
Fetales Kälberserum	PAA, Linz, Österreich
HAM-F12	Gibco, Berlin
HEPES Seromed	Sigma, München
Humantransferrin	Sigma, München
Hydrocortisonhemisuccinat	Sigma, München
Kollagen Typ I aus Rattenschwanz	Becton Dickinson, Bedford, USA
L-Glutamin	Sigma, München
Liquemin N 25000	Hoffmann/La Roche, Grenzach Wyhlen
3-Methylcholanthren	Eastman Kodak Co, Rochester, USA
Natriumselenit	Sigma, München

Penicillin/Streptomycin	Serva, Heidelberg
Percoll 1,124 g/ml	Pharmacia, Freiburg
Phenobarbital	Serva, Heidelberg
Rinderinsulin	Sigma, München
Rinderserumalbumin Fraktion V	Paesel & Lorei, Frankfurt
3,3',5'-Triiodo-L-thyronin	Sigma, München
Trypsin 0,25 % aus Schweinepankreas	Sigma, München
Trypsininhibitor Typ II S	Sigma, München

2.2.2. Zellfärbungsreagenzien

Gerbsäure	Sigma, München
Osmiumtetroxid	Sigma, München

Sämtliche anderen Reagenzien wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

2.2.3. Reagenzien für die Western Blot Analytik

Acrylamid/Bisacrylamid	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
ECL (verstärkte Chemolumineszenz)- Reagenzien	Amersham/Buchler, Braunschweig
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fremareform, Lüneburg
Molekulargewichtsstandard SDS-6H (Molekulargewichtsbereich: 29-205 kDa)	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin Fraktion V	Paesel & Lorei, Frankfurt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
TRIzol™-Reagenz	Gibco BRL, Garthersburg, MD, USA
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbit-Mono- laurat)	Sigma, Deisenhofen

Antikörper

Primäre Antikörper: Zum immunochemischen Nachweis von CYP1A1 und CYP2B1 wurden CYP 1A- bzw. CYP2B-spezifische Antikörper von Gentest Co (Woburn, MA, USA) verwendet. Es handelte sich hierbei um affinitätsgereinigte, polyklonale Antikörper, die aus mit Ratten CYP1A1 bzw. Ratten CYP2B1 immunisierter Ziege gewonnen wurden. Als Referenzstandards wurden Lebermikrosomen, welche aus mit 3-Methylcholanthren bzw. Phenobarbital vorbehandelten Ratten isoliert wurden, eingesetzt. Der primäre CYP2E1-spezifische Antikörper aus dem Serum immunisierter Ziegen war von der Firma NatuTec, Frankfurt (DAIICHI PURE CHEMICALS) bezogen worden.

Sekundärer Antikörper: Als sekundärer Antikörper wurde ein affinitätsgereinigter, gegen Ziegen-Immunglobulin G gerichteter, polyklonaler, Peroxidase-gekoppelter Antikörper aus Kaninchen (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

Photochemikalien

Entwickler (G 153) und Schnellfixierer (G 354) wurden von Agfa-Gevaert N.V. (Leverkusen) bezogen.

2.2.4. Chemikalien für die Northern Blot Analytik

TRIZOL™-Reagenz	Gibco BRL, Garthersburg, MD, USA
Guanidiniumthiocyanat (97 %)	Fluka, Neu-Ulm
Agarose (DNA-Grad)	Life Technologies, Paisley, Schottland
Heringssperma DNA	Boehringer, Mannheim
Serdolit MB-1 (Ionenaustauscherharz)	Serva, Heidelberg
T4-Polynukleotid-Kinase (10 I.E./µl)	Boehringer, Mannheim
[γ- ³² P]ATP (spez. Akt. 6000 Ci/mmol)	Dupont/NEN, Bad Homburg

Oligonukleotid-Sonden

CYP2B1: Der Nachweis der CYP2B1 mRNA erfolgte mittels einem antisense orientierten 18mer Oligonukleotid, welches von MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert wurde. Die Sequenz, 5'-GGA-TGG-TGG-CCT-GTG-AGA-3' leitet sich aus einem Abschnitt des Exon 7 im 2B1 Gen ab. (83)

2.2.5. Chemikalien für 2E1-Bioassay

Chlorzoxazon	Sigma, München
--------------	----------------

2.2.6. Chemikalien für Induktionsversuche

Ciprofibrat	Sigma, München
Permethrin	Riedel de Haen, Hannover

2.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blot-Analytik (Northern und Western)

BAS-Imager	BAS-1500	Fujifilm, bezogen von Raytest, Straubenhardt
------------	----------	---

	Imaging plates (³² Phosphor-sensitiv)	2040	Fujifilm, bezogen Raytest, Straubenhardt	von
	Fujix Cassette		Fujifilm, bezogen Raytest, Straubenhardt	von
	Auswertungssoftware 2.0 Bas-Reader 2.9	Tina	Raytest, Straubenhardt	
	Eraser		Raytest, Straubenhardt	
Densitometer	Scanpack-System Flachbrett-Scanner Auswerte-Software)	(Rechner, GT-8000,	Biometra, Göttingen	
Elektrophorese	Stromversorgungsgerät Desatronic 2000/3000		Desaga, Heidelberg	
	horizontale Gel-Kammer H5		Gibco/BRL, Eggenstein	
	Horizon 11-14 Gel casting system: Mighty Small Dual Gel Caster		Hoefler, San Francisco, USA	
	Mighty Small II Vertikal Elektrophorese-Kammer		Hoefler, San Francisco, USA	
Filmmaterial	Hyperfilm-ECL		Amersham/Buchler, Braunschweig	
	Hyperfilm-MP		Amersham/Buchler, Braunschweig	
	Polaroid 667		Sigma, München	
Filterpapier	2668/8, 2043b MGL		Schleicher & Schüll, Dassel	
Homogenisator	S (2ml)		Braun, Melsungen	
Hybridisierungssofen	Hybaid		Biometra, Göttingen	
Monitor	LB 1210 D		Berthold, Wildbad	
Photometer	UV 160		Shimadzu, Düsseldorf	
Kamera	Polaroid DS-34 mit Ablendung und Orangefilter		Sigma, München	
Küvetten	Halb-Mikro-Küvetten: 1,6 ml		Sarstedt, Nümbrecht	
	Quartz, 1 ml		Hellma, Krannich, Göttingen	
Membranen	PVDF-Membran: Immobilon-P, P-15552		Millipore, Eschborn	
	Nylon-Membran: Hybond-N, RPN 303 N		Amersham/Buchler, Braunschweig	
MicroSpin G-25 Säulen			Pharmacia Biotech, Freiburg	

Spitzen	Gel Saver II	Gerlinde Kisker, Mühlhausen
Transferapparatur	Semidry-Kammer mit Phase, Lübeck Glas/Graphit- und Edelstahl- Elektrode	
UV-Flächenstrahler	302 nm Modell 302 NM-906	Intas, Göttingen

Organisation und-perfusion, Zellisolation:

Binokular		Zeiss, Oberkochen
Einwegspritzen		Braun, Melsungen
Kaltlichtlampe	Kaltlichtfontäne	482 B
Kryostat mit Umlaufpumpe	Lauda TUK 30D	Schmidt, Göttingen
Kugeloxygenator mit Wärmemantel		Ochs, Göttingen
Kühlkammer		Wissenschaftliche Werkstätten, Göttingen
Luer-Record Adapter Combifix		Braun, Melsungen
Magnetrührer		Janke & Kunkel, Staufen
Nylonnetze	Nytal Monofilament 250 µm und 60 µm	Schweizerische Seidengaze- fabrik, Thal, Schweiz, bezogen von Krannich, Göttingen
Perfusor		Braun, Melsungen
Pharmakokinetik-Software	Topfit V 2.0	Gödecke, Freiburg bzw. Schering und Thomae, Berlin
Plastikzentrifugenröhrchen	15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rodent Ventilator	Modell 7025	Hugo Sachs, March
Rotationsschüttler	IKA-Vibrax VRX	Janke und Kunkel, Staufen
Schlauchpumpe	MV-MS 3	Ismatec, Zürich, Schweiz
Schlauchpumpe	P II	Schütt, Göttingen
Schlauchpumpe		Masterflex, Cole Parmer, IL, USA
Schüttler		Bodo Schmidt, Göttingen
Transferpipetten	3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Umlaufwasserbad		Desaga, Heidelberg
Szintillationszähler	LS 1801	Beckman-Instruments, München

Zellkultur:

Autoklav	Vertikal-Autoklav FV	Technomara, Fernwald
Brutschrank	Steri-Cult 200	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
Einwegartikel	Kulturschalen	Nunc, Wiesbaden
	Kulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
	sterile 1 ml, 2 ml und 10 ml Einmal- Kunststoffpipetten	Greiner Nürtingen
	Zellkultureinsätze	Nunc, Wiesbaden
Mikroskop	Invertoskop ID 02	Zeiss, Oberkochen
Sterilbank	Biogard Hood B40-112	Baker Inc., Sanford, Maine, USA
Sterilfiltration	Sartolab-P-plus Filterkartuschen (0,2 µm mit 0,45 µm Vorfilter)	Sartorius AG, Göttingen
	Einmal-Filterhalter 0,45 µm	Schleicher&Schüll, Dassel
	Schlauchpumpe PML 1305-ND100	KNF Flodos, Vertrieb Satorius

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge TJ-6	Beckman Instruments, München
Kühlzentrifuge EBA12R	Hettich, Vertrieb durch Krannich, Göttingen
Zentrifuge 3200/5413	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für Micro-Hämatokrit	Heraeus, Osterode

2.4. Methoden

2.4.1. Bereitung des Perfusionsmediums

Das Perfusionsmedium wurde am Tag der Perfusionen frisch aus 2 verschiedenen Stammlösungen angesetzt.

<u>Stammlösung 1:</u> in 100 ml	4,12g	CaCl ₂
------------------------------------	-------	-------------------

<u>Stammlösung 2:</u>	82,98g	NaCl
in 1000 ml		
	3,6g	KCl
	1,63g	KH ₂ PO ₄

Am Versuchstag wurden 10 ml der Stammlösung 1 und 100 ml der Stammlösung zu einer fertigen DMEM Lösung auf 1000 ml aufgefüllt und der Lösung 0,901g Glukose sowie 2,38 g HEPES zugefügt, der pH-Wert des Perfusionsmediums war auf 7,4 eingestellt.

2.4.2. Präparation der Rattenlunge

Vor Operationsbeginn wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50 mg/ml in 0,9 % NaCl) in einer Dosis von 50 mg/kg narkotisiert und anschließend heparinisiert (2500 I.E./kg), um eine intraoperative Blutgerinnung zu verhindern. Anschließend erfolgte die Darstellung der Trachea, eine Tracheotomie und die Einbindung eines Katheters. Zur Prophylaxe einer Atelektaseentstehung wurde die Lunge umgehend nach transabdominaler Eröffnung des Diaphragmas über den Trachealkatheter mit 60 x 1,2 ml Luft pro min ventiliert. Nach der Thorakotomie wurde ein Katheter durch eine Inzision in der rechten Herzkammer in den Truncus pulmonalis platziert. Der Katheter wurde fixiert und die Lunge sofort mit kalter PBS-Lösung (Phosphat-gepufferte Salzlösung) perfundiert. Anschließend wurde die linke Herzkammer vollständig abgetrennt und der linke Vorhof breit inzidiert. Zum Anschluss der Lunge an den Kreislauf der Isoliert Perfundierten Lunge wurden sowohl der Truncus pulmonalis als auch das linke Atrium kanüliert und noch in situ mit dem Perfusionsmedium perfundiert. Durch stumpfe Präparation erfolgte die Mobilisierung der Lunge und Trachea en bloc. Für Zellpräparationen war die Organpräparation und in situ Perfusion mit Erreichung makroskopischer Blutleere damit abgeschlossen. Für die Versuche mit der isoliert perfundierten Lunge wurde nach Transfer des Organs in die künstliche Thoraxkammer die eigentliche Perfusion gestartet.

2.4.3. Präparation der Rattenleber

Nach Narkose und Heparinisierung entsprechend der Lungenpräparation wurde das Abdomen eröffnet und das Gefäßsystem sowie der Gallengang dargestellt. Möglichst gewebsschonend wurden je zwei Ligaturen um den Gallengang und die Pfortader und je eine Ligatur um den Truncus coeliacus und die Vena cava inferior proximal der Nierenvenen gelegt. Der Gallengang und die Pfortader wurden durch eine Inzision zwischen distaler und proximaler

Ligatur mit zwei Kathetern kanüliert, wobei die proximale Ligatur der Fixierung und die distale Ligatur der zusätzlichen Sicherung der korrekten Katheterlage diene. Direkt nach Einbindung des Pfortaderkatheters wurde die Leber bis zum Ende der Präparation mit kalter PBS-Lösung perfundiert.

2.4.4. Die Isoliert Perfundierte Lunge

Für die Perfusionsversuche wurden Perfusionsgerät und Software der Firma Hugo Sachs Electronics, Deutschland genutzt. Das Gerät erlaubt durch die künstlichen Thoraxkammer, in die die präparierte Lunge nach Kanülierung des Truncus pulmonalis und des Atrium sinistrum eingebracht wird, sowohl eine Überdruck- (PPV) als auch eine Unterdruckbeatmung (NPV). Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Organperfusionsen wurde ausschließlich im Modus der Unterdruckbeatmung gearbeitet. Dabei lagen die pleuralen Beatmungsdrücke zwischen 0 und -20 cm H₂O und damit wurden Atemzugvolumen von bis zu 4,0 ml erreicht, die Beatmungsfrequenz wurde konstant bei 60 Atemzügen pro min gehalten. Regelmäßig durchgeführte tiefe Inspirationszüge dienten der Atelektaseprophylaxe. Die Perfusion kann am Gerät sowohl druck- (CPP) als auch flusskonstant (CFP) erfolgen. Dabei hat sich die flusskonstante Perfusion für metabolische Untersuchungen als vorteilhaft erwiesen, da ein konstanter An- bzw. Abfluss von Substraten bzw. Metaboliten gewährleistet wird. (91) Für die vorliegenden Versuche wurde aus diesem Grund im CFP-Modus gearbeitet, die Perfusion erfolgte dabei mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 bis 12 ml Perfusionsmedium pro min. Die Perfusion wurde rezirkulierend durchgeführt. Das heißt, das Perfusionsmedium wurde nach Passage der Lunge dem Ausgangspool immer wieder zugeführt. Zur Überwachung der Viabilität des Modells wurden Organgewicht, Atemzugvolumen und Compliance kontrolliert. Da dies insbesondere bei Formation eines Lungenödems die empfindlichsten Parameter im Sinne einer Gewichtszunahme und eines Abfalls von Compliance und Atemzugvolumen sind. Die Datenerfassung erfolgte alle 10 s. Des weiteren wurden Resistance, arterieller und venöser Mitteldruck sowie der pH des Perfusats überwacht. Die Stabilisierung des pH wurde durch das Bicarbonat-Puffersystem und CO₂-Begasung erreicht.

2.4.5. Isolierung von Alveolar Typ II-Zellen

Die AII-Zell-Isolierung erfolgte in Anlehnung an die von Dobbs et al. 1986 beschriebene und von Richards et al. 1987 modifizierte Methode. (25, 71) Die gesamte Isolation wurde unter

sterilen Bedingungen durchgeführt und dauerte im Mittel 4 h. Mit Ausnahme der Enzyme wurden alle Lösungen eisgekühlt eingesetzt und die Petrischalen mittels einer eigens angefertigten, in die Sterilbank eingelassenen Kühlkammer auf 4°C temperiert. Sämtliche Zentrifugationen wurden bei 4°C durchgeführt.

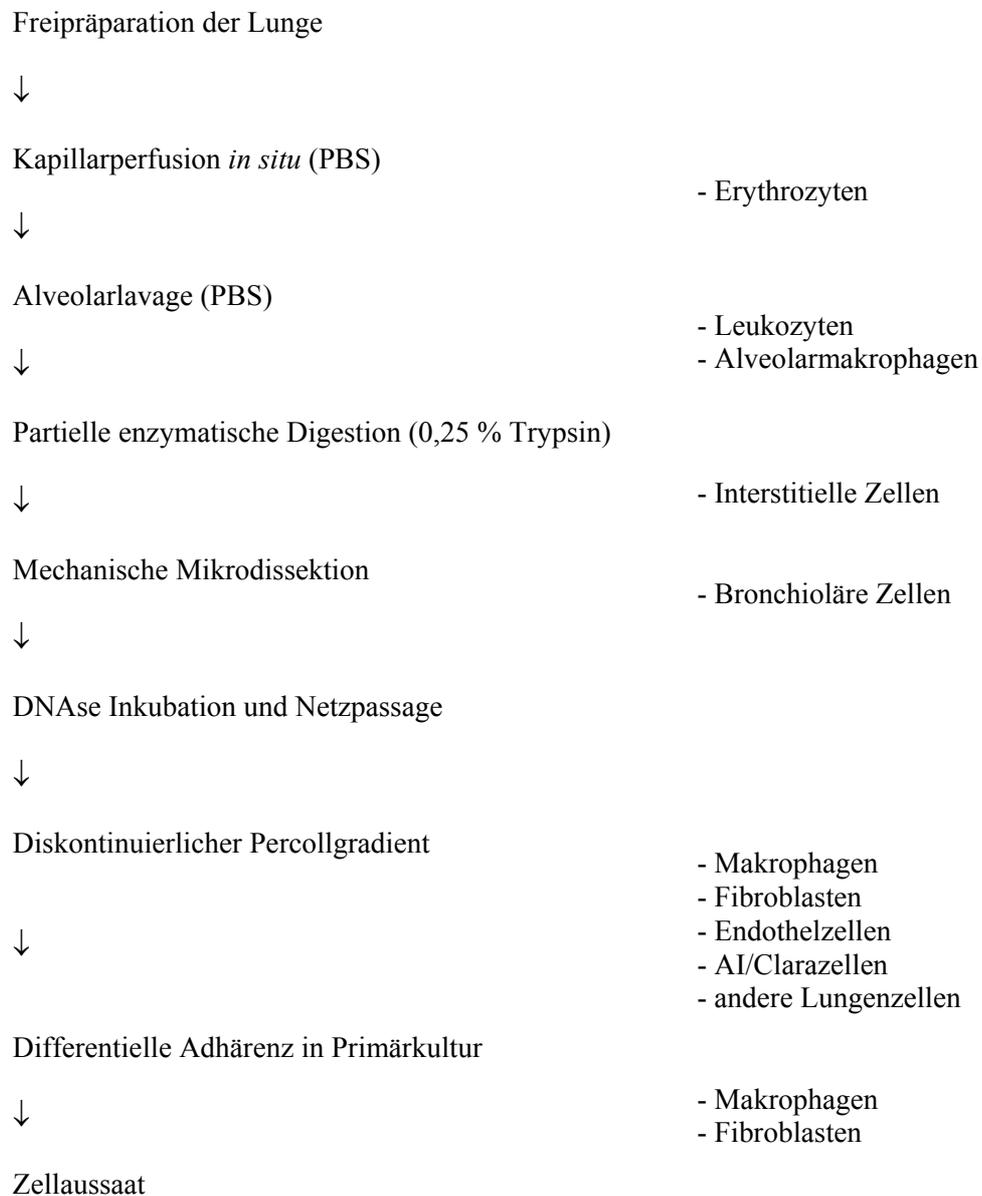


Abb. 1: Schematische Darstellung der Isolierung von Alveolar Typ II-Zellen aus pulmonalem Gewebe von Ratten.

