

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



**Expression von P-Glykoprotein (MDR-1), MRP-1 und LRP in humanen  
AII- und Clara-Zell-ähnlichen Tumorzelllinien sowie normalen humanen  
Bronchialepithelzellen**

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

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

von Christoph Köhler  
geboren am 10.04.1973 in Köthen (Sachsen/Anhalt)

Gutachter: Prof. Dr. med.dent. H. Foth  
PD Dr. Beyer  
Prof. Dr. Schrenk (Kaiserslautern)

19.02.2002

01.10.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000004484**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004484>]

## Kurzreferat

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression der MDR-assoziierten Proteine P-Glykoprotein (P-gp/MDR-1), das Multidrug Resistance-associated Protein (MRP-1) und das Lung Resistance-related Protein (LRP) in humanen Lungentumoren und normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) untersucht. Diese Proteine sind fähig, durch intrazelluläre Umverteilung und aktiven Efflux in den extrazellulären Raum, die intrazelluläre Konzentration von Zytostatika und damit deren Wirksamkeit zu verringern. Einerseits ist in mehreren klinischen Studien ein Zusammenhang aufgezeigt worden zwischen der Expression verschiedener MDR-assoziiierter Proteine und der Resistenz von kleinzelligen (SCLC) und nichtkleinzelligen (NSCLC) Lungentumoren, andererseits ist eine Beeinflussung der MDR-1 Expression u.a. in Hepatozyten durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben worden. In wieweit ROS, welche oft durch Zytostatika und Strahlentherapie induziert werden, an der Überexpression dieser MDR-assoziierten Proteine und damit an der Entstehung eines Multidrug resistance (MDR)-Phänotypes beteiligt sind, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Mittels Northern Blot, RT-PCR und Western Blot Techniken wurde die Expression dieser Proteine bestimmt. Neben der Messung des reduzierten Glutathions zur Bestimmung der pro-oxidativen Wirkung des Buthioninsulfoximins und der Bestimmung der eingesetzten Konzentrationen aller Substanzen mittels Vitalitätstestes MTT kamen der MDR-1- und MRP-1-Funktionsassay unter Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen zum Einsatz. Es zeigte sich, dass die humanen Lungentumorzellen MDR-1 und MRP-1 nach oxidativem Stress überexprimieren. LRP hingegen unterliegt kaum einem solchen regulatorischen Einfluss.

Im Unterschied zu den Tumorzellen sind die NHBEZ gegenüber ROS empfindlicher. Durch oxidativen Stress kommt es ebenfalls zur Überexpression des MRP-1 und des basal gering exprimierten MDR-1-Proteins. Aber auch die LRP-Expression ist in den NHBEZ sensibel auf diesen Stimulus. Aufgrund starker interindividueller Schwankungen ist eine Vorhersage der Reaktion der NHBEZ auf oxidativen Stress schwierig. Sowohl in den Tumorzellen als auch in den NHBEZ waren die detektierten Proteine MDR-1 und MRP-1 funktionell aktiv. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass reaktive Sauerstoffspezies in der Lage sind, die MDR-assoziierten Proteine sowohl in Lungentumorzellen als auch in nicht tumorösen NHBEZ zu induzieren.

Ein Überwiegen der MRP-1- und LRP- Proteinexpression kann einen Baustein in der Resistenz von Lungentumorzellen gegenüber einer Chemotherapie darstellen. Durch die Vermeidung einer Induktion von ROS in der Therapie von Lungentumoren oder eine Kombination der Zytostatika mit sogenannten Chemosensitizern, die die MDR-1 und MRP-1 Funktion und damit den Efflux von Zytostatika hemmen, wäre es möglich, einen Schritt weiter hinsichtlich der Überwindung primärer und sekundärer Resistenzen zu kommen und die Erfolgsrate einer Chemotherapie zu erhöhen.

Köhler, Christoph: Expression von P-Glykoprotein (MDR-1), MRP-1 und LRP in humanen AII- und Clara-Zell-ähnlichen Tumorzelllinien sowie normalen humanen Bronchialepithelzellen.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Superfamilie der ABC-Transporter</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Die Familie der P-Glykoproteine</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	Struktur, Topologie und Funktion der P-Glykoproteine.....	3
1.2.2	Verteilung des MDR-1 Proteins.....	4
1.2.3	Das „Multidrug Resistance-associated Protein“ (MRP).....	4
1.2.4	Das „Lung Resistance-related Protein“(LRP).....	6
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>9</b>
2.1.1	Zellkulturen.....	9
2.1.2	Chemikalien und Biochemikalien.....	9
2.1.3	Zellkulturreagenzien.....	9
2.1.4	Reagenzien für Plasmamembranpräparation und Western Blot Analytik.....	10
2.1.5	Chemikalien für die Northern Blot Analytik.....	10
2.1.6	Antioxidantien und Oxidantien.....	10
2.1.7	Inhibitoren zellulärer Enzymfunktionen.....	10
2.1.8	Chemosensitizer.....	11
2.1.9	Primer für die RT-PCR.....	11
2.1.10	Oligonukleotidsonde.....	11
2.1.11	Radioaktiv markierte Verbindungen.....	11
2.1.12	Antikörper.....	11
2.1.13	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
<b>2.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>14</b>
2.2.1	Sterilisation von Materialien und Lösungen.....	14
2.2.2	Splitten und Kultivierung von Tumorzelllinien.....	14
2.2.3	Isolation und Kultivierung normaler humaner Bronchialepithelzellen.....	14
2.2.4	Zellkulturmedien DMEM, epith-o-ser, BECG.....	15
2.2.5	Zellzählung und Wachstumskurve.....	16
2.2.6	Vitalitätstest.....	16
2.2.7	<sup>3</sup> H-Uridin Inkorporationsstudien.....	16
2.2.8	Abbruch der Kultivierung.....	17
2.2.9	Präparation von Zellmembranen.....	17
2.2.10	Proteinbestimmung.....	18
2.2.11	Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	19
2.2.12	Elektrophorese – Nasstransfer.....	21
2.2.13	Färbungen.....	21
2.2.14	Immunchemischer Nachweis der Proteine.....	22
2.2.15	Isolation der RNA.....	22
2.2.16	Herstellung von horizontalen denaturierenden Agarosegelen.....	23

2.2.17	Probenvorbereitung.....	23
2.2.18	Elektrophorese.....	24
2.2.19	RNA-Transfer auf Nylonmembran.....	24
2.2.20	Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot.....	25
2.2.21	Markierung von Oligonukleotiden.....	25
2.2.22	Nachweis von mRNA durch Hybridisierung mit <sup>32</sup> P-markierten Sonden .....	25
2.2.23	RT-PCR.....	26
2.2.24	Bestimmung des reduzierten Glutathions.....	26
2.2.25	Messung der MDR-1 abhängigen Transportaktivität.....	27
2.2.26	Messung der MRP-1 abhängigen Transportaktivität.....	28
2.2.27	Auswertung der durchgeführten Experimente.....	28

### **3 ERGEBNISSE 30**

3.1	Zellkulturen der verwendeten Lungenzellen.....	30
3.2	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Lungentumorzelllinien.....	30
3.2.1	Wachstumskurve und Generationszeit.....	30
3.3	Expression der MDR-1-mRNA in humanen Tumorzelllinien.....	31
3.4	Vitalitätstest –MTT der verwendeten Substanzen.....	32
3.5	Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf die Expression der Multidrug-Resistance Proteine in Lungentumorzellen.....	33
3.5.1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> als Induktor des P-Glykoproteins MDR-1 in humanen Lungentumorzelllinien.....	33
3.5.2	Paraquat als MDR-1 Induktor in humanen Lungentumorzelllinien.....	35
3.6	P-Glykoprotein vermittelter Rhodamin-123 -Transport in Lungentumorzelllinien.....	38
3.6.1	Hemmbarkeit des MDR-1 vermittelten Transportes.....	38
3.7	Das Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) als weiterer Vertreter der Resistenzproteine in Tumorzellen.....	39
3.7.1	Expression von MRP-mRNA in Lungentumorzelllinien.....	40
3.7.2	Induktion von MRP-1-Protein durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
3.7.3	Wirkung von Antioxidantien auf die MRP-1-Protein Expression.....	41
3.7.4	Expression von MRP-mRNA nach Paraquat-Exposition.....	41
3.7.5	Induzierbarkeit von MRP-1-Protein durch Paraquat.....	42
3.8	Carboxy-2,7-dichlorofluorescein (CDF) als MRP-1 Substrat zum Nachweis des MRP-1 vermittelten Transportes.....	43
3.8.1	Influxstudie und Spezifität des MRP-1 vermittelten Transportes.....	43
3.8.2	Abhängigkeit der MRP-1 Funktion vom MRP-1 Proteingehalt.....	44
3.9	Das Lung-Resistance-related Protein (LRP) als weitere Resistenzbarriere in Lungentumorzellen.....	45
3.9.1	Einfluss der radikalischen Wirkung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die Expression von LRP in humanen AII- und Clara-Zell ähnlichen Lungentumorzellen.....	45
3.9.2	Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die LRP-Protein Expression.....	46
3.9.3	Effekt von Paraquat auf die Expression von LRP-mRNA und Protein.....	47
3.10	Expression und Induzierbarkeit von Multidrug-Resistance Proteinen in serum-frei kultivierten humanen Bronchialepithelzellen.....	48
3.10.1	Multidrug-Resistance Proteine und deren interindividuellen Expressionsunterschiede in NHBEC-Kulturen.....	48
3.10.2	Paraquatwirkung auf die MDR-Protein Expression in NHBEC.....	50