Die in der Isolation verwendete DMEM-Lösung wurde zur Protektion der Zellen mit 3 % Rinderserumalbumin versetzt. Eine Übersicht über die durchgeführten Isolationsschritte gibt die Abb. 3. Nach Isolierung der Lungen wurden die Lungenpräparate in ein mit eiskalter PBS-Lösung gefülltes Plastikzentrifugenröhrchen überführt und über den Trachealkatheter an

einen Adapter im Verschlussdeckel des Röhrchens gehängt. Um ein Kollabieren der Lungenflügel zu vermeiden, wurden über den Adapter mit einer aufgesetzten Spritze ca. 6 ml PBS-Lösung instilliert. Danach wurden die Lungen in eine mit eiskalter PBS-Lösung gefüllte Petrischale überführt und eine Alveolarlavage durchgeführt, um soweit wie möglich Makrophagen und Leukozyten zu entfernen. Dazu wurden die Lungen über den Trachealkatheter viermal mit je 5 ml PBS-Puffer gefüllt und wieder entleert. Anschließend wurden die Lungen in ein neues Röhrchen überführt, ca. 7 ml Trypsinlösung instilliert und in einem Wasserbad bei 37°C für 40 min inkubiert. Nach ca. 15 min wurden weitere 5 ml Trypsinlösung instilliert.

Nach Inkubationsende wurden die Lungen wieder in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt und mit 10 ml Trypsininhibitor-Lösung gefüllt. Trachea, Bronchien, Ösophagus und verbliebenes Myokard wurden entfernt, die einzelnen Lungenlappen voneinander separiert und in kleinere Gewebstücke zerteilt. Die sich anschließende Mikrodissektion des Gewebes wurde unter 4-6facher Vergrößerung unter Verwendung zweier Mikropinzetten vorgenommen. Dabei wurde das Gewebe in kleinere Aggregate zerzupft und gleichzeitig weiteres Bronchial- und Bindegewebe entfernt. Das auf der Oberfläche aufschwimmende Alveolargewebe wurde mit einer abgeschnittenen Transferpipette in 20 ml vorgewärmte DNase (Desoxyribonuklease) 250 Lösung gegeben und für 10 min bei 37°C auf einem Rotationsschüttler bei 100 Upm inkubiert. Um eine endgültige Gewebelyse zu erreichen, schloß sich eine zweimalige Netzpassage der Zellaggregate mit Nylonnetzen der Porengröße 250 µm und 60 µm an, bei der zum Verreiben des Gewebes 10 ml Glaspipetten verwandt wurden. Während der Netzpassage wurde DMEM-Lösung zugegeben, die resultierende Zellsuspension 8 min bei 140 x g zentrifugiert und die Zellen erneut in 10 ml DMEM-Lösung aufgenommen. Zur Aufreinigung der AII-Zellen wurden zwei diskontinuierliche Percoll-dichtegradienten mit je 5 ml der Suspension überschichtet und für 30 min ohne Bremse bei 250 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die sich zwischen den beiden Percoll-dichten als weißer Ring darstellenden AII-Zellen unter Kaltlicht mit einer stumpfen Kanüle abgesaugt und in 3 ml DNase 50 plus 5 ml DMEM-Lösung resuspendiert. Nach Zentrifugation für 8 min bei 140 x g wurde der Überstand abdekantiert und die resultierenden AII-Zellen in 5 ml Medium resuspendiert.

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

15 mM KH_2PO_4

Die 10fach konzentrierte Stammlösung wurde autoklaviert. Der pH-Wert wurde erst nach Versetzen mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ eingestellt.

PBS mit Ca/Mg-Salzen (pH 7,4):

138 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,0 mM	Na_2HPO_4
1,5 mM	KH_2PO_4
0,5 mM	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
0,9 mM	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurde die PBS-Lösung mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert.

DMEM-Lösung:

0,99 % (w/v)	DMEM
11 mM	NaHCO_3
10 mM	HEPES
3 % (w/v)	Rinderserumalbumin
50 I.E./ml	Penicillin/Streptomycin

HEPES-Puffer wurde zunächst als 100fach konzentrierte Stammlösung (1 M) angesetzt, mit 10 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und 10 ml der DMEM-Lösung zugesetzt. Die Lösung wurde vor Zugabe von Penicillin/Streptomycin durch einen $0,45 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert. Vor dem Sterilfiltrieren wurden 5 ml der sterilen, gebrauchsfertigen Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 I.E./ml) in der Flasche vorgelegt. Den zugegebenen Volumina entsprechend wurden 15 ml weniger bidestilliertes H_2O eingesetzt. Die fertige Lösung wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch in 5 ml Portionen aliquotiert.

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

Trypsininhibitor: 500 mg Trypsininhibitor wurden in 100 ml DMEM-Lösung gelöst und in ca. 15 ml Aliquots durch mehrere $0,45 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert. Die fertige Lösung wurde in je 20 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

DNase 250:

75 % (v/v)	PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
0,025 % (w/v)	DNase
25 % (v/v)	Fetales Kälberserum
10 I.E./ml	Penicillin/Streptomycin

Die DNase wurde in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gelöst und die Lösung durch $0,45 \mu\text{m}$ sterilfiltriert. Anschließend wurden steriles fetales Kälberserum und Penicillin/Streptomycin zugegeben. Die DNase 250-Lösung wurde in 20 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

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

Die fertige DNase 50-Lösung wurde in 4 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

<u>Percoll (hohe Dichte, pH 7,4):</u>	61,28 % (v/v)	Percoll
	9,44 % (v/v)	PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
	4,72 % (v/v)	Fetales Kälberserum
<u>Percoll (niedrige Dichte, pH 7,4):</u>	25,90 % (v/v)	Percoll
	9,52 % (v/v)	PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
	4,76 % (v/v)	Fetales Kälberserum

Die Percoll-Lösungen wurden auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, durch $0,45 \mu\text{m}$ steril filtriert, zu je 10 ml aliquotiert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

<u>All-Medium:</u>	<u>Endkonzentrationen</u>	<u>Stammlösungs-</u> <u>konzentrationen</u>	<u>Zugabevolu-</u> <u>men (für 1l)</u>
	0,499 % (w/v)	DMEM	
	0,532 % (w/v)	HAM F-12	
	29 mM	NaHCO_3	
	10000 I.E./l	Penicillin/ Streptomycin	
	3 % (v/v)	Fetales Kälberserum	
	0,0005 % (w/v)	Humantransferrin	5 mg/ml
	4,75 pM	3,3',5'-Triiodo-L- thyronin	95 nM
	50 nM	Na-Selenit	5 mM
	50 nM	Hydrocortison	2 mM
	10 mM	HEPES	1 M (pH 7,4)
	0,0005 % (w/v)	Insulin	1 mg/ml
			5 ml

Jeweils 9,99 g DMEM und 10,63 g HAM F-12 wurden in je 800 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Von beiden Lösungen wurden 400 ml zusammengegeben, mit Natriumhydrogenkarbonat und 10 ml einer 100fach konzentrierten HEPES Stammlösung (1M, pH 7,4) versetzt, mit bidestilliertem Wasser auf 970 ml aufgefüllt, durch $0,2 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Von den Supplementierungen wurden

jeweils Stammlösungen hergestellt, in den angegebenen Volumina zugesetzt und in 355 µl Aliquots aufgeteilt. Das fetale Kälberserum wurde in 1,5 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor jeder Zellaussaat wurden 48 ml der DMEM/HAM F-12 Lösung mit 355 µl des Supplementgemisch und 1,5 ml des fetalen Kälberserums versetzt.

2.4.6. Differentielle Adhärenz

Um eine weitere Aufreinigung der isolierten Zellen zu erreichen, wurde ausgenutzt, dass AII-Zellen eine im Vergleich zu Makrophagen und Fibroblasten verzögerte Adhärenz aufweisen. Für die differentielle Zellaussaat wurden die pro Präparation isolierten Zellen in 5 ml Medium in einer unbeschichteten 58 mm Kulturschale ausplattiert und für 1 h inkubiert (5 % CO₂, 95 % Luft, 37°C, H₂O-Sättigung). Danach wurde die überstehende Suspension mit den nicht adhärennten Zellen vorsichtig abgenommen und die Zelldichte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Zellvitalität wurde anhand des Trypanblau-Ausschlußtests unter Zusatz eines äquivalenten Volumens einer 0,25 %igen Trypanblaulösung zu der Zellsuspension bestimmt. Für die Untersuchung der Cytochrom P-450 Expression in frisch isolierten Zellen wurden die Zellen nach der differentiellen Zellaussaat abzentrifugiert, das Pellet in 1-2 ml Trizol-Reagenz (siehe 2.4.11. und 2.4.12.) aufgenommen, in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4.7. Extrazelluläre Matrices

Unter Standardbedingungen wurden die Polystyrol-Petrischalen zur Kultivierung der AII Zellen mit aus Rattenschwänzen gewonnenem Typ II Kollagen beschichtet. Dazu wurde die kommerziell verfügbare Kollagen-Lösung mit sterilfiltrierter Essigsäure (0,02 %) auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und 80 µl pro 58 mm Kulturschale mit einem sterilen Glasspatel verteilt (3,7 µg/cm²). Die Kulturschalen wurden vor der Zellaussaat unter der Sterilbank getrocknet. Unter sterilen Bedingungen konnten die Kollagen-beschichteten Kulturschalen bis zu einem Monat lang aufbewahrt werden.

2.4.8. Kultivierung von Alveolar Typ II-Zellen

Grundsätzlich wurden die aus der Präparation zweier Versuchstiere gewonnenen Zellen in 7,5 ml Medium aufgenommen, so dass eine Zelldichte zwischen $2,4 \times 10^6$ und 4×10^6 Zellen/ml resultierte. Zur Zellaussaat wurden je 2,5 ml Zellsuspension pro 58 mm Kulturschale ausgesät (Zelldichte $0,28 \times 10^6$ - $0,46 \times 10^6$ Zellen/cm²) und die Zellen durch

leichtes Schwenken gleichmäßig auf der Kulturschale verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % Luft und Wassersättigung. Der erste Medienwechsel erfolgte 24 h oder 48 h nach der Aussaat. Für Untersuchungen der Cytochrom P-450 Expression wurde das routinemäßig verwendete AII-Medium mit verschiedenen Faktoren supplementiert. Nach Beendigung der gewünschten Kulturdauer wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden entweder sofort der RNA- bzw. Protein-Isolierung zugeführt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.9. Zellfärbung

Um einen morphologischen Nachweis über die Reinheit der AII-Zellpräparation bzw. der Kultur zu führen, wurden die charakteristischen osmiophilen Lamellenkörperchen in den Zellen mit einer Gerbsäure/Polychrom-Färbung nachgewiesen. Während sich die Lamellenkörperchen der AII-Zellen durch diese Färbung als schwarze Punkte im Lichtmikroskop darstellen, werden eventuell kultivierte Fibroblasten sowie Makrophagen nicht angefärbt. (57) Zur Färbung wurden AII-Zellen auf mit Rattenschwanzkollagen Typ II-beschichteten Glasdeckgläsern ausgesät und nach 72 h Kultur mit 1,5 % Glutaraldehyd in PBS-Lösung für 15 min fixiert. Die Kulturen wurden anschließend 2 x mit PBS gewaschen und mit 1 % Osmiumtetroxid (in PBS) für 1,5 h inkubiert. Nachdem erneut 2 x mit PBS gewaschen wurde, wurden die Zellen für 12 h einer Inkubation mit frisch angesetzter Gerbsäurelösung (1 % in PBS, pH 6,8) unterzogen. Nach diesem Färbeschritt wurde 2 x in PBS und 2 x in destilliertem Wasser gewaschen und die Präparate in 0,1 % Natriumazid (in bidestiliertem Wasser) aufbewahrt. Obwohl die Lamellenkörperchen zu diesem Zeitpunkt bereits beurteilt werden konnten, wurde eine zweite Färbung mit Methyleneblau und basischem Fuchsin vorgenommen, um den Kontrast zu steigern. Dazu wurden die Deckgläser aus der Natriumazidlösung genommen, für 10 s mit Lösung A und danach für 30 s mit 1 % Natriumhydroxid behandelt. Anschließend wurden die Präparate mit bidestiliertem Wasser gespült, für 2 s mit Lösung B inkubiert, 3 x mit saurem Alkohol (1 % HCl (v/v) in 70 % Ethanol) gewaschen und nochmals für 2 s mit Lösung B behandelt. Zuletzt wurde die Färbung kurz mit H₂O gespült, in 0,1 % Natriumazid aufbewahrt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Um die angefärbten Monolayer zu dokumentieren, wurden die Präparate mit Glyceringelatine auf Objektträgern fixiert und anschließend photographiert.

<u>Lösung A (2fach):</u>	0,13 % (w/v)	Methylenblau
	0,02 % (w/v)	Azur II
	10 % (v/v)	Glycerin
	10 % (v/v)	Methanol
<u>Lösung B (4fach):</u>	0,2 % (w/v)	basisches Fuchsin

Die Lösungen wurden vor dem Gebrauch mit den entsprechenden Volumina bidestilliertem H₂O verdünnt.

2.4.10. Gewinnung der Mikrosomenfraktionen

Die zur Gewinnung der Mikrosomenfraktionen aus Lungen- und Lebergewebe genutzte Methode war von Dallner et al. beschrieben worden. (19) Dazu waren Lungen- und Leberlappen nach Organpräparation wie oben beschrieben blutleer schockgefroren worden. In einem Porzellanmörser erfolgte unter Zugabe von flüssigem Stickstoff die Pulverisierung von jeweils einem Gewebstück von ca. 0,5 m³ Abmessung. Das zerkleinerte Gewebe wurde dann in TES-Puffer aufgenommen und durch 10 Hübe bei 1400 UPM des Teflonpistills homogenisiert. Die erhaltenen Homogenate wurden mit TES-Puffer auf ein Volumen von 12 ml aufgefüllt und bei 4°C für 20 min in einem JA20 Festwinkelrotor bei 12.000 x g zentrifugiert, dabei wurde die mikrosomen- und zytoplasmatische Fraktion, enthalten im Überstand des Zentrifugats, von der Fraktion der Plasmamembranen, Kerne und Mitochondrien getrennt. Anschließend wurden die Überstände des Zentrifugats abgenommen und erneut für eine Stunde bei 4°C in einem SW27 Ausschwingrotor bei 100.000 x g zentrifugiert. Die mikrosomenhaltigen Sedimente wurden nach Abgießen des Überstandes in 70 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff konnten die Proben bis zur sich anschließenden Proteinaufarbeitung bei -80°C gelagert werden.

TES-Puffer (pH-Wert 7,4)

20 mM	Tris
1 mM	PMSF
1 mM	EDTA
254 mM	Saccharose

TE-Puffer (pH-Wert 7,4)

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

2.4.11. RNA-Isolierung

Gesamtzelluläre RNA wurde nach einer Modifikation der Methode von Chomczynski und Sacchi mittels Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des Trizol-Reagenz isoliert. (17) Zur Isolierung wurden in der Regel ca. 100 mg Gewebe, 5 bis 25 Millionen frisch isolierte Zellen oder kultivierte Zellen einer 58 mm Petrischale eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben wurden die einzelnen Isolierungsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt und ausschließlich RNase (Ribonuklease)-freie Lösungen verwendet.

Gewebematerial wurde zunächst in flüssigem Stickstoff in einer ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlten Porzellanschale mit einem Mörser zerkleinert und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt, zu dem sofort 1 ml Trizol-Reagenz gegeben wurde. Kultivierte Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz pro 58 mm Kulturschale abgeschabt und ebenfalls in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die Isolierung von RNA aus frisch isolierten AII-Zellen wurde die bei -80°C gelagerte Suspension von AII-Zellen in Trizol-Reagenz eingesetzt. Die Proben wurden zur vollständigen Lyse 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 s durchmischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben weitere 2-3 min inkubiert und danach bei 12000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere, wäßrige, RNA-enhaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Die untere phenolische Phase sowie die Zwischenphase wurden für die Proteinisolierung bei -20°C aufbewahrt. Die wäßrige Phase wurde zur RNA-Fällung mit 0,5 ml Isopropylalkohol versetzt, durchmischt und für 10 min inkubiert. Nach der sich anschließenden Zentrifugation (12000 x g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75 %igem Ethanol (in bidestilliertem Wasser) versetzt, um kontaminierende Salze herauszulösen. Die Proben wurden mittels Vortex-Mixer durchmischt und bei 10000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet für ca. 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Zur vollständigen Lösung wurden die Proben mehrmals in der Pipette aufgezogen. Um einzelsträngige RNA vorliegen zu haben, wurden die Proben bei 55-60°C für 10 min inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelagert. Im Anschluß wurde 1 µl der RNA-Lösung zur Konzentrationsbestimmung entnommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach Verdünnung der 1 µl RNA-Lösung auf 1000 µl (mit sterilem bidestilliertem Wasser) wurde die Absorption der Probe bei 260 nm gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1,0 dieser Verdünnung (1:1000) entspricht dabei 40 µg RNA pro µl RNA-Ausgangslösung. Der Quotient der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren)

zur Absorption bei 280 nm (Proteine) diene als Maß für die Reinheit der Präparation. Im Idealfall (reine RNA) ist das Verhältnis (260:280) gleich 2.

2.4.12. Agarosegelelektrophorese der isolierten RNA

Nach der Isolation wurde die RNA in horizontaler Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembranen transferiert. Unter denaturierenden Bedingungen resultiert die Auftrennung in Banden der ribosomalen RNA (rRNA) sowie der verschiedenen messenger RNA (mRNA)-Transkripte. Die spezifischen Transkripte lassen sich auf der Nylonmembran durch Hybridisierung mit ³²Phosphor-markierten Sonden und anschließender Autoradiographie sichtbar machen.

Herstellung von horizontalen denaturierenden Agarosegelen

Zur RNA-Analytik wurden 1 %ige Agarosegele eingesetzt. Dazu wurde 1 g Agarose in einem autoklavierten Gefäß eingewogen und in 90 ml 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)-Puffer unter Sieden vollständig gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 40-50°C wurden 10 ml 37 %ige Formaldehydlösung (Endkonzentration 3,7 %) zugegeben, die Lösung durchmischt und in einer Dicke von 0,5 cm in eine 14 x 11 cm große Gelkammer gegossen. Kämme und Gelkammer waren zuvor durch 30minütige Behandlung mit 50 mM NaOH und Spülen mit sterilem H₂O von RNase-Aktivität befreit worden.

MOPS-Puffer (10fach, pH 7,2):

0,2 M	MOPS
50 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA

Nach Einstellen des pH-Wertes wurde der Puffer autoklaviert. Die Gebrauchslösung wurde durch Verdünnen der Stammlösung mit autoklaviertem H₂O hergestellt.

Probenvorbereitung

Die RNA-haltigen Proben wurden zunächst auf Eis aufgetaut und entsprechend ihrem Gehalt ein 20 µg RNA enthaltendes Volumen in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Alle Proben wurden mit autoklaviertem H₂O auf gleiche Volumina gebracht und mit Probenpuffer auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 65°C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und vor dem Auftragen kurz anzentrifugiert.

Probenpuffer: Der Probenpuffer setzte sich aus 250 : 50 : 1 Volumenanteilen Formamid-Mix, Blaupuffer und Ethidiumbromid zusammen.