3.11	Funktionsnachweis der MDR-1- und MRP-1-Proteine mit Rho123 und CDF durch Einzelzellfluoreszenzmessung.....	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
4.1	Expression des P-Glykoproteins MDR-1 in humanen Lungentumorzelllinien und Induktion durch reaktive Sauerstoffspezies.....	55
4.2	Auswirkung Paraquat induzierter Radikale auf die Expression von MDR-1 in humanen Lungentumorzellen.....	59
4.3	Funktionsnachweis des MDR-1-vermittelten Transportes durch das MDR-1-Substrat Rhodamin 123.....	61
4.4	Expression des Multidrug Resistance-associated Protein (MRP-1) in humanen Lungentumorzelllinien durch reaktive Sauerstoffspezies.....	62
4.5	Hemmung des MRP-1-vermittelten Transportes und Anreicherung des MRP-1-Substrates CDF.....	64
4.6	Expression des Lung Resistance-related Proteins (LRP) in humanen Lungentumorzellen.....	64
4.7	Reaktive Sauerstoffspezies als Mediatoren der MDR-1-, MRP-1- und LRP – Expression in normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) im Vergleich zu den Lungentumorzellen H322 und H358 .....	65
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>THESEN</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENSLAUF</b>	
<b>10</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG, PUBLIKATIONEN</b>	

## 1. Einleitung

Zitat: **John A.Kellen:** „Keep in mind: The term „multidrug resistance“ is a cerebral abstraction , serving the need of satisfying our liking for intellectual frameworks.“

Die Resistenz von Tumorzellen gegen eine Vielzahl von Chemotherapeutika, auch „Multidrug-Resistance“ (MDR) genannt, stellt ein grosses Hindernis in der Therapie von neoplastischen Erkrankungen dar. Dieses Versagen von Zytostatika kann durch viele Faktoren bedingt sein. Hierzu gehören die MDR-assoziierten Proteine wie das P-Glykoprotein (P-gp), das Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) und kleinere Transporter wie z.B. das 95 kDa grosse P-Glykoprotein P95 (23). Die transmembranären Transporter P-gp und MRP, welche den ABC-(ATP-binding-cassette)-Transportern angehören, bewirken einen Efflux von Medikamenten in den Extrazellulärraum (49). Zu den intrazellulär lokalisierten Transportproteinen, die eine Umverteilung der Fremdstoffe bewirken, zählen MRP, das „Lung Resistance-related“ Protein (LRP) und die am Golgi-Apparat lokalisierten Halbtransporter TAP (1+2) (113, 71). Ein weiterer Mechanismus in den Tumorzellen, der zum MDR-Phänotyp beiträgt, ist eine Konjugation von beispielsweise Cisplatin und Arsen an Glutathion (GSH) mit Hilfe der Glutathion S-Transferase (GST) und der anschliessende Transport der X-Glutathion-Komplexe durch MRP (9).

Weitere Beispiele, die eine Abnahme der Sensibilität der Zellen gegenüber Medikamenten und Xenobiotika zur Folge hat, sind die Verminderung der Topoisomerase II-Aktivität und veränderte DNA-Reparaturmechanismen, eine abweichende apoptotische Antwort durch p53 und Bcl-2 Veränderung, eine erhöhte Dichte von Mikrotubulie in resistenten Tumorzellen zum unidirektionalen Transport von Organellen zur Zellperipherie und eine gute Ausstattung von Enzymsystemen –beispielhaft genannt: Cytochrome P450, Antioxidative Enzyme (AOE) wie Katalase oder Superoxidreduktasen (SOD) (5). Auch wurde eine Korrelation zwischen dem MDR-Phänotyp und einer beachtlichen Erhöhung der im Zytosol befindlichen Proteinkinase C (PKC) beschrieben. Die PKC hat eine regulatorische Funktion auf die P-gp-Phosphorylierung und bedingt somit eine erhöhte Transportaktivität von P-gp (94).