<u>Blaupuffer:</u>	0,005 M	Na ₂ HPO ₄
	0,4 % (w/v)	Bromphenolblau
	13,7 M	Glycerin
<u>Formamid-Mix:</u>	16,5 M	Formamid (dehydratisiert)
	13,2 % (v/v)	MOPS-Puffer (10fach)
	2,6 M	Formaldehydlösung (37 %ig)

Vor der Herstellung des Formamid-Mix wurden unter sterilen Bedingungen 50 ml Formamid 30 min mit 5 g Serdolit MB-1 (Ionenaustauscherharz) bei Raumtemperatur gerührt und abfiltriert. Alle Lösungen wurden bei -20°C gelagert. Der fertige Probenpuffer konnte 2-3 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Elektrophorese

Das Agarosegel wurde auf dem Gelkammertablett fixiert und in die Elektrophoresekammer eingehängt. Nach Überschichtung des Gels mit MOPS-Puffer wurden die Kämme vorsichtig entfernt und die Probenaschen mit 2,5 µl Probenpuffer beladen, um die Qualität der Taschen zu prüfen. Anschließend wurde die Probenauftragung vorgenommen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur unter Umwälzung des Puffers. Bis die Bromphenolblau-Färbung die Taschen verlassen hatte, wurde eine Stromstärke von 12 mA angelegt. Anschließend wurde die Stromstärke auf 40-45 mA erhöht und gleichzeitig die Umwälzung des Puffers gestartet.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die gleichmäßige Beladung der Gele mittels UV-Durchlicht überprüft. Die Fluoreszenz des in die RNA interkalierenden Ethidiumbromids ermöglicht unter UV-Licht ein Sichtbarmachen der rRNA-Banden. Vor dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde das Gel photographiert, um das Bandenmuster zu dokumentieren. Die Banden der 18 S und 28 S rRNA dienten als interne Molekulargewichtsstandards (1,9 und 4,8 kDa).

2.4.13. RNA-Transfer auf Nylonmembranen

Der Transfer der RNA aus dem Agarosegel auf Nylonfilter wurde in Anlehnung an die von Southern beschriebene auf Kapillarkräften beruhende Methode durchgeführt. (89) Dazu wurde ein Filterpapier Nr. 2668 zunächst in 5fachem SSC äquilibriert und anschließend so auf einem Plexiglastisch plaziert, dass beide Enden in das darunterliegende mit SSC (20fach) gefüllte Pufferreservoir ragten. Danach wurde auf dem Filterpapier von unten nach oben ein Filterpapier Nr. 2668, ein Filterpapier Nr. 2043, das Gel (mit den Taschen nach unten zeigend), die Nylonmembran, ein Filterpapier Nr. 2043 und wieder ein Filterpapier Nr. 2668

(jeweils in der Größe des Gels) luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Die Filterpapiere wurden vorher in SSC (5fach), die Membran in H₂O und SSC (5fach) äquilibriert. Der Aufbau wurde mit einer Lage von ca. 10-15 cm saugfähigen Papiertüchern überschichtet und mit ca. 0,7-1,5 kg beschwert. Das Pufferreservoir wurde zuvor mit Parafilm gegen ein Verdunsten der Pufferflüssigkeit abgedichtet. Die Transferzeit betrug 16-24 h.

SSC (20fach, pH 7,0): 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat

Der Puffer wurde vor Gebrauch autoklaviert.

2.4.14. Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot

Markierung von Oligonukleotiden

Zur radioaktiven Markierung der Oligonukleotide wurde mit Hilfe von T4-Polynukleotid-Kinase ³²P-ATP (Adenosin-5'-triphosphat) von [γ -³²P]ATP auf das 5'-Ende der Polynukleotide übertragen. Die Markierung der verwendeten Oligonukleotide wurde in einem Gesamtvolumen von 10 μ l durchgeführt. Der Markierungsansatz bestand aus 7,5 pmol (β -Aktin) bzw. 50 pmol (CYP2B1) Oligonukleotid, 1 μ l 10fach konzentriertem Reaktionspuffer, 5 μ l bzw. 1,85 MBq [γ -³²P]ATP (spezifische Aktivität: 222 TBq/mmol) sowie autoklaviertem H₂O ad 9 μ l. Zum Starten der Reaktion wurde 1 μ l T4-Polynukleotid-Kinase (10 I.E./ μ l) zugesetzt. Die Markierungsreaktion erfolgte für 1 h bei 37°C im Heizblock. Als Reaktionspuffer diente der mit der T4-Polynukleotidkinase gelieferte Puffer.

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden über MicroSpin Sephadex-Säulen von ungebundenem [γ -³²P]ATP abgetrennt. Dazu wurde das Säulenmaterial kurz mittels Vortex-Mixer durchmischt und die Säule nach Entfernen des unteren Verschlusses in einem Reaktionsgefäß bei 735 x g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Markierungsansatz auf die Mitte des Sephadex-Materials pipettiert und die Säule bei 735 x g für 2 min zentrifugiert. Die Radioaktivität des Eluats wurde in einem Abstand von 50 cm mit einem Radioaktivitätsmonitor ermittelt und diente als Maß für die Qualität der Markierung. Anschließend wurde dem Markierungsansatz 300 μ l Heringssperma DNA-Lösung zugesetzt.

Hybridisierung mit ³²Phosphor-markierten Sonden

Vor Beginn der Hybridisierung wurden die Nylonmembranen mit der darauf immobilisierten RNA für 2 min mit siedendem sterilen H₂O behandelt, um Salze zu entfernen. Zur

Absättigung freier Bindungsstellen wurden die Membranen für mindestens 2 h bei 37°C in 5-10 ml Prähybridisierungslösung inkubiert. Die in der Prähybridisierung und Hybridisierung verwendete Heringssperma-DNA-Lösung (10 mg/ml) wurde vor dem Gebrauch Ultraschallbehandelt, um DNA-Fragmente einer Größe von ca. 500-700 kB zu erhalten. Zusätzlich wurde die Heringssperma-DNA vor jeder Inkubation durch 5minütiges Erhitzen in siedendem H₂O und Abkühlen auf Eis denaturiert. Die Markierung der Oligonukleotid-Sonden und die Prähybridisierung wurden so vorgenommen, dass die frisch markierte Sonde sofort der Prähybridisierungslösung zupipettiert werden konnte. Anschließend wurden die Membranen für 16 h bei 38°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Membranen zur Entfernung unspezifisch gebundener Oligonukleotide unter abnehmender Ionenkonzentration des Waschpuffers von 2 x SSC / 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat) über 1 x SSC / 0,1% SDS bis zu 0,1 x SSC / 0,1% SDS bzw. zunehmender Temperatur von 37-60°C jeweils für 5 min gewaschen. Die Waschprozedur wurde beim Erreichen einer konstanten Aktivität abgebrochen. Anschließend wurden die Membranen feucht in Klarsichtfolie eingeschweißt. Zur Quantifizierung der gebundenen Radioaktivität wurden ³²Phosphor-sensitive Imaging plates für 3-48 h mit der Membran exponiert und mittels BAS-Reader die einzelnen Signale ausgewertet. Bei zu hoher Hintergrundaktivität wurden die Membranen einer erneuten Waschprozedur unterzogen. Zur autoradiographischen Darstellung wurden die Membranen auf ³²Phosphor-sensitivem Film aufgelegt und in einer Röntgenfilmkassette zwischen zwei Verstärkerfolien für 1-5 Wochen bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Filme entwickelt.

Die eingesetzten Prähybridisierungs- bzw. Hybridisierungslösungen wurden mehrfach verwendet. In diesem Fall wurde die Lösung vor Gebrauch 10 min in siedendem H₂O erhitzt, auf Eis abgekühlt und mit 200-300 µl Heringssperma-DNA-Lösung versetzt.

<u>Prähybridisierungslösung:</u>	0,9 M	NaCl
	0,09 M	Natriumcitrat
	12,5 M	Formamid (deionisiert)
	17 mM	SDS
	5 % (v/v)	Denhardts-Lösung (100fach)
	400 µg/ml	Heringssperma-DNA
<u>Denhardts-Lösung (100fach):</u>	2 %	Ficoll (MW 400000)
	2 %	Polyvinylpyrolidon

Denhardts-Lösung wurde nach dem Ansetzen in bidestilliertem H₂O durch 5 µm und 0,45 µm Filter sterilfiltriert.

2.4.15. Protein-Isolierung

Die Isolierung des zellulären Gesamtproteins wurde aus der nach der RNA-Isolation zurückbehaltenen phenolischen Phase nach Trizol-Behandlung vorgenommen. (17) Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte bei 4°C ausgeführt. Vor der Proteinisolierung wurde die ebenfalls in der Lösung enthaltene DNA durch Zugabe von 300 µl Ethanol (100 %ig) und 2-3minütiger Inkubation ausgefällt. Die Proben wurden 5 min bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand nach Überführen in ein neues Reaktionsgefäß mit 1,5 ml Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und das ausgefallene Protein 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Zur Reinigung wurde das Proteinpellet zunächst in 2 ml einer 0,3 M Guanidinhydrochloridlösung (in 95 %igem Ethanol) durch Homogenisation mit einem Glashomogenisator resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min bei 7500 x g zentrifugiert. Resuspension, Inkubation und Zentrifugation wurden zweimal wiederholt und das aufgereinigte Pellet mit 2 ml Ethanol versetzt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, mittels Vortex-Mixer durchmischt und 5 min bei 7500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet unter Vakuum vollständig getrocknet und je nach Größe in 30-150 µl 1 %igem SDS gelöst (bei unzureichender Löslichkeit wurden 5 µl 1 N NaOH zugesetzt). Die Proben wurden für 10 min bei 50°C inkubiert und durch Zentrifugation (10 min bei 7500 x g) von unlöslichen Bestandteilen gereinigt.

2.4.16. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde in Anlehnung an die Methode von Lowry et al. bestimmt. (55) Je Ansatz wurden 2-3 µl Proteinlösung eingesetzt, in einer Einmalküvette mit H₂O auf ein Volumen von 50 µl verdünnt und mit 150 µl 0,1 M NaOH auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Lowry-Gemisch. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, welches mit dem gleichen Volumen an bidestilliertem Wasser vorverdünnt worden war, hinzupipettiert, der Testansatz gut gemischt und nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur die Absorption bei 578 nm gemessen. Die Quantifizierungen wurden jeweils mittels einer

parallel bestimmten Konzentrationsreihe (0-20 µg Human- oder Rinderserumalbumin pro Ansatz) geeicht. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen.

Das Lowry-Gemisch (189 mM Na₂CO₃, 0,6 mM CuSO₄, 0,7 mM Kalium-Natriumtartrat) wurde vor der Bestimmung frisch aus den Stammlösungen 1, 2 und 3 in Volumenanteilen von 50 : 1 : 1 hergestellt:

<u>Lösung 1:</u>	189 mM	Na ₂ CO ₃
	0,1 M	NaOH
<u>Lösung 2:</u>	18 mM	CuSO ₄
<u>Lösung 3:</u>	46 mM	Kalium-Natriumtartrat

2.4.17. Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Vor dem immunologischen Nachweis im Western Blot wurden die Proteine in SDS-Polyacrylamid-Gelen in Anlehnung an die Methode von Laemmli elektrophoretisch aufgetrennt. (48) Hierfür wurde ein diskontinuierliches Vertikalelektrophoresesystem verwendet.

Herstellung von vertikalen SDS-Polyacrylamid-Minigelen

Die in der Gel Caster-Kammer gegossenen SDS-Polyacrylamid-Minigele unterteilten sich in Sammelgel (3,9 % Acrylamid) und Trenngel (10 % Acrylamid). Das Trenngel besaß eine Stärke von 1 mm und wurde in folgender Zusammensetzung hergestellt:

<u>Trenngel (10 % Acrylamid):</u>	(390 mM Tris (pH 8,8), 3,5 mM SDS, 1,03 M Acrylamid, 160 mM N,N'-Methylen-bis-acrylamid)
	1,56 ml Trenngelpuffer
	2,0 ml Acrylamidlösung
	2,44 ml H ₂ O
	6 mg Ammoniumpersulfat
	6 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<u>Trenngelpuffer (pH 8,8):</u>	1,5 M Tris
	14 mM SDS

Nach 3minütigem Entgasen im Wasserstrahlvakuum wurde durch Zusatz von N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin die radikalische Polymerisation der aus den angegebenen Volumina erstellten Lösung eingeleitet und das Trenngel gegossen. Unmittelbar anschließend wurde das Trenngel mit 0,5 %iger SDS-Lösung überschichtet, um unter Luftabschluß eine gleichmäßige Polymerisation und eine exakte Grenzschicht zu erreichen. Die Polymerisation war nach etwa 0,5 h abgeschlossen. Nach Entfernen der SDS-Lösung wurde ein 10-zähliger Kamm eingesetzt, um Probenauftragungstaschen von 10 × 5 × 1 mm

(Auftragungsvolumen bis ca. 30 µl) freizuhalten. Anschließend wurde das Sammelgel in folgender Konzentration gegossen und ebenfalls 0,5 h der Polymerisation unterzogen:

Sammelgel-3,9 % Acrylamid: (130 mM Tris (pH 6,8), 3,6 mM SDS, 0,53 M Acrylamid, 80 mM N,N'-Methylen-bis-acrylamid)

	520 µl	Sammelgelpuffer
	260 µl	Acrylamidlösung
	1,22 ml	H ₂ O
	2 mg	Ammoniumpersulfat
	2 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<u>Sammelgelpuffer (pH 6,8):</u>	0,5 M	Tris
	14 mM	SDS
<u>Acrylamidlösung:</u>	29 (w/v)	Acrylamid
	1 (w/v)	N,N'-Methylen-bis-acrylamid

Der pH-Wert des Trenn- bzw. Sammelgelpuffers wurde mit HCl eingestellt.

Probenvorbereitung

Von den Proteinproben wurde jeweils ein 10-100 µg enthaltendes Volumen abgenommen, mit 1 %iger SDS-Lösung auf ein Volumen von 10 µl gebracht und mit dem gleichen Volumen Probenpuffer (2fach) versetzt. Nach 2minütiger Denaturierung im Heizblock bei 95°C und anschließendem kurzen Anzentrifugieren wurden die Proben (20 µl Gesamtvolumen) auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5 µl (10 µg Gesamtprotein) SDS-6H (Molekulargewichtsbereich: 29-205 kDa) eingesetzt, der zuvor mit 1 %iger SDS-Lösung auf 10 µl ergänzt und ebenfalls mit 10 µl Probenpuffer (2fach) versetzt wurde.

<u>Probenpuffer (2fach, pH 6,8):</u>	119 mM	Tris
	4,76 mM	EDTA
	132 mM	SDS
	2,59 M	Glycerin
	0,0476 % (w/v)	Bromphenolblau

Der Probenpuffer wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde er mit 3 % (w/v) Dithiothreitol versetzt.

Elektrophorese

Nach der Polymerisation wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel in die Vertikalelektrophorese-Kammer überführt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Anschließend wurde der

Kamm entfernt, die Taschen nach Absaugen des Puffers auf ihre Integrität überprüft und erneut mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Nach dem Auftragen der Proben mittels Gel Saver Spitzen durchliefen die Proteine das Sammelgel bei einer Stromstärke von 10 mA. Mit dem Erreichen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die gesamte Elektrophorese wurde unter Wasserkühlung und unter Verwendung eines einheitlichen Elektrophoresepuffers für beide Elektroden durchgeführt. Die Dauer der Auftrennung betrug 2-3 h.

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

2.4.18. Proteinnachweis im Western Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine sind im Gel immunologischen Analysen schwer zugänglich. Daher wurden die Proteine nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mittels Semitrocken-Transfer-Methode unter Beibehaltung des vorhandenen Bandenmusters aus dem Gel auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen immobilisiert.

Nach Inkubation der auf der Membran präsentierten Proteine mit einem primären polyklonalen Antikörpern (aus der Ziege), wurden die resultierenden Immunkomplexe mittels eines sekundären Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörpers (Anti-Ziegen-Immunglobulin G-Antikörper) unter Verwendung des ECL (verstärkte Chemolumineszenz)-Systems nachgewiesen.

2.4.19. Semitrocken-Transfer

Der Semitrocken-Transfer wurde in Anlehnung an die von Kyhse-Andersen beschriebene Methode unter Verwendung einer Transferkammer mit Glas/Graphit-Anode und Edelstahlkathode durchgeführt. (47) Es kam ein kontinuierliches Puffersystem zum Einsatz.

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt und für 10 min in Semitrocken-Puffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zunächst in bidestilliertem Wasser und Methanol aktiviert und anschließend ebenfalls für 10 min in Semitrocken-Puffer äquilibriert. Vor dem Transfer wurden beide Elektroden der Semitrocken-Apparatur mit bidestilliertem Wasser angefeuchtet und das "Sandwich" nach kurzem Äquilibrieren der Filterpapiere in Semitrocken-Puffer wie folgt aufgeschichtet:

Kathode
3 Filterpapiere Nr. 2668
1 Filterpapier Nr. 2043

Polyacrylamidgel
PVDF-Membran
1 Filterpapier Nr. 2034
6 Filterpapiere Nr. 2668
Anode

Luftblasen wurden bei jeder Schicht mittels einer Gummiwalze entfernt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 36 mA (0,8 mA/cm²) bei Raumtemperatur.

Semitrocken-Puffer (pH 9,0): 48 mM Tris
39 mM Glycin
1,3 mM SDS
15 % (v/v) Methanol

Färbungen

Am Ende des Transfers wurde der den Molekulargewichtsstandard enthaltende Bereich von der restlichen Membran abgetrennt und für 1 min mit Ponceau-S-Protein-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde der Membranstreifen in bidestilliertem Wasser von Hintergrundfärbung befreit und die Proteinbanden markiert. Um die Effizienz und Gleichmäßigkeit des Transfers zu überprüfen, wurde das Gel für 5 min in Coomassie-Blau gefärbt und anschließend mittels Entfärber differenziert.

Coomassie-Stammlösung (7fach): 1% (w/v) Coomassie-Brillantblau R 250
5% (v/v) Methanol
3,06 M Trichloressigsäure

Die Coomassie-Gebrauchslösung wurde durch 1:7 Verdünnung mit 3,06 M Trichloressigsäure hergestellt. Beide Färbelösungen wurden vor Gebrauch filtriert.

Entfärbelösung: 10% (v/v) Methanol
7,6% (v/v) Eisessig
Ponceau-S-Färbelösung: 0,25% (w/v) Ponceau-S
40 % (v/v) Methanol
15 % (v/v) Eisessig

2.4.20. Immunochemischer Nachweis von Cytochrom P 450 Proteinen

Nach Beendigung des Transfers und Entfernung des Molekulargewichtsstandards wurde die PVDF-Membran für 12-16 h bei 4°C in Puffer A + Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbit-Monolaurat) inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln einem

weiteren Absättigungsschritt in Puffer A + Tween 20 + 5 % Magermilchpulver (1 g Fett/100 g Granulat) unterzogen. Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten ebenfalls unter leichtem horizontalem Schütteln. Die abgesättigte PVDF-Membran wurde zweimal 10 min in Puffer A + Tween 20 und dann zweimal 5 min in Puffer A gewaschen. Es folgte die Inkubation mit primärem Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Zuvor wurde die im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge und im Verhältnis zur Konzentration des sekundären Antikörpers optimale Verdünnung des primären Antikörpers bestimmt. Diese betrug sowohl für den CYP1A-, als auch für den CYP2B-spezifischen Antikörper 1:2000 (in Puffer A + Tween 20). Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, schlossen sich Waschschrte von zweimal 5 min in Puffer A, zweimal 5 min in Puffer B und zweimal 5 min in Puffer A an, bevor die Membran in mit 1:8000 in Puffer A + Tween 20 verdünntem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Vor Inkubation mit dem Peroxidasesubstrat wurde die PVDF-Membran erneut zweimal 5 min mit Puffer A, zweimal 5 min mit Puffer B und zweimal 5 min mit Puffer A gewaschen und mittels Filterpapier von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Das Peroxidasesubstrat Luminol und das Cosubstrat Wasserstoffperoxid wurden durch Mischung gleicher Volumina der fertigen Substratlösungen A und B (Bestandteile des ECL-Systems) zusammengebracht und die Membran darin genau 1 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Überschüssige Substratlösung wurde anschließend durch Filterpapier aufgenommen und die Membran in Folie eingeschweißt. Die unter enzymatischer Umsetzung der Substrate auftretende Chemolumineszenz im Bereich der gebundenen Immunkomplexe wurde durch Exposition von ECL-Filmen in einer Autoradiographiekassette bei Raumtemperatur bis zur gewünschten Filmschwärzung detektiert (wenige Sekunden bis Minuten).