### 1.1 Die Superfamilie der ABC-Transporter

Die in dieser Arbeit untersuchten MDR-1, MRP-1 und LRP- Proteine gehören zu der Superfamilie der ABC-(ATP-binding-cassette)-Transporter. Bis heute sind über 100 Mitglieder dieser Familie in Bakterien, Hefen, Pflanzen und Säugern identifiziert worden.

Die meisten Vertreter dieser ABC-Superfamilie, die in Pro- und Eukaryonten zu finden sind, besitzen eine Transportfunktion. Ein Strukturmerkmal der ABC-Proteine ist der Aufbau aus vier funktionellen Domänen. Dazu gehören zwei zur Membranverankerung dienende hydrophobe und zwei hydrophile, zytoplasmatisch gelegene ATP-bindende Bereiche.

Als energieabhängige Transporter führen die ABC-Proteine in Anwesenheit von ATP zu einer Membranpassage strukturell unterschiedlicher Stoffe. Bakterien sind durch diese Proteine zu einem unidirektionalen Import oder Export von Polysacchariden, Peptiden, Steroiden, Lipiden, Aminosäuren, anorganischen Ionen, verschiedener Fremdstoffe und Toxinen fähig (28).

Ein bekannteres Beispiel für die ABC-Transporter ist das in Säugetieren vorkommende Mukoviszidose-assoziierte CFTR-Protein (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), das als Chloridkanal fungiert (88).

Weiterhin gehören das in Peroxisomen von Säugetieren lokalisierte PMP70 (peroxisomal membrane protein) dazu, dessen Ausfall zu Eisenstoffwechselstörungen und schweren cerebro-hepato-renalen Dysfunktionen des betroffenen Individuums führt (48, 29), sowie Transporter für den „alpha peptide mating factor“ der Hefe (STE6) und die oben genannten TAP-1 und-2, welche Peptide in das endoplasmatische Retikulum für die Klasse I Antigen Präsentation transportieren (38).

Ein „Schwester-Protein“ des P-Glykoproteins (=SPGP), welches eine 61% Übereinstimmung mit der Sequenz des humanen MDR-1 zeigte, wurde kürzlich als ein weiteres Mitglied charakterisiert.

## 1.2 Die Familie der P-Glykoproteine

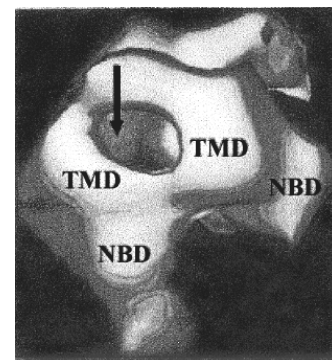
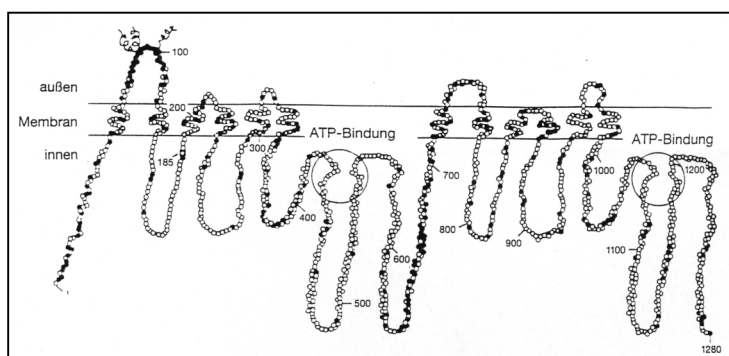
Studien der Gruppe von Ling zeigten, dass die Hamster P-gp Familie aus 3 Mitgliedern zusammengesetzt ist (Pgp1-3) (47). In der Maus wurden ebenfalls 3 MDR-Mitglieder charakterisiert: mdr1a, mdr1b und mdr2 (35). Beim Menschen konnten nur 2 MDR-Gene (MDR-1, MDR-2) gefunden werden. Sowohl das humane MDR-1 als auch das mdr1 von Maus und Ratte sind fähig, ATP zu binden und einen transmembranären Transport von Medikamenten zu bewerkstelligen. Hingegen scheint die Unfähigkeit von MDR-2/mdr2 eine Xenobiotika-Resistenz zu erzeugen, durch die verminderte Fähigkeit bedingt zu sein, diese Xenobiotika/ Medikamente zu binden (5). Aufgrund der Tatsache, dass P-Glykoproteine der Klassen I und II (Tab. 1) durch einen auswärts gerichteten Transport von Substraten eine Mehrfachresistenz gegenüber zytotoxischen Verbindungen vermitteln können, wurde das MDR-1 in der vorliegenden Arbeit untersucht. Hingegen scheinen die P-Glykoproteine der Klasse III nicht an der Resistenzentwicklung beteiligt zu sein.