<u>Puffer A (pH 7,4):</u>	10 mM	Tris
	150 mM	NaCl
<u>Puffer B (pH 7,0):</u>	150 mM	NaCl
	7 mM	SDS
	0,5 % (w/v)	Triton X-100
	0,5 % (w/v)	Rinderserumalbumin

Puffer A + Tween 20: Puffer A unter Zusatz von 0,05 % (w/v) Tween 20.

3. Ergebnisse

3.1. Alveolar Typ II Zellen in Primärkultur

Wie bereits beschrieben stellen die AII-Zellen zahlenmäßig einen nur geringen Teil der verschiedenen Zellpopulationen der Säugerylunge. Aufgrund dessen war auch die Ausbeute in der Präparation der AII-Zellen nach der oben beschriebenen Methode pro eingesetztem Tier mit im Mittel 12 Millionen Zellen pro Lunge begrenzt. Die Zellzählung erfolgte dabei nach Zelselektionierung durch differentielle Adhärenz und unmittelbar vor Ausplattierung. Bei Anfärbung mit Trypan-Blau zeigten die Zellen vor Aussaat eine Lebensfähigkeit von mehr als 90%. Die folgenden Abbildungen zeigen phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Primärkultur nach 48 und nach 72 h. Dabei ist nach 72 h deutlich die gewünschte Monolayerformation der Zellkultur zu sehen. Zum sicheren Nachweis, dass es sich bei der Zellkultur um eine reine AII-Zellkultur handelt, wurden solche Monolayer nach 72 h Kultur mit Osmiumtetroxid und Tanninsäure angefärbt. Aufgrund der Osmiophilie der in ihnen enthaltenen Hauptbestandteile des Surfactant färben sich dabei die für die AII-Zellen typischen Lamellarkörperchen schwarz an.

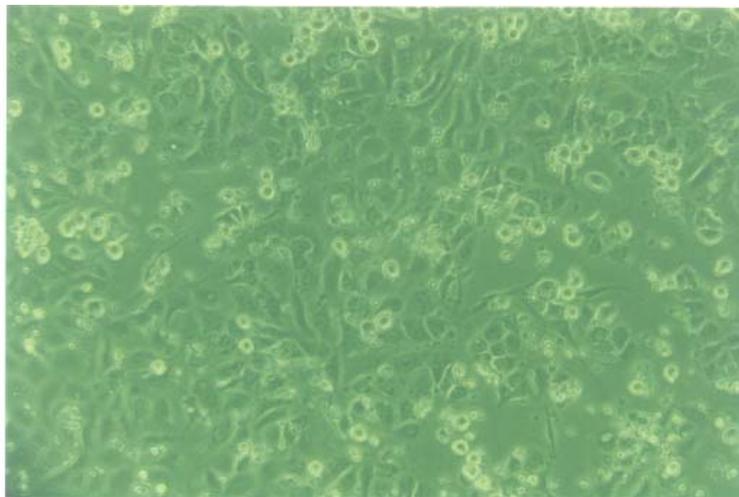


Abbildung 1

Phasenkontrastmikroskopie nativer AII-Zellen nach 48 h Primärkultur mit beginnender Monolayerformation, die Ausplattierung erfolgte wie beschrieben auf mit Kollagen beschichteten Plastikschälchen, die Zellen haben bereits ihre typische polygonale Zellform angenommen, perinukleär sind die Lamellarkörperchen erkennbar (320-fache Vergrößerung)

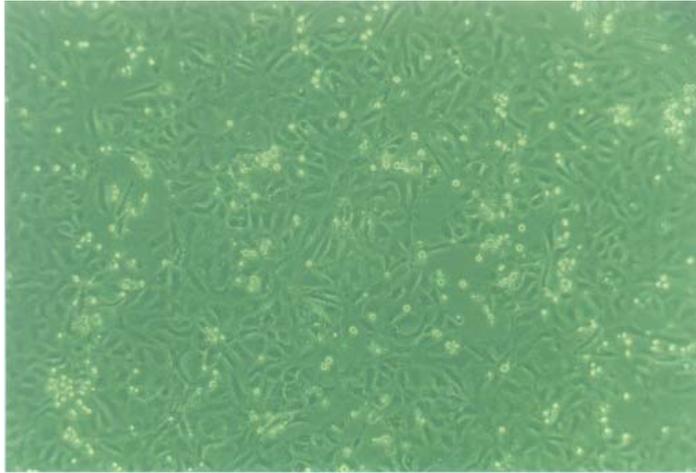


Abbildung 2

Phasenkontrastmikroskopie nativer AII-Zellen nach 72 h in Primärzellkultur unter gleichen Bedingungen wie in Abbildung 1 (100-fache Vergrößerung), der Zellrasen bildet jetzt großflächige konfluente Monolayerformationen aus, die typische AII-Zellform besteht weiterhin

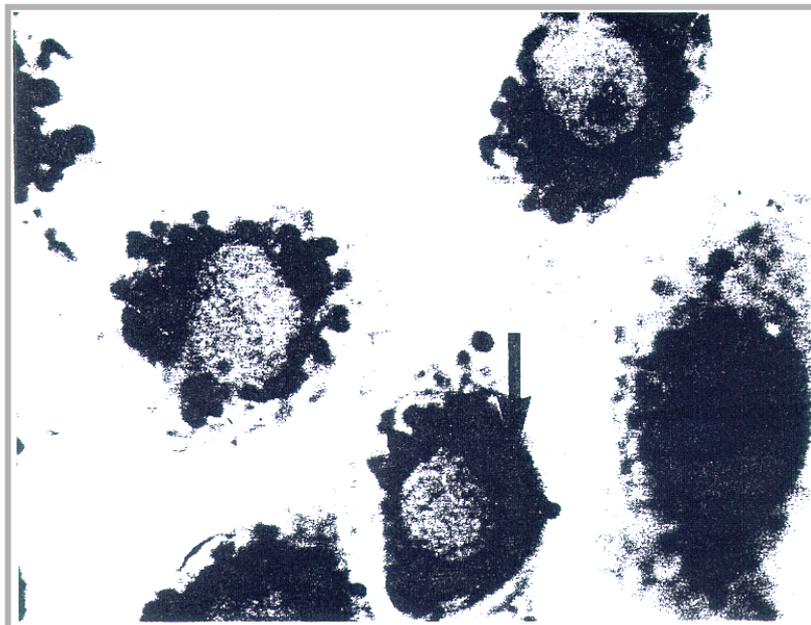


Abbildung 3

Phasenkontrastmikroskopie naiver AII-Zellen nach 72 h in Primärkultur unter gleichen Bedingungen wie in den Abbildungen 1 und 2 sowie anschließender Anfärbung mit Tanninsäure und Osmiumtetroxid, der Pfeil markiert die für AII-Zellen spezifischen Lamellarkörperchen, die sich aufgrund der Osmiophilie der in ihnen enthaltenen Surfactantbestandteile anfärben (600-fache Vergrößerung)

3.2. Cytochrom P450 Expression im Lungengewebe

Ziel des Experiments war es, zu zeigen, ob die CYP Expressionen im Lungengewebe nach der Organpräparation über einen ausreichend langen Zeitraum stabil bleiben und damit der Einsatz des Modells der Isoliert Perfundierten Lunge (IPL) für die Untersuchung ihrer metabolischen Funktion gerechtfertigt ist. Dazu wurden die Rattenlungen perfundiert, präpariert und in ca. 0,5 cm³ messende Gewebestücke geschnitten und in einfach konzentriertem PBS bei 0 °C bis zu 4h inkubiert. Die Untersuchung der CYP Expressionen erfolgte mittels Western-Blot-Analytik nach 0, 2, 3 und 4 h. Für das CYP2B1 wurde die basale Expression bestimmt, für das CYP1A1 erfolgten die Experimente nach in vivo Induktion der Tiere mit 80 mg 3-Methylcholanthren pro kg Körpergewicht gelöst in 2,66 ml/kg Erdnußöl, 48 h vor Präparation intraperitoneal appliziert. Sowohl für das CYP2B1 als auch für das CYP1A1 waren die Expressionen zu allen genannten Zeitpunkten stabil. Dabei handelt es sich also für das CYP2B1 um die konstitutive und für das CYP1A1 um die in vivo induzierte Expression.

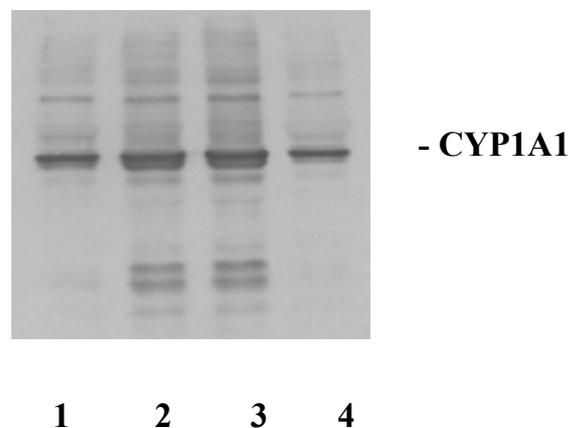


Abbildung 4

CYP1A1-Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse im Lungengewebe der Ratte nach in vivo Induktion mit 80 mg 3-Methylcholanthren pro kg Körpergewicht intraperitoneal 48 h vor Organgewinnung appliziert, die Lungenpräparation erfolgte nach vorheriger Perfusion bis zur vollständigen Blutleere (Bahn 1 unmittelbar nach Organpräparation), sowie anschließendem Bad von ca. 0,5 cm³ großen Gewebestücken in einfach konzentriertem PBS über variable Zeiträume (Bahn 2 über 2 h, Bahn 3 über 3 und Bahn 4 über 4h)

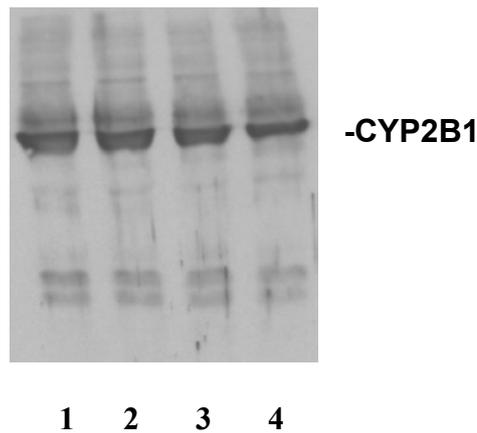


Abbildung 5

Nachweis des basalen CYP2B1-Proteins mittels Northern-Blot-Analyse im Lungengewebe der Ratte, die Lungenpräparation erfolgte nach Perfusion in situ bis zur vollständigen Blutleere (Bahn 1 unmittelbar nach Organgewinnung), sowie anschließendem Bad von ca. 0,5 cm³ großen Gewebestücken in einfach konzentriertem PBS über variable Zeiträume (Bahn 2 über 2 h, Bahn 3 über 3 und Bahn 4 über 4h)

Direkt am Modell der IPL wurde die basale Expression des CYP2E1 im Lungengewebe untersucht. Dazu wurde die Organpräparation wie beschrieben an männlichen Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 220 und 400 g durchgeführt, noch in situ erfolgte die Kanülierung der Arteria pulmonalis und des linken Atriums. Nach Organentnahme wurde die Lunge in die künstliche Thoraxkammer eingebracht und rezirkulierend mit dem nach Krebs-Henseleit adaptierten Puffer mit konstanter Fließgeschwindigkeit, wie für metabolische Studien empfohlen, von 10-12 ml pro min perfundiert. (91) Die Beatmung erfolgte im Modus der Unterdruckbeatmung (NPV - Negative Pressure Ventilation). Zur Funktionskontrolle des Organs wurden das Lungengewicht, die Compliance und das Atemzugvolumen alle 10 s kontrolliert, um insbesondere die Entwicklung eines Lungenödems erfassen zu können. Das System der IPL konnte ohne wesentliches Lungenödem 70 min aufrechterhalten werden. Anschließend wurden die Organe in gleicher Weise wie für die Untersuchung der Stabilität der CYP2B1- und CYP1A1-Expression in Gewebestücke von zirka 0,5 cm³ geschnitten und nach Proteinisolierung mittels Western-Blot-Analytik hinsichtlich der CYP2E1-Gesamtexpression untersucht. Es konnte nach siebzugminütiger Perfusion eine CYP2E1-Expression nachgewiesen werden.

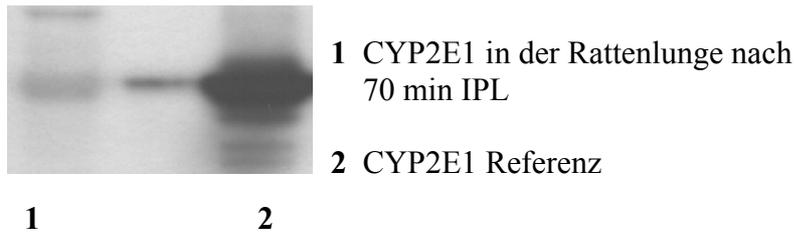


Abbildung 6

CYP2E1-Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse im Gesamtlungengewebe der Ratte nach siebzigminütiger Perfusion am System der IPL (Bahn 1) Die Stabilität des CYP2E1 über einen ausreichend langen Zeitraum rechtfertigt die Anwendung der IPL zur Durchführung weiterer Untersuchungen der metabolischen Kapazität des basalen CYP2E1 in der Rattenlunge

3.3. CYP2B1 Induktion

Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass in frisch isolierten AII-Zellen der Ratte eine relativ ausgeprägte CYP2B1-Expression nachweisbar ist, die mit zunehmender Kulturdauer jedoch rückläufig ist. Nach 72 h Kulturdauer zeigten die Zellen in der Western-Blot-Analytik keine CYP2B1 Expression mehr, in der Northern-Blot-Analytik war das Signal der CYP2B1 mRNA mit Fortdauer der Primärkultur zwar rückläufig, dennoch auch nach 72 h Kultur noch deutlich nachweisbar. (83)

Zangar et al. beschrieben eine CYP2B1-Induktion *in vitro* für Hepatozyten der Ratte durch Ciprofibrat, ein Medikament, das zur Therapie von Dyslipidämien eingesetzt wird. (94) Im folgenden Experiment sollte gezeigt werden, ob die basale CYP2B1-Expression der AII-Zellen nach *in vitro* Behandlung mittels Ciprofibrat induzierbar ist. Dazu wurden AII-Zellen nach der Zellpräparation für 24 h im herkömmlichen Kulturmedium ausplattiert. Beim Wechsel des Kulturmediums wurde der Kultur in HEPES Puffer gelöstes Ciprofibrat in einer Endkonzentration von 150 μM jeweils in der 24. und 48. h zugefügt. Die Kultur wurde nach 72 h abgebrochen. Eine Kontrollkultur aus der selben Zellpräparation wurde ebenfalls über 72 h fortgeführt, mit Wechsel des Kulturmediums in der 24. und 48. Stunde. Vergleichend wurden Hepatozyten von Wistar-Ratten nach der oben beschriebenen Methode isoliert und in Kultur gebracht. Die Kulturen wurden ebenfalls über 72 h aufrecht erhalten, Medienwechsel fanden zu den gleichen Zeitpunkten statt, neben einer unbehandelten Kontrollkultur wurden Hepatozytenkulturen mit 50 μM bzw. 150 μM Ciprofibrat im Kulturmedium in der 24. und 48. h behandelt. Nach Kulturabbruch wurde das Gesamtprotein isoliert und in der Western-Blot-Analytik hinsichtlich der CYP2B1-Expressionen untersucht. Es zeigte sich, konsistent

mit den Literaturangaben, für die Hepatozytenprimärkultur eine konzentrationsabhängige Induktion des CYP2B1. Für die AII-Primärzellkultur war in der Kontrollkultur und in der behandelten Kultur keine CYP2B1-Proteinexpression nachweisbar.

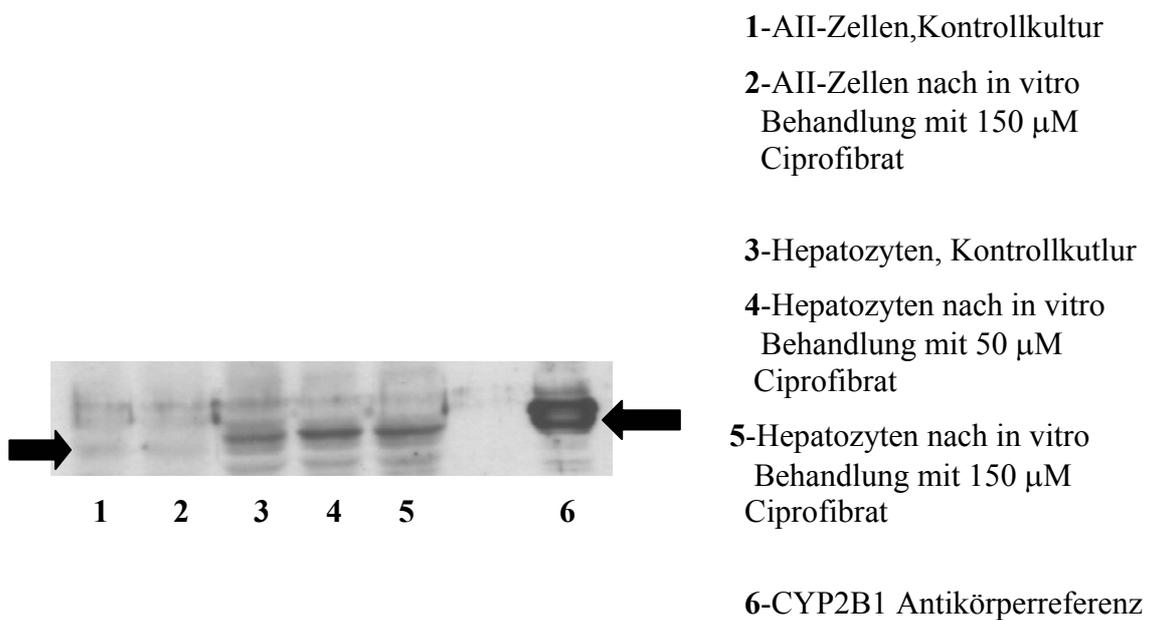


Abbildung 7a

rel.CYP 2B1-Expression in Rattenhepatozyten

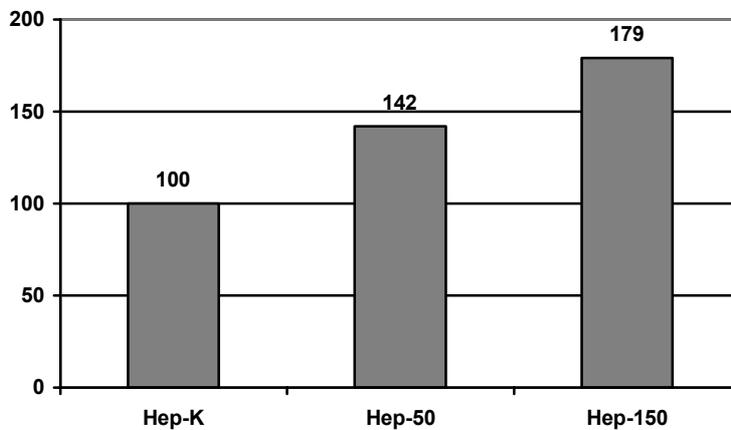


Abbildung 7b

Abbildung 7

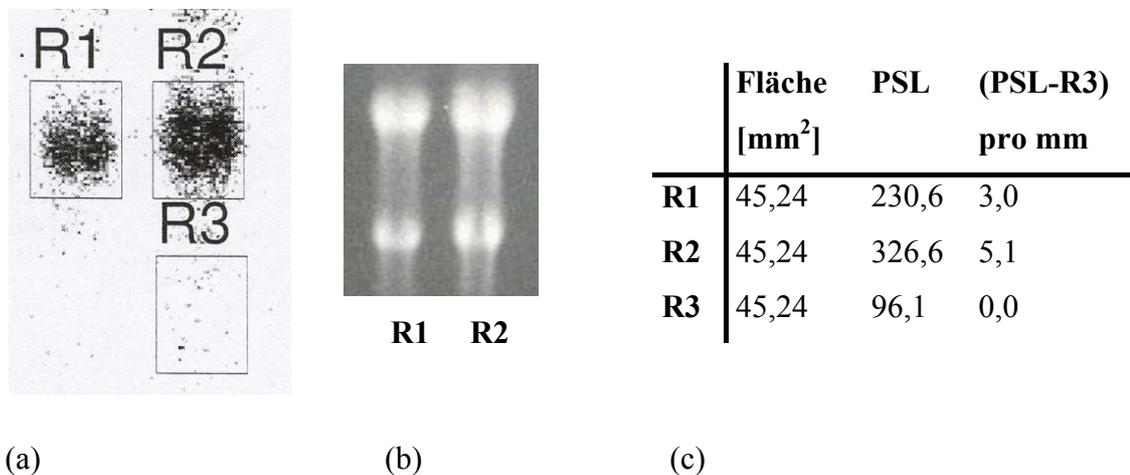
CYP2B1-Expression bestimmt durch Western-Blot-Analytik in AII-Zellen und Hepatozyten der Ratte nach 72 h in Primärkultur, naive Zellen versus Zellen nach in vitro Inkubation mit Ciprofibrat in unterschiedlichen Konzentrationen beginnend von der 24. bis zur 72. h der Primärkultur.

Abbildung 7a: für die AII-Zellen ist nach 72 h in Zellkultur sowohl unbehandelt als auch nach in vitro Behandlung mit 150 µM Ciprofibrat durch die Western-Blot-Analyse keine CYP2B1-Expression nachweisbar, während sich für die Hepatozytenkulturen nach Ciprofibratbehandlung eine Verstärkung des CYP2B1-Signals im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle darstellt

Abbildung 7b: gibt die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analyse aus 7a für die einzelnen Hepatozytenkulturen wieder, dabei wurde das Signal für die Hepatozytenkontrollkultur (Hep-K) mit 100 % festgelegt (Hep 50µM- Hepatozytenkultur nach Behandlung mit 50 µM Ciprofibrat; Hep 150µM- Hepatozyten nach Behandlung mit 150 µM Ciprofibrat) Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Induktion der CYP2B1-Proteinexpression in den Hepatozyten durch das Ciprofibrat

Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass die CYP2B1 Expression in Rattenhepatozyten in vitro durch Permethrin, ein pflanzliches Toxin, das als Insektengift verwendet wird, induzierbar ist. Das Permethrin fungiert dabei durch eine Transkriptionssteigerung. (35) Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob dieses auch für die AII-Zellen der Ratte zutreffend ist. Dazu wurden AII-Zellen, die einer gemeinsamen Zellpräparation entstammten zunächst wie beschrieben über 24 h im üblichen

Kulturmedium kultiviert. Beim Wechsel des Kulturmediums in der 24. h und der 48. h wurde der Verumgruppe jeweils in 25 µl DMSO gelöstes Permethrin in einer Endkonzentration von 100 µM zugefügt. Der Kontrollgruppe wurde zu den gleichen Zeitpunkten beim Medienwechsel jeweils 25 µl DMSO zugegeben. Die Kulturen wurden nach 72 h abgebrochen. Es erfolgte die RNA-Präparation und deren elektrophoretische Auftrennung mit anschließender Northern-Blot-Analytik hinsichtlich der CYP2B1 mRNA. Wie bereits aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt, war in der Kontrollgruppe nach 72 h Kultur der Nachweis von CYP2B1 mRNA möglich, das Signal zeigte in der Verumgruppe keinen signifikanten Unterschied, im Sinne einer Induktion oder Hemmung. (83)



R1-AII + Permethrin in DMSO
R2-AII + DMSO
R3- Hintergrundsignale

Abbildung 8

Northern-Blot-Analyse (a) mit zugehörigem Elektropherogramm (b) und quantitativer Auswertung

- (a) Northern-Blot-Analyse der CYP2B1 mRNA in AII-Zellen nach Primärkultur unter Zugabe von 100 µM Permethrin versus Kontrollkultur, dabei entspricht R1 dem Signal der Probe aus Bahn R1 in (b) -mit Permethrin behandelte Verumprobe- und R2 dem Signal zur Bahn R2 in (b) -lediglich mit DMSO behandelte Kontrolle-, R3 dient dem Abgleich möglicher Hintergrundsignale.
- (b) Elektropherogramm zur Northern-Blot-Analyse aus (a) als Behandlungskontrolle mittels Ethidiumbromidfärbung der 18S und 28S RNA, Bahn R1 entspricht der aufgetragenen Probe aus den mit 100 µM Permethrin gelöst in DMSO behandelten AII-Zellen, Bahn R2 entspricht der aufgetragenen Probe der Kontrollkultur, die lediglich mit gleichen Mengen DMSO behandelt wurde
- (c) quantitative Auswertung des Blots (a), unter Berücksichtigung von (b) kann zwischen Probe R1 und R2 kein signifikanter Signalunterschied belegt werden

3.4. Exprimierung des CYP2E1 bei AII-Zellen der Ratte in Primärkultur

Ziel der folgenden Experimente war es, zu untersuchen ob und mit welcher Stabilität die AII-Zellen der Ratte unter den oben genannten Standardkulturbedingungen das CYP2E1 exprimieren. Desweiteren sollte ein Modell zur Untersuchung CYP2E1 vermittelter Stoffwechselfvorgänge in AII-Zellen entwickelt werden.

Dazu wurden zunächst AII-Primärzellkulturen unter den oben benannten Standardbedingungen über 72 h inkubiert. Nach Kulturabbruch erfolgte die Präparation des zellulären Gesamtproteins, das anschließend in der Western-Blot-Analytik bezüglich der CYP2E1-Exprimierung untersucht wurde. Dabei konnte ein deutliches Signal für die CYP2E1-Expression detektiert werden.

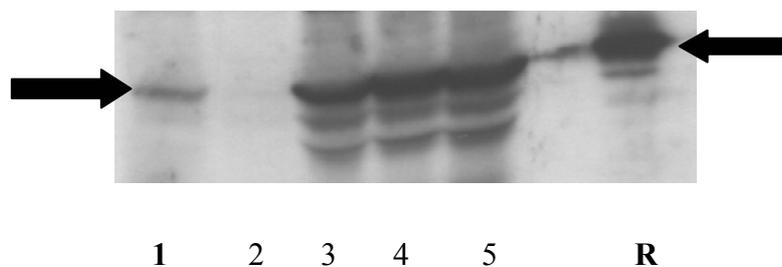


Abbildung 9

Western-Blot-Analyse der CYP2E1-Expression in unbehandelten AII-Zellen nach 72 h in Primärkultur (Bahn 1), R entspricht der CYP2E1 Antikörperreferenz (Bahn 2-6 zu anderen Versuchen gehörend), die Pfeile markieren die Laufhöhe des CYP2E1

Da die in der Western-Blot-Analytik verwandten Antikörper jedoch nicht zwischen Apo- und Holoenzym unterscheiden können, war mit dem Nachweis einer CYP2E1-Proteinexprimierung allein noch keine sichere Aussage über dessen funktionelle Wirksamkeit möglich. Einen solchen Nachweis können Untersuchungen mittels Bioassays erbringen. Dazu werden die Umsatzraten für spezifische, in diesem Fall ausschließlich CYP2E1-vermittelte Reaktionen erfasst. Die erfassten Umsatzraten können dabei direkt mit der Menge des funktionell wirksamen CYP2E1 korreliert werden. Peter et al. beschrieben 1990 erstmals den Einsatz des Muskelrelaxans Chlorzoxazon, das CYP2E1-vermittelt hydroxiliert wird, zur Bestimmung der katalytischen Aktivität des CYP2E1 an humanen Lebermikrosomenfraktionen. (66) Die quantitative Erfassung des Metaboliten 6-Hydroxy-Chlorzoxazon erfolgte durch HPLC-Analytik. Die Verwendung des Bioassays ist auch für

Zellfraktionen anderer Zelltypen in der Literatur belegt. (80) Sein direkter Einsatz in einer Primärkultur ist bisher nicht beschrieben. Da ein solcher Bioassay aber Aussagen über die Funktionsfähigkeit und Stabilität des durch Western-Blot-Analytik nachgewiesenen CYP2E1 erlauben würde, sollte die Möglichkeit seiner Anwendung für AII-Zellen in Primärkultur geprüft werden.

In Vorversuchen wurde zunächst eine Konzentration des Chlorzoxazons im Kulturmedium der AII-Primärzellkulturen ermittelt, die sich nicht hemmend auf deren Zellwachstum auswirkt und dennoch zur Generierung des Metaboliten in Konzentrationen führt, die in einem für die HPLC-Analytik messbaren Bereich liegen. Dies wurde anhand des phasenkontrastmikroskopischen Erscheinungsbildes der Zellkulturen und der Gesamtproteinmenge bei Abbruch der Kulturen nach 72 h Inkubation festgelegt. Dabei zeigte sich ein geringer Toleranzbereich, der zwischen 50 und 200 μM Chlorzoxazon im Kulturmedium liegt. Inkubationskonzentrationen, die geringer als 50 μM waren, führten nicht zu messbaren Konzentrationen von 6-OH-Chlorzoxazon.

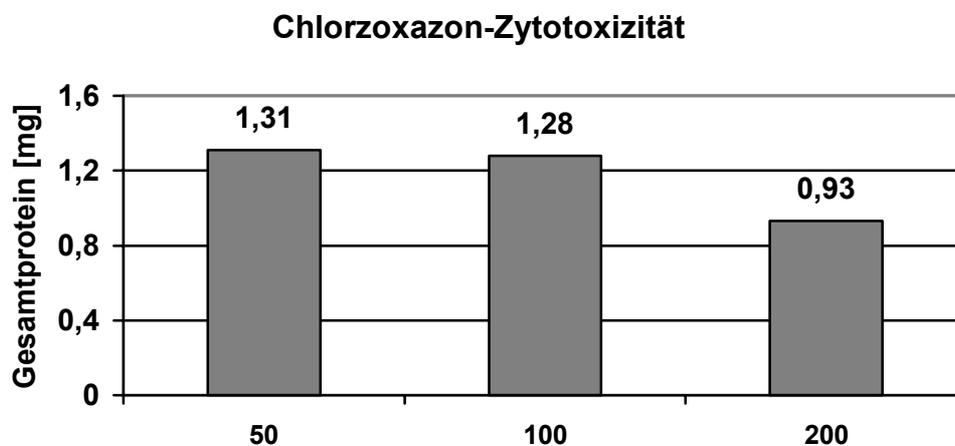


Abbildung 10

zeigt die Auswirkung der Inkubation von Alveolar-Typ II Primärzellkulturen mit Chlorzoxazon auf das Zellwachstum in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration Chlorzoxazon, bestimmt anhand des zellulären Gesamtproteins nach 72 h Inkubationszeit.

Um eine spontane Umsetzung des Chlorzoxazons zu 6-OH-Chlorzoxazon im Kulturmedium der AII-Zellkulturen ausschließen zu können, wurde als Kontrolle eine mit Kollagen beschichtete Kulturschale mit dem Kulturmedium und 500 μM Chlorzoxazon unter den

gleichen Bedingungen wie die AII-Zellen über 48 h inkubiert. In einem weiteren Kontrollversuch erfolgte die Inkubation einer nativen AII-Zellkultur unter Standardbedingungen über 48 h. In beiden Versuchen wurden die Überstände nach 24 und 48 h abgenommen. Für keine der Kontrollen war der Nachweis von spontan entstandenem 6-OH-Chlorzoxazon möglich.

Um eine Beeinflussung der CYP2E1-Expression in den AII-Zellen durch Inkubation mit dem Chlorzoxazon im Sinne einer Induktion oder Inhibierung ausschließen zu können, wurden in einem weiteren Kontrollversuch AII-Zellen als Primärkultur über 48 h mit 50 μ M Chlorzoxazon im Kulturmedium inkubiert. Die Kontrollkultur erfolgte unter Standardbedingungen ebenfalls über 48 h. Die Zellen entstammten dabei einer gemeinsamen Zellpräparation. Nach 48 h Kultur erfolgte die Gewinnung des zellulären Gesamtproteins und dessen Aufarbeitung in der Western-Blot-Analytik. Für beide Kulturen war eine CYP2E1-Expriemierung gleichen Ausmaßes nachweisbar. Eine Induktion oder Hemmung der CYP2E1-Expression durch die Inkubation der AII-Zellen mit Chlorzoxazon konnte nicht gezeigt werden.

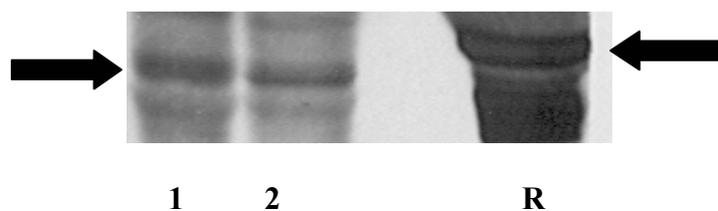


Abbildung 11

CYP2E1-Nachweis mittels Western-BlotAnalyse in AII-Zellen nach 72 h in Primärzellkultur als Vorversuch zum Einsatz des Muskelrelaxans Chlorzoxazon als Bioassay, dabei entspricht Bahn 1 der unbehandelten AII-Kontrolle, Bahn 2 der AII-Zellkultur, die von der 24. bis zur 72. h mit 50 μ M Chlorzoxazon behandelt wurden, eine Veränderung der CYP2E1-Expression ist nicht nachweisbar, R entspricht der CYP2E1-Antikörperreferenz, die Pfeile markieren die Laufhöhe des CYP2E1

Zur Durchführung des Bioassays wurde eine AII-Primärzellkultur mit 100 μ M Chlorzoxazon im Kulturmedium über 72 h inkubiert. Die Wechsel der Kulturmedien erfolgten wie üblich

nach 24 und 48 h. Zur Messung des Metaboliten 6-OH-Chlorzoxazon wurden die Überstände der Zellkultur nach 24, 48 und 72 h asserviert und zunächst in flüssigem Stickstoff schock gefroren. Bis zur weiteren Untersuchung wurden die Proben bei -70° C gelagert. Die Bestimmung der Konzentration des Metaboliten 6-OH-Chlorzoxazon erfolgte durch HPLC-Analytik am Institut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, dem BgVV. Nach Kulturabbruch wurde das zelluläre Gesamtprotein bestimmt und zur Menge des in den Überständen nachgewiesenen 6-OH-Chlorzoxazon korreliert. In Abbildung 12 sind die gefundenen Mengen generierten 6-OH-Chlorzoxazons pro mg Zellgesamtprotein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wiedergegeben. Dabei zeigt sich ein Rückgang der CYP2E1 Aktivität mit Fortdauer der Zellkultur.

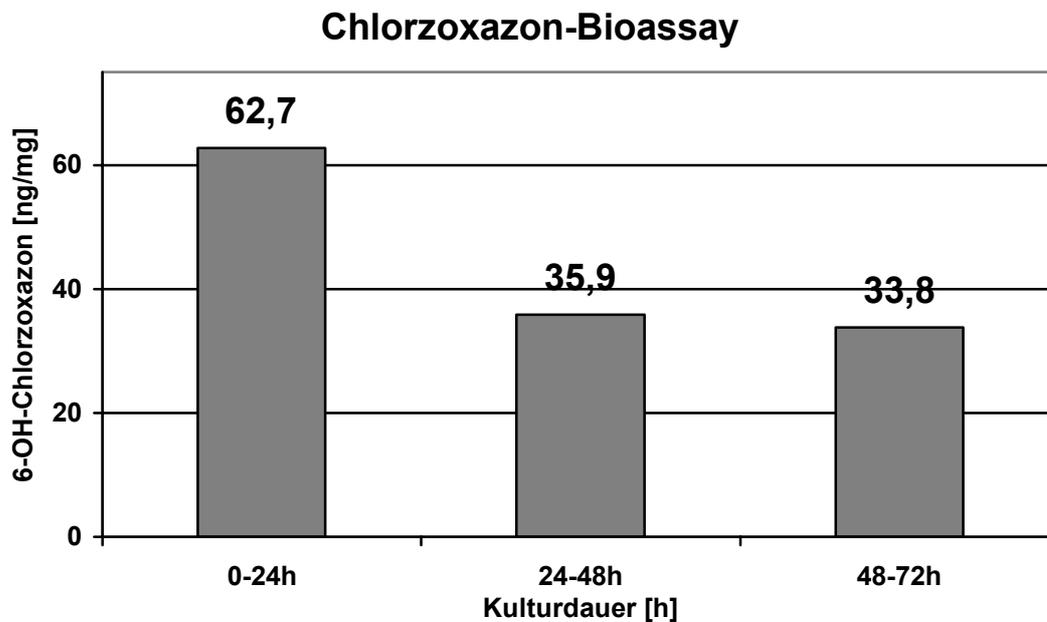


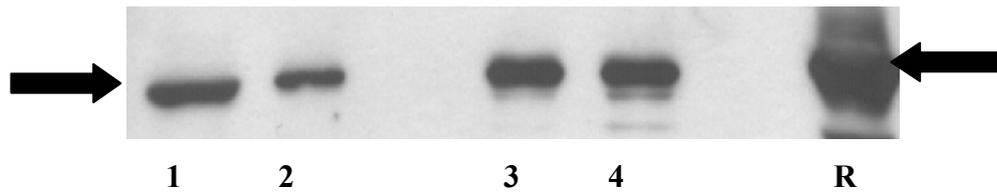
Abbildung 12

Menge des in AII-Primärzellkultur CYP 2E1-vermittelt gebildeten 6-OH-Chlorzoxazon, bestimmt im Überstand in Abhängigkeit von der Kulturdauer in einem repräsentativen Versuch, die Menge des im Überstand des Kulturmediums nachgewiesenen Metaboliten wurde dabei zum zellulären Gesamtprotein bei Kulturabbruch nach 72 h korreliert

3.5. Induzierbarkeit des CYP2E1 in der Rattenlunge versus Rattenleber

Wie bereits oben benannt, ist in der Literatur für viele Säugerarten eine Induzierbarkeit des basalen CYP2E1 verschiedener Organe durch ganz unterschiedliche Stoffgruppen beschrieben. So wurde für die Rattenhepatozyten eine Induktion der CYP2E1-Expression sowohl durch in vivo als auch in vitro Exposition gegenüber Aceton, Ethanol oder Pyridin von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen. (31, 94)

Zangar et al. beschrieben eine Verstärkung der basalen CYP2E1-Expression in primären Rattenhepatozytenkulturen durch Transkriptionssteigerung nach Inkubation mit Ciprofibrat, einem Fibrat, das zur Therapie von Dyslipidämien eingesetzt wird. (94) Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Bedeutung des CYP2E1 in der Kanzerogenese, ist eine solche Induktion durch ein zur Langzeittherapie eingesetztes Medikament von besonderem Interesse. Durch die folgenden Experimente sollte daher untersucht werden, ob die Expression des CYP2E1 in der Rattenlunge ebenfalls durch Ciprofibratexposition beeinflusst wird. Dazu wurden Wistar Ratten mit den zur Therapie der Dyslipidämien empfohlenen Tagesdosen von 200 mg Ciprofibrat pro 70 g Körpergewicht bei peroraler Einnahme behandelt. Nach Behandlung wurden Lunge und Leber der Tiere gewonnen und bezüglich der CYP2E1-Expression untersucht. Den Tieren der Verumgruppe wurden 72 h, 48 h und 24 h vor Organpräparation eine Dosis von 2,9 µg Ciprofibrat pro g Körpergewicht, gelöst in HEPES-Puffer, über eine Schlundsonde appliziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde zu den gleichen Zeitpunkten vor Präparation das entsprechende Volumen HEPES-Puffer über eine Schlundsonde verabreicht. Für beide Gruppen erfolgte die Organgewinnung in gleicher Weise. Die Lungen wurden in situ bis zur Blutleere mit einfach konzentriertem PBS gespült und in toto gewonnen. Anschließend erfolgte die Leberentnahme. Da sich, wie oben beschrieben, die Cytochrom P450-Isoformen auf zellulärer Ebene der Mikrosomenfraktion zuordnen, lassen sich Veränderungen im Expressionsmuster der CYP-Isoformen am deutlichsten bei alleiniger Untersuchung der Mikrosomenfraktionen erkennen. Die Präparation der Mikrosomenfraktion der gewonnenen Organe erfolgte nach der von Dallner et al. beschriebenen Methode. (19) Es schlossen sich elektrophoretische Auftrennung und Western-Blot-Analytik an. Dabei zeigte sich konsistent mit den von Zangar et al. in vitro an Hepatozytenprimärkulturen beschriebenen Befunden eine Induktion des CYP2E1 in der Mikrosomenfraktion der Lebergewebe der Tiere der Verumgruppe. (94) Im Gegensatz dazu fand sich in den Mikrosomenfraktionen der Lungengewebe in der Verumgruppe eine offensichtliche Inhibierung der CYP2E1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.