Tab.: 1 Nomenklatur der multidrug-resistance Gene (5):

	Klasse I	Klasse II	Klasse III
Mensch	MDR-1	-	MDR-2
Maus	mdr1a (mdr3)	mdr1b (mdr1)	mdr2
Hamster	pgp1	pgp2	pgp3
Ratte	mdr1a (pgp1)	mdr1b (pgp2)	mdr2 (pgp3)

### 1.2.1 Struktur, Topologie und Funktion der P-Glykoproteine

Das P-Glykoprotein (P-gp) besteht aus 1280-Aminosäuren und wird als eine einzelne Polypeptidkette exprimiert. Es wurden 2 aufeinanderfolgende homologe Proteinbereiche mit je 6 hydrophoben Transmembransegmenten und je einer zytoplasmatisch lokalisierter hydrophilen ATP-bindenden Region, mit der Fähigkeit zur ATP-Bindung und -Hydrolyse, charakterisiert (2). Diese 2 Bereiche sind durch eine „Linkerregion“ miteinander verbunden (31). Die ATP-Bindungsstellen sind für die Transportfunktion essentiell. Strukturanalysen zeigten, dass ein Phenylalanin-x-x-Phenylalanin Bereich im transmembranären Segment 6 und 12 eine wichtige Sequenz der Substratbindungsstelle und damit Voraussetzung zum Substrattransport ist (66). Die Funktion des P-gp stellten sich Gottesman und Pastan als Modell eines „hydrophoben Staubsaugers“ vor (32). Dabei war der Grundgedanke, dass amphiphile Substrate in der Membran interkalieren und Substrate einerseits aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum, andererseits ohne das Zytoplasma zu erreichen durch das P-gp nach aussen transportiert werden.



**Abbildung 1: Zweidimensionale Darstellung nach Chin et al. (15) und dreidimensionale Rekonstruktion des P-Glykoproteins nach Rosenberg und Higgins (90). Im Zentrum die offene Pore (↓), TMD= transmembranäre Domäne, NBD=Nukleotid-bindende Region.**

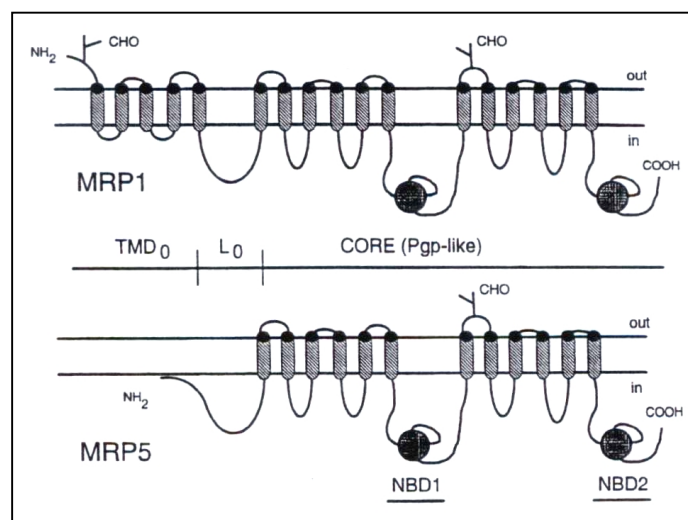


### 1.2.2 Verteilung des MDR-1 Proteins

Die Gewebeverteilung ist in den einzelnen P-gp Klassen unterschiedlich. Die Klasse III wurde in allen Säugerspezies gefunden, hauptsächlich in der Leber, weniger in der Milz, Nebenniere, Herz- und Skelettmuskulatur. Dabei haben die Klasse III Proteine essentielle Bedeutung für die Exkretion von Phosphatidylcholin in die Galle. Die Klasse I und II P-gp's wurden in Darmmukosa, proximalen Nierentubulus, Milz, Leber, Pankreas, Nebennierenrinde, Lunge, Blut-Hirn-Schranke, Hoden, Plazenta u.a. Organen in unterschiedlicher Ausprägung gefunden (49).