1-Lungengewebe d. Kontrolle
 2-Lungengewebe d. mit Ciprofibrat behandelten Tieres
 3-Lebergewebe d. Kontrolle
 4-Lebergewebe d. mit Ciprofibrat behandelten Tieres
 R-CYP2E1-Antikörperreferenz

Abbildung 13a

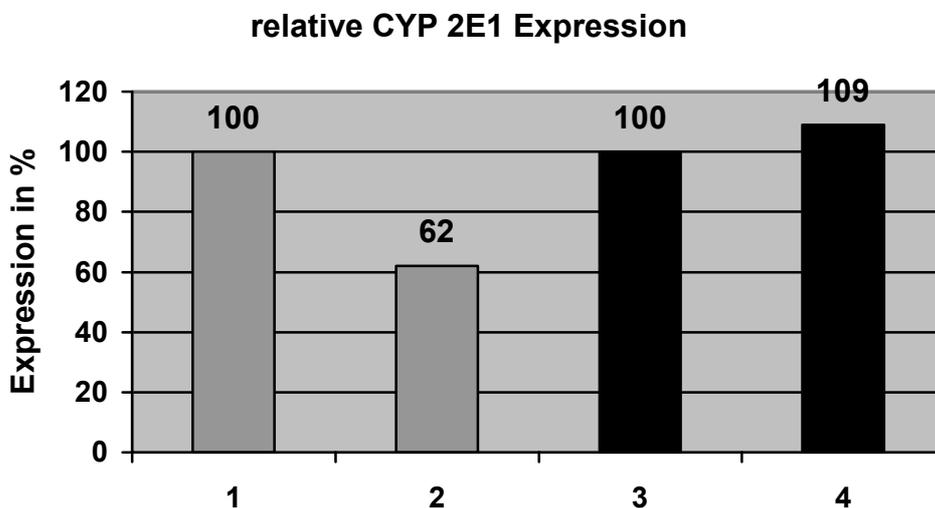


Abbildung 13b

Abbildung 13

CYP2E1-Expression untersucht durch Western-Blot-Analyse an Mikrosomenfraktionen von Lunge und Leber von Wistar-Ratten nach in vivo-Exposition mit 2,9 µg Ciprofibrat gelöst in 100 mM HEPES pro g KG 72, 48 und 24 h vor Organpräparation im Vergleich zur mit HEPES behandelten Kontrolltieren

Abbildung 13a: Western-Blot-Analyse

Bahn 1 entspricht der Mikrosomenfraktion aus dem Lungengewebe der unbehandelten Kontrolltiere, Bahn 2 der Mikrosomenfraktion aus dem Lungengewebe der mit Ciprofibrat in vivo vorbehandelten Tiere, entsprechend Bahn 3 der Lebermikrosomenfraktion der Kontrolltiere und Bahn 4 der Lebermikrosomenfraktion der behandelten Tiere, die Pfeile markieren die Laufhöhe des CYP2E1

Abbildung 13b: ist die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analyse aus Abbildung 13a, dabei wurden die Proteinexpressionen der Kontrollgruppe für das jeweilige Gewebe mit 100% angenommen, die zugeordneten Werte entsprechen den arithmetischen Mittelwerten für die Proben der Verumgruppe

3.6. Beeinflussung der CYP2E1 Expression in den AII-Zellen durch in vitro Behandlung mit Ciprofibrat

Aufgrund der gefundenen Inhibierung der CYP2E1-Expression in Rattenlungen nach einer in vivo Exposition gegenüber Ciprofibrat in therapeutischen Dosen, sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob eine Inkubation von AII-Zellen der Ratte mit Ciprofibrat einen gleichsinnigen Effekt auf die in diesen Zellen nachgewiesene basale CYP2E1-Expression ausüben würde. Zangar et al. hatten für die Induktionsversuche an primären Rattenhepatozytenkulturen bei Inkubationskonzentrationen zwischen 30 und 300 μM eine Induktion des basalen CYP2E1 mRNA in den Zellen um das bis zu Dreifache nachgewiesen. (94)

Im nachfolgend beschriebenen Experiment wurden AII-Primärzellkulturen beginnend nach 24 h Kulturdauer unter Standardbedingungen bis zum Abbruch der Kultur nach 72 h mit in HEPES gelöstem Ciprofibrat in einer Endkonzentration von 150 μM behandelt. Das Kulturmedium wurde weiterhin nach 24 und 48 h gewechselt. Eine Kontrollkultur mit AII-Zellen aus derselben Zellpräparation wurde ebenfalls über 72 h fortgeführt, mit Medienwechseln zu den oben genannten Zeitpunkten ohne weitere Zusätze. Außerdem wurden vergleichend Hepatozyten von Wistar Ratten wie oben beschrieben präpariert und in Primärkultur mit Ciprofibrat inkubiert. Die Kulturen wurden dazu ebenfalls 72 h aufrechterhalten, Medienwechsel fanden nach 24 und 48 h statt. Von der 24. bis zur 72. h wurden die Kulturen mit in HEPES gelöstem Ciprofibrat in einer Endkonzentration von 50 beziehungsweise 150 μM inkubiert. Eine Kontrollkultur wurde auch hier mit Medienwechseln zu gleichen Zeitpunkten über 24 h ohne weitere Zusätze fortgeführt. Nach Kulturabbruch erfolgte für die AII-Zell- und Hepatozytenkulturen die Präparation des zellulären Gesamtproteins und deren anschließende Aufarbeitung mittels Western-Blot-Analytik. Dabei zeigte sich für die CYP2E1-Exprimierung ein mit den oben aufgeführten in vivo Experimenten kohärentes Ergebnis; das heißt, in der AII-Zellkultur war nach in vitro Behandlung mit Ciprofibrat eine Verminderung der CYP2E1-Exprimierung feststellbar, während dessen in den Hepatozyten, übereinstimmend mit den von Zangar et al. beschriebenen Daten, nach in vitro Behandlung mit dem Fibrat eine Zunahme der CYP2E1-Expression nachgewiesen werden konnte. (94)

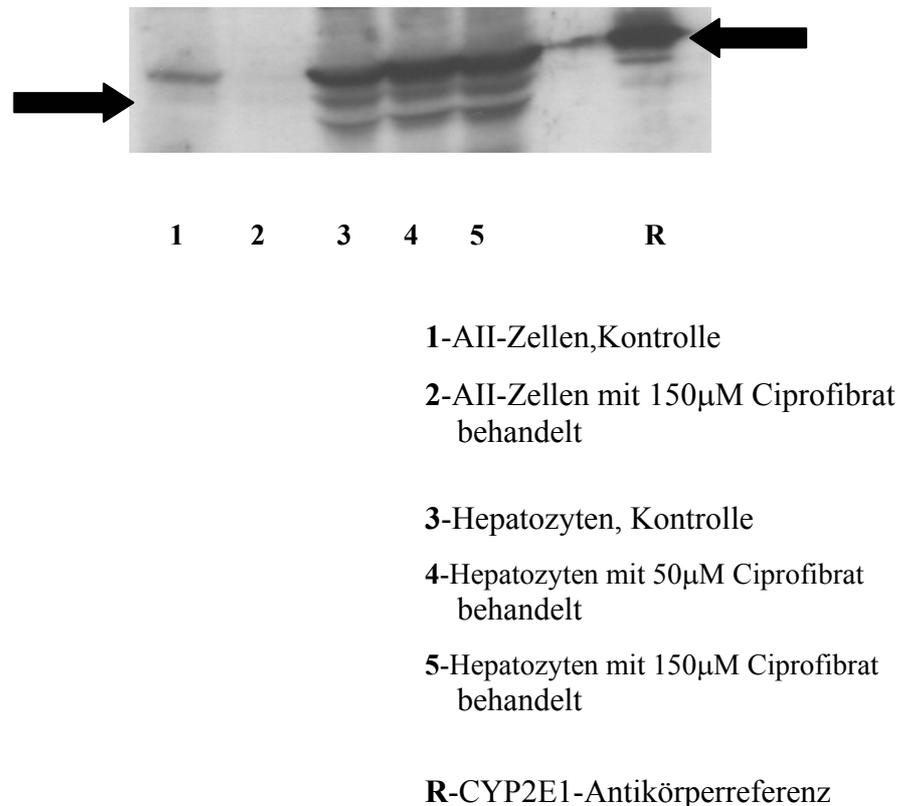


Abbildung 14

Veränderung der CYP2E1-Expression in AII-Primärzellkultur und Hepatozytenkultur unter in vitro Behandlung mit Ciprofibrat, Nachweis mittels Western-Blot-Analytik

Bahn 1 entspricht der AII-Primärzellkultur, die 72 h als Kontrolle fortgeführt wurde; Bahn 2 der AII-Primärzellkultur, die von der 24. bis zur 72. h mit 150 μM Ciprofibrat im Medium behandelt wurde; Bahn 3 der Hepatozytenkontrollkultur, die über 72 h fortgeführt wurde; Bahn 4 den mit 50 μM Ciprofibrat und Bahn 5 den mit 150 μM Ciprofibrat im Medium von der 24. bis zur 72. h behandelten Hepatozytenkulturen; R ist die CYP2E1-Antikörperreferenz. Es wird für die AII-Zellen ein vergleichsweiser Rückgang der CYP2E1-Expression gegenüber der Kontrolle sichtbar, während sich für die Hepatozyten bei den mit Ciprofibrat behandelten Kulturen eine Verstärkung des CYP2E1-Signals zeigt, das ebenfalls konzentrationsabhängig zunimmt (die Pfeile markieren die Laufhöhe des CYP2E1)

4. Diskussion

Wesentlich in der Verursachung des Lungenkrebses durch Kanzerogene, ist deren metabolische Aktivierung während der Biotransformation. Eine wichtige Rolle spielen dabei in unterschiedlicher Weise die Isoformen des Cytochroms P 450. So sind die wichtigsten Kanzerogene des Zigarettenrauches, die Nitrosamine bzw. das Benzo(a)pyren, Substrate des CYP2E1 bzw. CYP1A1 und 2B1. (52, 79)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten einerseits verschiedene experimentelle Ansätze hinsichtlich ihrer Praktikabilität in der Untersuchung einzelner Cytochrom P 450 Isoformen und andererseits einzelne in der Genese des Lungenkrebses als wichtig erachtete Cytochrom P 450 Isoformen bezüglich ihrer Veränderlichkeit durch exogene Einflüsse geprüft werden. Zunächst sollen im Folgenden kurz die genutzten experimentellen Modelle und ihre Bedeutung in der Untersuchung metabolischer Zusammenhänge erläutert werden.

4.1. Alveolar Typ II-Primärzellkultur

Da die Säugerlunge ein Organsystem aus bis zu 40 verschiedenen Zellpopulationen darstellt, ergeben experimentelle Untersuchungen am Gesamtorgan keine differenzierten Ergebnisse über die metabolische Kompetenz der einzelnen Zelltypen. (49) Die Expression der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme ist unter den verschiedenen pulmonalen Zellpopulationen sehr heterogen aufgeteilt, nur für wenige von ihnen ist eine Aktivität zur Biotransformation von Xenobiotika nachgewiesen. (5) Bei Untersuchungen am Lungengewebe unter der Prämisse, dass es sich zellulär relativ homogen zusammensetzt, würde das metabolische Potential einzelner kompetenter Zellformen nicht ausreichend wahrgenommen.

Wie bereits dargelegt, wird die Empfindlichkeit eines Zelltyps gegenüber krebsfördernden Einflüssen wesentlich durch dessen metabolische Kompetenz bestimmt. So zeigten verschiedene Untersuchungen, dass chemisch verursachte Lungenschädigungen in hohem Maße fokal auf das Organ verteilt sind, ein Zusammenhang zur zellulären Cytochrom P 450 Verteilung wurde postuliert. (49) Die Alveolar Typ II-Zellen spielen neben den Clara-Zellen eine besondere Rolle im Fremdstoffwechsel der Lunge. (29) Aus entarteten Alveolar Typ II-Zellen leitet sich das bronchioloalveoläre Adenokarzinom ab. (72) Da der Anteil des Adenokarzinoms an den malignen Erkrankungen der Lunge in den letzten Jahrzehnten dramatisch zugenommen hat, sind Untersuchungen hinsichtlich der metabolischen Kompetenz der Alveolar Typ II-Zellen von besonderem Interesse. (52)

Mit dem experimentellen Modell der Primärzellkultur aus isolierten Alveolar Typ II-Zellen der Ratte war in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit gegeben, die Zellpopulation gezielt zu untersuchen und damit ihren Anteil am Fremdstoffwechsel der Lunge zu erfassen. Gegenüber immortalisierten Zellen einer Dauerkultur bietet die Primärzellkultur den Vorteil der wesentlich geringeren Entdifferenzierung der Zellen und damit einer besseren Übertragbarkeit von Ergebnissen auf die tatsächliche in vivo Situation. Im Vergleich zu Zellkulturen in Suspension bot das genutzte Modell den Vorteil, dass die Alveolar Typ II-Zellen unter nahezu physiologischen Bedingungen wuchsen, die eine apikal-basale Ausrichtung der Zellen ermöglichten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch Nutzung der Primärzellkultur die Expression einzelner Cytochrom P 450 Isoformen in den Alveolar Typ II-Zellen untersucht, darüberhinaus wurde ein Modell zur Untersuchung der funktionellen Aktivität des CYP2E1 an dieser Alveolar Typ II-Primärzellkultur etabliert. Der verwandte Bioassay, der auf der CYP2E1 abhängigen Hydroxylierung des Muskelrelaxans Chlorzoxazon beruht, war bisher nur für Nutzung an Mikrosomenzellfraktionen und für in vivo Versuche in der Literatur belegt. (66)

Limitierend auf die Nutzung der Alveolar Typ II-Primärzellkultur wirkte sich einerseits die sehr geringe Zellausbeute je Präparation, andererseits die mit Kulturdauer zunehmende Dedifferenzierung der Alveolar Typ II-Zellen zu Alveolar Typ I Zellen aus. So konnten je Versuch nur wenige Bedingungen getestet werden, und bei einer Kulturdauer über 72 h war nicht mehr von einer reinen Alveolar Typ II-Primärzellkultur auszugehen.

4.2. Die Isoliert perfundierte Lunge (IPL)

Die IPL ist ein experimentelles Modell, das Untersuchungen an der Lunge als intaktes Organ mit seinen physiologischen interzellulären Kontakten und Matrices erlaubt. Der Vorteil gegenüber Zellkulturmodellen liegt insbesondere darin, dass interzelluläre Regelmechanismen der in vivo Situation entsprechen, da die Organstruktur erhalten bleibt. Die IPL ist eine sinnvolle Ergänzung zwischen in vitro Versuchen und Ganztierversuchen. Der Vorteil gegenüber einem reinem in vivo Versuch ist dabei die Möglichkeit, das Organ isoliert betrachten und damit die tatsächliche metabolische Kapazität der Lunge untersuchen zu können. Andererseits lassen sich bestimmte physiologische Parameter regulieren, so beispielsweise Perfusionsgeschwindigkeit, Atemzugvolumen und Beatmungsdruck. Durch kontinuierliche Überwachung anderer Parameter, wie Resistance, Compliance und Ödemformation, läßt sich der pulmonale Respons auf bestimmte Reize unmittelbar erfassen.

Zeitlich wird der Einsatz der IPL durch eine limitierte Viabilität des Systems, insbesondere bedingt durch Ausbildung eines Lungenödems, begrenzt. Experimente von bis zu 8 h Dauer wurden beschrieben. (91)

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Western Blot Analytik eine stabile CYP2B1- und 1A1-Proteinexpression an bis zu 4 h in PBS gespülten Gewebstücken aus Rattenlungen nachgewiesen werden. Die Lungen waren hierfür entsprechend der Organpräparation für den Einsatz der IPL gewonnen worden.

Die CYP2B1 Expression war dabei der Basalexpression, die Expression des CYP1A1 der Expression nach in vivo Induktion mit Methylcholanthren gleich zu setzen. Für beide Cytochrom-Isoformen entsprach das Expressionsmuster also unter den genannten Bedingungen 4 h lang der Situation in der Rattenlunge bei Organgewinnung. Diese Dauer der Stabilität würde den Einsatz der IPL zur Durchführung metabolischer Experimente, beispielsweise mit Substraten beider Cytochrom-Isoformen, rechtfertigen.

In Versuchen direkt am Modell der IPL konnte in der vorliegenden Arbeit eine basale CYP2E1-Proteinexpression des Lungengewebes von Ratten in der Western Blot Analytik gezeigt werden, die nach siebzigminütiger Aufrechterhaltung der IPL der basalen Expression unmittelbar nach Organpräparation entsprach.

Es konnte damit gezeigt werden, dass nach Präparation von Rattenlungen die Expressionen der Cytochrom-Isoformen CYP1A1, 2B1 und 2E1 unter den Arbeitsbedingungen der IPL über einen ausreichend langen Zeitraum stabil sind und somit das experimentelle Modell der IPL eine sinnvolle Option für Metabolisierungsversuche mit Substraten der genannten Cytochrom-Isoformen ist. Dies würde den Nachweis ermöglichen inwiefern die Lunge selbst zur Generierung reaktiver Metabolite verschiedener Kanzerogene beiträgt und welche Unterschiede zwischen inhalativer und systemischer Schadstoffbelastung bestehen.

4.3. In vivo Induktionsversuche

Trotz Nutzung anderer experimenteller Ansätze, wie der Zellkultur, kann auf die Durchführung von Ganztierversuchen in der Toxikologie nicht vollständig verzichtet werden, da die experimentelle Nachempfindung aller physiologischen Bedingungen nicht gelingen kann.

Insbesondere für metabolische Untersuchungen differieren die Ergebnisse bei isolierter Betrachtung eines Zelltypes aber auch eines isolierten Organs oft erheblich von denen bei Untersuchung des Gesamtorganismus. So unterliegt die Lunge beispielsweise einer

zentralnervösen Regulation, deren Entkopplung Auswirkungen auf Perfusion, Compliance und Resistance zeitigt. Die Lunge ist aufgrund ihrer Position im Säugerkreislauf bei peroraler Fremdstoffbelastung der Leber stets nachgeschaltet, so dass Schadstoffe nach Resorption aus dem Darmlumen zunächst das Gefäßsystem der Leber passieren und dort teilweise entgiftet werden, während andere die Lunge auch bei systemischer Belastung targetieren und dort einem first-pass-Effekt unterliegen.

Nicht nur aufgrund ihrer Positionen im Blutkreislauf stehen Lunge und Leber als Organe mit ausgeprägter Wechselwirkung aufeinander in einem engen Zusammenhang. Die Leber ist das Organ mit dem höchsten Gehalt an Cytochrom P 450. Dabei unterliegt die Expression einzelner Cytochrom-Isoformen in der Leber teilweise anderen Regulationen als in der Lunge. So führt beispielsweise die Behandlung mit Phenobarbital in der Leber bei Nagetieren zu einer Induktion der CYP2B1 Expression, während seine Expression in der Lunge unverändert bleibt. (36)

Die Suszeptibilität der Lunge gegenüber den schädigenden Einflüssen durch Kanzerogene hängt in hohem Maße vom Verhältnis zwischen pulmonaler und extrapulmonaler Cytochromexpression, das bedeutet insbesondere von dem Verhältnis zwischen pulmonalen und hepatischen Cytochromen, ab. So führt beispielsweise der Inhaltsstoff aus Kreuzblütengewächsen, das Indol-3-Karbinol, bei Verabreichung mit der Nahrung zu einer Induktion des hepatischen CYP1A1, ohne seine pulmonale Expression zu verändern. Damit kommt es zu einer gesteigerten extrapulmonalen Elimination polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und somit zu einer Protektion der Lunge vor den kanzerogenen Einflüssen ihrer reaktiven Metabolite. (29)

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten in vivo Behandlungen von Wistar-Ratten mit Ciprofibrat in therapeutischen Dosen zeigten einen ähnlich gegensinnigen Effekt auf die hepatische und pulmonale Proteinexpression des CYP2E1. Wie die Western Blot Analytik der Mikrosomenfraktionen von Lunge und Leber der behandelten Tiere erwies, war die CYP2E1-Proteinnachweis in der Lunge im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigt, wohingegen er in den Lebermikrosomen vergleichsweise höher war. Aus den gefundenen Ergebnissen lassen sich theoretische Ansätze für eine medikamentöse Langzeitprophylaxe beispielsweise in besonders gefährdeten Populationen ableiten. Denn durch Verschiebung des Verhältnisses zwischen den CYP2E1-Proteinexpressionen in Leber und Lunge zugunsten der Leber würde eine geringere pulmonale Belastung mit den toxischen Metaboliten der Nitrosamine folgen.

Mit den in der vorliegenden Arbeit genutzten experimentellen Modellen wurden Untersuchungen zur Cytochrom P 450 Expression in der Lunge auf ganz unterschiedlichen Ebenen vorgenommen. Dabei kamen Bedeutung aber auch Grenzen der einzelnen Modelle, sowie ihre gegenseitige sinnvolle Ergänzung bei der Bestimmung des Fremdstoffmetabolismus der Lunge zu Tage.

4.4. Induzierbarkeit des CYP2B1 in Alveolar Typ II-Primärzellkultur

Das CYP2B1 ist die Isoform der 2B-Subfamilie, die vorherrschend in Nagelungen exprimiert wird. (36) Die in der vorliegenden Arbeit zur Western Blot Analytik verwandten primären Antikörper können zwischen den beiden Isoformen CYP2B1 und CYP2B2 nicht differenzieren. Da jedoch das CYP2B1 exklusiv in Nagel Lebern exprimiert wird, kann bei den vorliegenden Ergebnissen von einer ausschließlichen Erfassung des CYP2B1-Proteins in der Pneumozytenkultur ausgegangen werden. Dennoch sollen die Ergebnisse der Western Blot Analytik hier auch lediglich der 2B-Subfamilie zugeordnet werden.

Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, Schrader et al., war bekannt, dass das CYP2B-Protein in frisch gewonnenen Alveolar Typ II-Zellen der Ratte nachweisbar ist, mit zunehmender Kulturdauer in Primärkulturen jedoch in seiner Proteinexpression stark rückläufig ist, so dass nach 72 h Inkubation kein Proteinnachweis mehr möglich ist. (83) In der vorliegenden Arbeit wurden 2 verschiedene Substanzklassen, das Ciprofibrat und das Permethrin, hinsichtlich ihrer induktiven Wirkung auf die pulmonale CYP2B Expressierung untersucht. Bei dem Ciprofibrat war aus der Literatur bekannt, dass es bei in vitro Behandlung von Rattenhepatozyten zu einer Induktion sowohl der CYP2B1 mRNA als auch des Proteins führt. (94) Auf die Proteinexprimierung des pulmonalen CYP2B konnte in der vorliegenden Arbeit solch ein induktiver Effekt in der Western Blot Analytik nicht nachgewiesen werden. Sowohl für die Verum- als auch für die Kontrollgruppe war nach 72 h Kulturdauer kein CYP2B-Protein in der Western Blot Analytik nachweisbar. In der vergleichend durchgeführten in vitro Behandlung von Hepatozyten-Primärkulturen zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine CYP2B-Proteininduktion, deren Ausprägung von der eingesetzten Ciprofibratkonzentration abhängig war.

Bei dem Permethrin handelt es sich um ein Pyrethroid, das verbreitete Anwendung als Insektizid findet, da es sich durch eine gute insektizide Wirksamkeit bei vergleichsweise niedriger Toxizität für Mammalia auszeichnet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es bei Ratten bei in vivo Exposition in hohen Dosen zu einer Vermehrung des Cytochrom P 450-

Gesamtgehalts kommt. (14) Es wird dabei den Phenobarbital-ähnlichen Induktoren zugeordnet, d.h. die Induktion erfolgt durch eine gesteigerte Transkription. (65) A. Heder et al. konnten bei in vitro Behandlung von primären Rattenhepatozytenkulturen mit Permethrin eine Induktion der CYP2B1-mRNA zeigen, dabei erschien ebenfalls eine gesteigerte Transkriptionsrate ursächlich. Die Induktion des CYP2B1 war direkt abhängig von der eingesetzten Permethrinkonzentration. (35) In der vorliegenden Arbeit sollte anhand dieser für Hepatozyten gefundenen Daten überprüft werden, ob in den Alveolar Typ II-Zellen ein gleichsinniger Effekt auf die CYP2B1 Transkription nachweisbar ist. Trotz Behandlung der Alveolar Typ II-Zellen mit der maximal möglichen Konzentration von 100 µM Permethrin im Kulturmedium war im Vergleich zur Kontrolle mittels Northern Blot Analytik keine Induktion der CYP2B1-mRNA in den Lungenzellen detektierbar.

Mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substraten, für die beide bei in vitro Behandlung von Rattenhepatozyten eine CYP2B1 Induktion bekannt war, konnte demzufolge keine Beeinflussung des CYP2B1 in Alveolar Typ II-Zellen in gleicher Weise der Ratte in Primärkultur nachgewiesen werden.

4.5. CYP2E1 Expression in der Rattenlunge und in A II-Primärzellkultur

Die postulierte besondere Bedeutung des CYP2E1 in der pulmonalen Kanzerogenese ist durch das Substratspektrum dieser Cytochrom-Isoform bedingt. So spielt das CYP2E1 eine wesentliche Rolle in der metabolischen Aktivierung der Nitrosamine, die neben den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen die wichtigsten Kanzerogene des Zigarettenrauches sind. (29) In Untersuchungen an humanen Populationen mit nachgewiesenen CYP2E1 Polymorphismen konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation zwischen dem CYP2E1 und dem pulmonalen Adenokarzinom besteht sowie dass die Nitrosamine in einem ursächlichen Zusammenhang mit der im Vergleich zum bronchialen Plattenepithelkarzinom zunehmenden Inzidenz des Adenokarzinoms zu sehen sind. (52) Dabei leitet sich das bronchiolo-alveoläre Adenokarzinom aus entarteten Alveolar Typ II-Zellen ab. (72) Das bedeutet, dass die pulmonale Expression des CYP2E1 für die Entstehung des Lungenkrebses von großer Bedeutung ist und dass den Alveolar Typ II-Zellen ein besonderer Stellenwert zukommt. Bei dem Ciprofibrat handelt es sich um ein Medikament gegen Dyslipidämien, von dem aus der Literatur bekannt war, dass es bei in vitro Exposition von Rattenhepatozyten eine Induktion der CYP2E1 Expression bewirkte. (94) Nach in vivo Behandlung von Wistar Ratten mit Ciprofibrat in therapeutischen Dosen konnte in der

vorliegenden Arbeit eine relative Zunahme der hepatischen CYP2E1-Proteinexpression und eine Abnahme der pulmonalen CYP2E1-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren gezeigt werden. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass eine Behandlung mit Ciprofibrat zu einer Protektion der Lunge gegenüber den kanzerogenen Einflüssen der CYP2E1 Substrate wie beispielsweise der Nitrosamine haben könnte, indem durch Verschiebung des Verhältnisses zwischen pulmonaler und hepatischer CYP2E1 Expression zugunsten der hepatischen Expression die Generierung der reaktiven Metabolite vermehrt in der Leber stattfindet. Die konstitutive Expression des CYP2E1 in der Mammalianlunge ist in der Literatur vielfach belegt. (24, 26, 31, 49) Dabei ist die Expression auf die einzelnen pulmonalen Zellformen heterogen verteilt. Aufgrund des postulierten Zusammenhangs zwischen dem durch Nitrosamine verursachten pulmonalen Adenokarzinom und den Alveolar Typ II-Zellen sollte ferner eine mögliche Beeinflussung der CYP2E1-Proteinexpression dieser Pneumozytenform durch eine Ciprofibratbehandlung untersucht werden.

Dazu musste in der vorliegenden Arbeit zunächst die konstitutive Proteinexpression der Cytochrom P 450 Isoform in den Alveolar Typ II-Zellen in der genutzten Primärkultur bestimmt werden. In der Western Blot Analytik des zellulären Gesamtproteins war bei 72 h in Kultur befindlichen Alveolar Typ II-Zellen ein CYP2E1-Proteinnachweis möglich. Um Aussagen über die funktionelle Wirksamkeit des gefundenen Proteins machen zu können, wurde ein in adhärenter Zellkultur einsetzbarer Bioassay etabliert. Die als CYP2E1 spezifisch bekannte Hydroxylierung des Muskelrelaxans Chlorzoxazon, die in vivo und an Zellfraktionen bereits als Bioassay für die Bestimmung CYP2E1 Aktivitäten eingesetzt war, wurde dazu bei der Alveolar Typ II-Primärzellkultur genutzt. (66)

Dabei zeichnete sich ein Wirkungsmaximum des CYP2E1 in den Alveolar Typ II-Zellen innerhalb der ersten 24 h in Kultur ab. Mit dem etablierten Bioassay steht ein Mittel zur weiteren Untersuchung des CYP2E1 in den Alveolar Typ II-Zellen bzw. der Beeinflussbarkeit seiner Aktivität durch mögliche Induktoren zur Verfügung.

Aufgrund der gefundenen Verminderung der pulmonalen CYP2E1-Proteinexpression nach in vivo Behandlung von Wistar Ratten mit Ciprofibrat sollte untersucht werden, wie die CYP2E1 Expression in der Alveolar Typ II-Primärzellkultur bei in vitro Exposition gegenüber dem Medikament verändert wird. Die verwandten Dosen entsprachen dabei den

von Zangar et al. genutzten Mengen des Medikaments, die zu einer Induktion des CYP2E1-Proteins bei in vitro Behandlung von Hepatozyten geführt hatten. (94)

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die in vitro Behandlung von Alveolar Typ II-Zellen mit Ciprofibrat eine Verminderung der CYP2E1 Proteinexpression zur Folge hat. Vergleichend wurden Rattenhepatozyten in Primärkultur in gleicher Weise mit Ciprofibrat behandelt. Wie in der Literatur belegt, führte hier das Medikament zu einer Hochregulierung des CYP2E1-Proteins im Vergleich zu den unbehandelten Hepatozytenkulturen.

Es konnte also gezeigt werden, dass sich die CYP2E1-Proteinexpression in Alveolar Typ II-Primärzellkultur unter Behandlung mit Ciprofibrat gleichsinnig wie die Proteinexpression des CYP2E1 im Gesamtorgan verändert. Dies erlaubt den Rückschluss, dass die Verminderung der CYP2E1-Proteins der Lunge unter Behandlung mit dem Medikament insbesondere auf eine Herunterregulierung der CYP2E1-Proteinexpression in den Alveolar Typ II-Zellen zurückzuführen ist. Aufgrund des bereits ausgeführten Zusammenhangs zwischen den Alveolar Typ II-Zellen und den Nitrosaminen als CYP2E1-Substrate bei der Pathogenese des Adenokarzinoms der Lunge würden diese Befunde eine mögliche Protektion des Organs gegenüber deren kanzerogener Wirkung implizieren. Gestützt wird dieser theoretische Ansatz außerdem durch dies zusätzlich gezeigte induktive Wirkung auf die CYP2E1-Proteinexpression in der Rattenleber bzw. in Rattenhepatozyten in Primärkultur. Dabei ist es von Vorteil, dass es sich bei dem Ciprofibrat um ein nebenwirkungsarmes Medikament handelt, mit dem bereits umfassende klinische Erfahrungen gemacht wurden und das sich zur Langzeittherapie eignet. Natürlich müssen zunächst die für die Rattenlunge gefundenen Ergebnisse für den menschlichen Organismus geprüft werden, da sich eine Extrapolierung der Befunde zwischen unterschiedlichen Arten aufgrund der speziesspezifischen Cytochrom P-450 Verteilung hier verbietet.

5. Zusammenfassung

Der Lungenkrebs zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. Die Untersuchung der pathophysiologischen Zusammenhänge auf subzellulärer Ebene in seiner Ätiologie ist von wesentlicher Bedeutung bei der Suche nach Ansätzen für eine effiziente Prophylaxe.

Die Exposition gegenüber zivilisatorisch bedingten Schadstoffen wird heute in den meisten Erkrankungsfällen als Auslöser, zumindest aber als wichtiger Kofaktor in der Pathogenese angesehen. So sind 90 % aller Lungenkrebsfälle des Mannes und 60 % der Erkrankungsfälle der Frau auf das Rauchen zurückzuführen. (59, 85)

Als wesentlich für die Krebsentstehung werden solche Kanzerogene im Zigarettenrauch wie die Nitrosamine und die polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe erachtet. Offensichtlich erfolgt die Schädigung der Lunge durch die Rauchinhaltsstoffe nicht unmittelbar bei der Inhalation, sondern die Schadstoffe zirkulieren zunächst im Blutkreislauf und werden durch die Lunge vom Blut her aufgenommen. Wesentlich ist die metabolische Aktivierung der Kanzerogene durch die Enzyme der Biotransformation. Hierbei wichtig ist die Rolle der Isoformen des Cytochroms P 450. (18, 29, 90, 92) So werden die Nitrosamine durch das CYP2E1 und das zu den polyzyklischen Kohlenwasserstoffen gehörige Benzo(a)pyren durch das CYP1A1 und 2B1 metabolisiert. (30, 31) Geno- und phänotypische Polymorphismen des Menschen sowohl des CYP2E1 als auch des CYP1A1 werden als Risiken für eine höhere Suszeptibilität gegenüber Lungenkrebs angesehen. (52, 79)

Aus den genannten Gründen bleibt die Untersuchung der Expression der Isoformen des Cytochrom P 450 in der Lunge sowie deren Veränderlichkeit im Sinne einer Induktion oder Hemmung durch Xenobiotika von großem Interesse für das Verständnis der Kanzerogenese in diesem Organ.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in der pulmonalen Kanzerogenese wichtigen Cytochrom P 450 Isoformen an Wistar-Ratten zu untersuchen. Dabei wurden verschiedene experimentelle Modelle genutzt. So wurden, neben Ganztiersversuchen, Experimente am Modell der Isoliert Perfundierten Lunge vorgenommen. Es wurde gezeigt, dass sich dabei um ein geeignetes Mittel für metabolische Studien der Aktivität des CYP1A1, 2B1 und 2E1 in der Rattenlunge handelt. An der in der Arbeitsgruppe durch Foth et al. etablierten Primärzellkultur von Alveolar Typ II-Zellen der Ratte wurde die Induzierbarkeit des CYP2B1 in diesen Zellen durch Permethrin und Ciprofibrat, beides aus der Literatur bekannte Induktoren des hepatischen CYP2B1, ausgeschlossen.

Ferner wurde an diesen Zellen die basale Expression des CYP2E1 untersucht, ein Bioassay zur Bestimmung der funktionalen Wirksamkeit des CYP2E1 entwickelt.

Bei in vivo Behandlung von Ratten mit Ciprofibrat konnte gezeigt werden, dass sich die pulmonale Expression des CYP2E1 durch das Medikament reduzieren lässt. Für die Alveolar Typ II-Primärzellkultur konnte durch in vitro Behandlung ein gleicher inhibierender Effekt auf die CYP2E1 Expression in der Zellkultur nachgewiesen werden. Aus den Daten ergibt sich ein theoretischer Ansatz für eine mögliche medikamentöse Prophylaxe in besonders durch Lungenkrebs gefährdeten Populationen. Dies bedarf jedoch noch umfassenderer Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Aithal GP, Day CP, Kesteven JL, Daly AK: Association of polymorphisms in the cytochrome P 450 CYP 2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding. *Lancet* 353 (1999) 717-719
- (2) Aksoy M: Different types of malignancies due to occupational exposure to benzene: A review of recent observations in Turkey. *Environ Res* 23 (1980) 181-190
- (3) Bingle L, Bull TB, Fox B, Guz A, Richards RJ, Tetley TD: Type II pneumocytes in mixed cell culture of human lung: alight and electron microscopic study. *Exp Health Perspect* 85 (1990) 71- 80
- (4) Bock KW: Allgemeine Pharmakologie. In: Estler CJ (Hrsg.): Pharmkologie und Toxikologie. Schattauer, Stuttgart, New York, 1994, S. 16-19
- (5) Bond JA: Metabolism of xenobiotics by the respiratory tract. In: Gardner DE, Carpo JD, Mc Clellan RO (Hrsg.): Toxicology of the Lung. Raven Press, New York, 1993, S.187-215
- (6) Bofetta P, Pershagen G, Jöckel KH: Cigar and pipe smoking and lung cancer risk: a multicenter study from Europe. *J Natl Cancer Inst* 91 (1999) 660-661
- (7) Botto F, Seree E, El Khyari S, De Sousa G, Massacrier A, Placidi M, Cau P, Pellet W, Rahmani R, Barra Y: Tissue-specific expression and methylation of the human CYP2E1 gene. *Biochem Pharamacol* 48/6 (1994)1095-1103
- (8) Boyd MR: Biochemical mechanisms in chemical-induced lung injury: roles of metabolic activation. *Crit Rev Toxicol* 7 (1980) 103 -112
- (9) Breeze R, Terk M: Cellular structure, function and organization in the lower respiratory tract. *Enviro Health Perspect* 55 (1984) 3-14
- (10) Breeze RG, Wheeldon EB: The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis* 161 (1977) 705-777

- (11) Brigelius R, Dostal LA, Horton JK, Bend JR: Alteration of the redox state of NADPH and glutathione in perfused rabbit lung by paraquat. *Toxicol Ind Health* 2 (1986) 417-428
- (12) Buhler R, Lindros KO, Nordling A, Johanson I, Ingelman-Sundberg M: Zonation of cytochrome P450 isozyme expression and induction in rat liver. *Drug Metab Dispos* 204 (1992) 407-412
- (13) Carlson GP, Day BJ: Induction by pyridine of cytochrome P 450 II E1 and xenobiotic metabolism in rat lung and liver. *Pharmacology* 44 (1992) 117-123
- (14) Carlson GP, Schoenig GP: Induction of liver microsomal NADPH cytochrome c reductase and cytochrome P 450 by some new synthetic pyrethroids. *Toxicol Appl Pharmacol* 52 (1980) 507-512
- (15) Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR: The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol* 93 (1988) 472- 483
- (16) Chaney AM, Carlson GP: Comparison of rat hepatic and pulmonary microsomal metabolism of benzene and the lack of benzene-induced pneumotoxicity and hepatotoxicity. *Toxicology* 104 (1995) 53-62
- (17) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1987) 156-159
- (18) Cohen GM: Pulmonary metabolism of foreign compounds: its role in metabolic activation. *Environ Health Prospect* 85 (1990) 31-41
- (19) Dallner G: Isolation of microsomal subfractions by use of density gradients. *Meth Enzymol* 52 (1978) 71-83
- (20) Davis ML, Lewandowski J, Dodoson RF: Morphology and ultrastructure of the distal airway epithelium in the guinea pig. *Ana Rec* 209 (1984) 509- 522
- (21) Devereux TR, Diliberto JJ, Fouts JR: Cytochrome P-450 monooxygenase, epoxide hydrolase and flavin monooxygenase activities in Clara cells and alveolar type II cells isolated from rabbit. *Cell Biol Toxicol* 1(1985) 57-65

- (22) Devereux TR, Domin BA, Philpot RM: Xenobiotic metabolism by isolated pulmonary cells. *Pharmacol Ther* 41 (1989) 243-256
- (23) Devereux TR, Massey TE, Van Scott MR, Yankaskas J, Fouts JR: Xenobiotic metabolism in human alveolar type II cells isolated by centrifugal elutriation and density gradient centrifugation. *Cancer Res* 46 (1986) 5438-5443
- (24) De Wazier, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaunne PH: Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 253/1 (1990) 387-394
- (25) Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC: An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. *Am Rev Respir Dis* 134 (1986) 141-145
- (26) Dowsley TF, Ulreich JB, Bolton J, Park SS, Forkert P-G: CYP2E1- dependent bioactivation of 1,1-dichloroethylene in murine lung: formation of reactive intermediates and glutathione conjugates. *Toxicol Appl Pharmacol* 139 (1996) 42-48
- (27) Eling TE, Alty AI: Pulmonary biosynthesis and metabolism of prostaglandins and related substances. *Environ. Health Perspect* 55(1984) 159-168
- (28) Finkelstein JN: Physiologic and toxicologic responses of alveolar type II cells. *Toxicology* 60 (1990) 41-52
- (29) Foth H: Role of the lung in accumulation and metabolism of xenobiotic compounds - implications for chemically induced toxicity. *Crit Rev Toxicol* 25/2 (1995) 165-205
- (30) Foy JW, Silverman DM, Schatz RA: Low level m-xylene inhalation alters pulmonary and hepatic cytochrome P-450 activity in the rat. *J Toxicol Environ Health* 47/2 (1996) 135-44
- (31) Goasduff T, Bellec G, Amet J, Dreano Y, Menez JF, Berthou F: P 450 2E1 expression in liver, kidney and lung of rats treated with single or combined inducers. *Alcohol* 13/3 (1996) 301-308
- (32) Gonzalez FJ: The molecular biology of cytochrome P 450s. *Pharmacol Rev* 40/4 (1989) 243-277

- (33) Griese M, Reinhardt D: Smaller sized particles are preferentially taken up by alveolar type II pneumocytes. *J Drug Target* 5/6 (1998) 471-479
- (34) Guengerich FP: The 1992 B. Brodie Award Lecture: Bioactivation and detoxication of toxic and cancerogenic chemicals. *Drug Metab Dispos* 21/1 (1993) 1-6
- (35) Heder AF, Hirsch-Ernst KI, Bauer D, Kahl GF, Desel H: Induction of cytochrome P 450 2B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* 62 (2001) 71-79
- (36) Hellmold H, Övervik E, Strömstedt M, Gustafsson J-A: Cytochrome P 450 forms in the rodent lung involved in the metabolic activation of food-derived heterocyclic amines. *Carcinogenesis* 14/9 (1993) 1751-1757
- (37) Jeffery PK: Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis* 128 (1983) S14-S20
- (38) Joeckel K-H, Jahn I: Lungenkrebsrisiko durch Zigarren-, Zigarillo- und Pfeifenrauchen. *Dt Ärzteblatt* 96/34-35 (1999) C-1610
- (39) Jones SM, Boobis AR, Moore GE, Stanier PM: Expression of CYP2E1 during human fetal development: methylation of the CYP2E1 gene in human fetal and adult liver. *Biochem Pharmacol* 43/8 (1992) 1876-1879
- (40) Junge B, Nagel M: Das Rauchverhalten in Deutschland. *Gesundheitswesen* 61 (1999) 121-125
- (41) Kainz A, Cross H, Freeman S, Gescher A, Chipman JK: Effects of 1,1-dichlorethylene and some of its metabolites on the functional viability of mouse hepatocytes. *Fundam Appl Toxicol* 21 (1993) 140-148
- (42) Keith IM, Olson EB, Wilson NM, Jefcoate CR: Immunological identification and effects of 3-methylcholanthrene and Phenobarbital on rat pulmonary cytochrome P-450. *Cancer Res* 47 (1987) 1878-1882
- (43) Khuder SA: Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 31/2-3 (2001) 139-148

- (44) Kietzmann T, Hirsch-Ernst KI, Kahl GF, Jungermann K: Mimicry in primary rat hepatocyte cultures in the in vivo perivenous induction by phenobarbital of cytochrome P-450 2B1 mRNA: role of epidermal growth factor and perivenous oxygen tension. *Mol Pharma* 56 (1999) 46-53
- (45) Koop DR: Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J* 6 (1992) 724-730
- (46) Koop DR, Tierney DJ: Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1. *Bio Essays* 12 (1990) 429-435
- (47) Kyhse-Andersen J: Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10 (1984) 203-209
- (48) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685
- (49) Lee C, Watt KC, Chang A, Plopper CG, Buckpitt AR, Pinkerton KE: Site-selective differences in cytochrome P 450 isoform activities – comparison of expression in rat and rhesus monkey lung and induction in rat. *Drug Metab Dispos* 26/5 (1998) 396-400
- (50) Lee RP, Forkert PG: In vitro biotransformation of 1,1-dichlorethylene by hepatic cytochrome P450 2E1 in mice. *J Pharm Exp Ther* 270 (1994) 371-376 A-6/6
- (51) Leikauf G, Driscoll K: Cellular Approaches in Respiratory Tract Toxicology. In: Gardner DE, Crapo JD, Mc Clellan RO (Hrsg): *Toxicology of the Lung*. Raven Press, New York, 1993, S.335-369
- (52) Le Marchand L, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR, Lau AF: Associations of CYP1A1, GSTM1 and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res* 58/21 (1998) 4858-4863
- (53) Leonhardt H: Atmungsorgane. In: Leonhardt H: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme, Stuttgart, 1990, S.397 – 411

- (54) Lesur O, Cantin A, Begin R: In vitro activity of quartz low doses on lung type II cells. *Am Rev Respir Dis* 141 (1990) A63- A74
- (55) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1951) 265-275
- (56) Malara NM, Sgambato A, Granone P, Flamini G, Margaritora S, Boninsegna A, Cesario A, Galetta D, Yang Q, Cittadini A: Biological characterization of central and peripheral primary non small cell lung cancers (NSCLC). *Anticancer Res.* 19/3B (1999) 2249-2252
- (57) Mason RJ, Walker SR, Shields BA, Henson JE, Williams MC: Identification of rat alveolar type II epithelial cells with tannic acid and polychrome stain. *Am Rev Respir Dis* 131 (1985) 786-788
- (58) McLemore TL, Adelberg S, Liu MC, McMahan NA, Yu SJ, Hubbard WC, Czerwinski M, Wood TG, Storeng, Lubet RA, Egelston JC, Boyd MR, Hines RN: Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *Nat Cancer Inst* 82 (1990) 1333-1339
- (59) Mertens S: Lungenkrebsrisiko höher als bisher angenommen. *Dt Ärzteblatt* 94/42 (1997) B-2242
- (60) Nebert DW, Nelson DR, Adsenik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR: The P 450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature of chromosomal loci. *DNA* 8 (1989) 1-13
- (61) Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert D: P 450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6 (1996) 1-42
- (62) O`Brodovich H, Raffi B, Post M: Bioelectric properties of fetal epithelial monolayers. *Am J Physiol* 258 (1990) S. L201-206

- (63) Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J Biol Chem* 239 (1964) 2379-2385
- (64) Paolini M, Pozzetti L, Perocco P, Mazzullo M, Cantelli-Forti G: Molecular non-genetic biomarkers of effect related to methyl thiophanate cocarcinogenesis: organ- and sexspecific cytochrome P450 induction in the rat. *Cancer Lett* 135/2 (1999) 201-213
- (65) Park Y, Li H, Kemper B: Phenobarbital induction mediated by a distal CYP2B2 sequence in rat liver transiently transfected in situ. *J Biol Chem* 271 (1996) S. 23725-23728
- (66) Peter R, Böcker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP, Yang CS: Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P 450 IIE1. *Chem Res Toxicol* 3 (1990) 566-573
- (67) Peto R, Lopez Ad, Boreham J, Thun M, Heath Jr C: Mortality from smoking in developed countries 1950-2000. Indirect estimates from national vital statistics. Oxford University Press, Oxford, 1994
- (68) Plopper CG: Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells: The Clara cells. *Am Rev Respir Dis* 128 (1983) S37-S41
- (69) Plopper CG, Weir A, George JS, Tyler N, Mariassy A, Wilson D, Nishio S, Cranz D, Heidsiek J, Hyde D: Cell populations of the respiratory system: interspecies diversity in composition, distribution and Morphology. In: Mohr U (Hrsg.): *Inhalation Toxicology*. Springer-Verlag, Berlin, 1988, S. 25-40
- (70) Rannels DE, Pegg AE, Clark RS, Addison JL: Interaction of paraquat and amine uptake by rat lungs perfused in situ. *Am J Physiol* 249 (1985) E506-E513
- (71) Richards RJ, Davies N, Atkins J, Oreffo VI: Isolation, biochemical characterization and culture of lung type II cells of the rat. *Lung* 165 (1987) 143-158
- (72) Riede UN, Costabel U: Lunge. In: Riede UN, Schaefer HE (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme, Stuttgart, 1993, S.615-653

- (73) Riede UN, Wiestler OD, Müller H: Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie). In: Riede UN, Schaefer HE (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme, Stuttgart, 1993, S.344-392
- (74) Roerig DL, Kotrly KJ, Ahlf SB, Dawson CA, Kampine JP: Effect of propranolol on the first pass uptake of fentanyl in the human and rat lung. *Anaesthesiology* 71 (1989) 62-68
- (75) Roerig DL, Kotrly KJ, Dawson CA, Ahlf SB, Gualtieri JF, Kampine JP: First pass uptake of verapamil, diazepam and thiopental in the human lung. *Anaesthesiol Anal* 69 (1989) 461-466
- (76) Roerig DL, Kotrly KJ, Vucins EJ, Ahlf SB, Dawson CA, Kampine JP: First pass uptake of fentanyl, meperidine and morphine in the human lung. *Anaesthesiology* 67 (1987) 466-472
- (77) Rooney SA: Phospholipid composition, biosynthesis and secretion. In: Parent RA (Hrsg.): Comparative biology of the normal lung. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992, S. 511-544
- (78) Rooney SA, Young SL, Mendelson CR: Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J* 8 (1994) 957-967
- (79) Saarikoski ST, Husgafvel-Prusiainen K, Hirvonen A, Vainio H, Gonzalez FJ, Anttila S: Localization of CYP1A1 mRNA in human lung by in situ hybridisation: comparison with immunohistological findings. *Int J Cancer* 77/1 (1998) 33-39
- (80) Schmalix WA, Barrenscheen M, Landsiedel R, Janzowski C, Eisenbrand G, Gonzalez F, Eliasson E, Ingelman-Sundberg M, Perchermeier M, Greim H, Dochmer J: Stable expression of human cytochrome P450 2E1 in V79 chinese hamster cells. *Eur J Pharmacol* 293 (1995) 123-131
- (81) Schmidt LG: Tabakabhängigkeit und ihre Behandlung. *Dt. Ärzteblatt* 98/27 (2001) B1568-1574
- (82) Schönfeld N: Pneumologie. In: Planta M (Hrsg.): *Memorix –Innere Medizin*. Chapman & Hall, Weinheim, 1996, S.181

- (83) Schrader E, Hirsch-Ernst KI, Scholz E, Kahl GF, Foth H: Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone (NNK) in primary cultures of rat alveolar type II cells. *Drug Metab Dispos* 28 (2000) 180-185
- (84) Shimada T, Yun CH, Yamazaki H, Gautier JC, Beaune PH, Guengerich FP: Characterization of human lung in microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol Pharmacol* 41 (1992) 856-864
- (85) Simonato L, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Bofetta P, Brennan P, Darby SC, Forastiere F, Fortes C, Gaborieau V, Gerken M, Gonzales CA, Jockel KH, Kreuzer M, Merletti F, Nyberg F, Pershagen G, Pohlabein H, Rosch F, Whitley E, Wichmann HE, Zambon P: Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of intercountry heterogeneity. *Int J Cancer* 91/6 (2001) 876-887
- (86) Slaughter SR, Statham CN, Philpot RM, Boyd MR: Covalent binding of metabolites of 4-ipomeanol to rabbit pulmonary and hepatic microsomal proteins and to the enzymes of the pulmonary cytochrome P-450-dependent monooxygenase system. *J Pharmacol Exp Ther* 224 (1983) 252-257
- (87) Smith LL: Paraquat toxicity. *Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311 (1985) 647-657
- (88) Smith LL: The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Annu Rev Physiol* 48 (1986) 681-692
- (89) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *J Mol Biol* 98 (1975) 503-517
- (90) Tornquist S, Wiklund L, Toftgard R: Investigation of absorption, metabolism kinetics and DNA-binding of intratracheally administered benzo[a]pyrene in the isolated, perfused rat lung: a comparative study between microcrystalline and particulate adsorbed benzo[a]pyrene. *Chem Biol Interact* 54 (1985) 185-198
- (91) Uhlig S: The isolated perfused lung. In: Uhlig S, Taylor AE (Hrsg.): *Methods in Pulmonary Research*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1998, S.29-55

- (92) Wiersma DA, Roth CA: Clearance of benzo[a]pyrene by isolated rat liver and lung: alterations in perfusion and metabolic capacity. *J Pharmacol Exp Ther* 225 (1983) 121-125
- (93) Wu D, Cederbaum A: Expression of cytochrome P 450 2E1 in rat fetal hepatocyte culture. *Mol Pharmacol* 49 (1996) 802-807
- (94) Zangar RC, Woodcroft KJ, Kocarek TA, Novak RF: Xenobiotic-enhanced expression of cytochrome P 450 2E1 and 2B1/2B2 in primary cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 23/7(1995) 681-687

7.Thesen

- (1) Das Modell der Isoliert Perfundierten Lunge ist geeignet für Untersuchungen der Cytochrom P 450 Isoformen CYP1A1, 2E1 und 2B1, da die Expression der Isoformen, gezeigt im Proteinnachweis mittels Western Blot Analytik, über einen ausreichend langen Zeitraum stabil ist. Limitierend ist die begrenzte Viabilität des Modells selbst.
- (2) In Alveolar Typ II-Zellen der Ratte in Primärkultur ließ sich das CYP2B1 durch in Rattenhepatozyten induzierend wirkendes Ciprofibrat und Permethrin in seiner Expression nicht beeinflussen. Dabei wurde für die Ciprofibratbehandlung die Proteinexpression und für die Permethrinbehandlung die mRNA des CYP2E1 untersucht.
- (3) CYP2E1-Protein ließ sich in Alveolar Typ II-Zellen der Ratte in Primärkultur mittels Western Blot Analyse bis zu 72 h nach Kulturbeginn nachweisen.
- (4) Um die Funktionsfähigkeit des in den Alveolar Typ II-Zellen gefundenen CYP2E1 nachzuweisen, wurde erstmals für eine Primärzellkultur die Aktivitätsbestimmung mittels Chlorzoxazonhydroxylierung angewandt. Dabei zeigte sich eine Aktivität des CYP2E1, die mit Fortdauer der Kultur rückläufig war.
- (5) Für Ciprofibrat, das zur Behandlung von Dyslipidämien genutzt wird, ist eine Induktion des CYP2E1 in Rattenhepatozyten beschrieben worden. Im Ganztiersversuch mit Wistar-Ratten konnte bei Behandlung mit Ciprofibrat in therapeutischen Dosen eine Herabsetzung der pulmonalen bei gleichzeitiger Induktion der hepatischen CYP2E1-Proteinexpression im Western Blot gezeigt werden.
- (6) Bei in vitro Behandlung von Alveolar Typ II-Zellen und Hepatozyten der Ratte in Primärkultur mit Ciprofibrat in Konzentrationen entsprechend der zu erwartenden Serumkonzentration bei Behandlung im therapeutischen Bereich ließ sich ebenfalls eine Verminderung der pulmonalen und eine Induktion der hepatischen CYP2E1-Proteinexpression zeigen.
- (7) Zu prüfen bleibt die tatsächliche Situation im humanen Gewebe. Ließe sich ein gleichsinniger Effekt zeigen, gäbe es hier einen theoretischen Ansatz für eine medikamentöse Prophylaxe, da Ciprofibrat ein relativ nebenwirkungsarmes Medikament ist, mit dem bereits Erfahrungen in der Langzeittherapie vorliegen. Der gedankliche Hintergrund wäre die Senkung der pulmonalen CYP2E1 Expression, und dabei insbesondere bei den besonders durch Nitrosamine gefährdeten Alveolar Typ II-

Zellen, und gleichzeitige Induktion in der Leber. Dies könnte eine geringere Belastung der Lunge mit den toxischen Metaboliten des Kanzerogens zur Folge haben.

A. Anhang

A.1. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Ines Alice Rachidi, geb. Wienrich
Geburt 14.03.1973 in Nordhausen
Familienstand verheiratet

Schulbildung

1979-1989 Besuch der Polytechnischen Oberschule „A. Diesterweg“ in Nordhausen
1989-1991 Besuch der Erweiterten Oberschule „W.v.Humboldt“ in Nordhausen
Juni 1991 Abitur

Studium

April 1992 – März 1997 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen
April 1998 Wechsel an die Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Fortführung des Studiums der Humanmedizin
Juni-September 1998 Studienaufenthalt am Princess Royal Hospital in Haywards Heath, Großbritannien
Oktober 1998 Studienabschluss mit 3 Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

Juni 1999 – Nov.2000 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Sertürner Krankenhaus in Einbeck
seit Nov. 2000 Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Johanniter Krankenhaus in Stendal

A.2. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne Nutzung anderer als der aufgeführten Hilfsmittel oder Materialien sowie ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Daten bzw. gedankliche Ansätze, die anderen Quellen entstammen wurden unter genauer Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ferner versichere ich, dass ich für die Anfertigung der Arbeit keinerlei Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe. Niemand hat durch mich direkt oder indirekt finanzielle Aufwendungen für Arbeiten im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation erhalten.

Magdeburg, den 04.03.2002

Alice Rachidi

A.3. Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

Die vorliegende Arbeit ist bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Magdeburg, den 04.03.2002

Alice Rachidi

A.4. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. H. Foth für die gewährte Förderung zur Durchführung der vorliegenden Arbeit, sowie die vielfältige Unterstützung in meiner Ausbildung bedanken. Bei Prof. Dr. G. F. Kahl, Dr. E Schrader, Dr. A. Heder, Dr. I. Wolff möchte ich mich für viele anregende Diskussionen und Ratschläge bedanken, Frau S. Helle danke ich für die Hilfe bei der Überlistung ausreichend kniffliger EDV-Probleme, Dr. S. Müller für die Einweisung in Technik der Isoliert Perfundierten Lunge .

Bei Dr. U. Bernauer vom BgVV danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der HPLC-Analytik.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-Universität, dabei insbesondere Frau Ch. Regener und Frau G. May, für das freundliche Arbeitsklima, die fruchtbaren Arbeitsstunden und die netten Pausen zwischendrin.

Besonders möchte ich mich aber bei meinem Ehemann für all die Geduld, den großen Vorrat an Zuversicht, der meinen teilweise erschöpften mehr als einmal wieder aufgefüllt hat, und all die Hilfe bedanken.