### 1.2.3 Das „Multidrug Resistance-associated Protein“ (MRP)

Cole et al. (18) entdeckte einen weiteren Transporter (MRP-1), der P-gp-negativen Tumorzellen eine „Multidrug-Resistance“ verlieh. Während es nur 2 humane P-gp's gibt (MDR-1, MDR-2), wurden vom „Multidrug Resistance-associated Protein“ (MRP) mittlerweile 7 Familienmitglieder identifiziert (MRP1-7) (52, 53, 40). Sie gehören ebenfalls zu den ABC-Transportern. Über die Struktur und die Funktion des MRP-7 ist bis jetzt wenig bekannt. Die anderen unterteilt man in 2 Gruppen. Eine Gruppe umfasst die MRP-1,-2,-3 und -6 mit einer zusätzlichen N-terminalen Domäne (Transmembrane domain = TMD<sub>0</sub>, Abb.2), welche beim P-gp fehlt (9). Zur zweiten Gruppe zählen MRP-4 und -5, die kleiner sind als MRP-1 und keine TMD<sub>0</sub> aufweisen, wobei diese nicht für die Transportaktivität notwendig zu sein scheint (3).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung von MRP-1 und -5.** NBD= Nukleotid-bindende Domäne. Dieses zweidimensionale Bild vereinfacht die in Wirklichkeit komplizierte dreidimensionale Struktur mit Ausbildung einer transmembranären Pore. L<sub>0</sub> = verbindende Domäne (9)

Das MRP-Gen kodiert für eine mRNA von 7,8-8,2 kb und wurde auf Chromosom 16p13.1 lokalisiert (18). Das Produkt ist ein 190 kDa grosses membrangebundenes Protein (56). Dieses zu den ABC-Transportern gehörende Protein besitzt 12 transmembranäre Domänen, sowie 2 zytoplasmatisch gelegene ATP-Bindungsstellen, ist N-glykosyliert und unterliegt der Phosphorylierung (1).

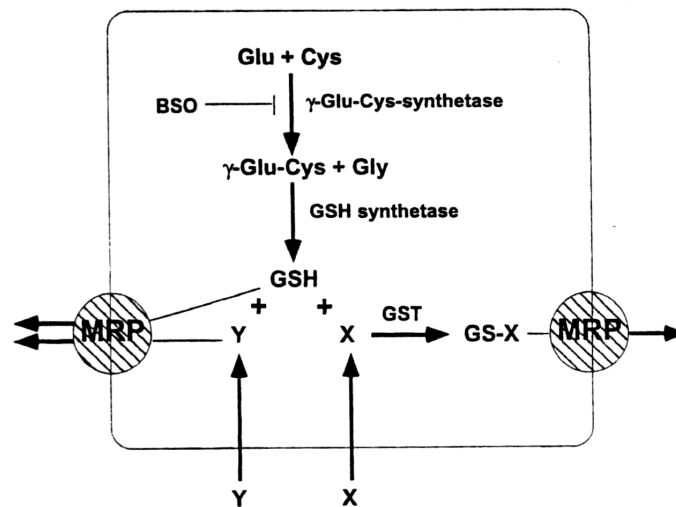
Die folgende Tabelle zeigt die unterschiedlichen MRP-Typen in ihrer Verteilung im menschlichen Körper und deren bis jetzt bekannte physiologische Funktion (für MRP-3 bis 7 noch ungeklärt).

Tabelle 2:

	Hauptlokalisation im Körper	physiologische Funktion
MRP-1	ubiquitär (gering in der Leber)	Leukotrien C <sub>4</sub> Transporter
MRP-2	Leber, Niere, Magen	Transport von glukuronidiertem Bilirubin u.a. organischen Anionen von Hepatozyten in die Galle
MRP-3	Leber, Niere, Pankreas, Nebenniere, Magen	nicht bekannt
MRP-4	Prostata, Lunge, Muskel, Pankreas, Testis, Ovar, Gallen- und Harnblase	nicht bekannt
MRP-5	ubiquitär	nicht bekannt
MRP-6	Leber, Niere	nicht bekannt
MRP-7		nicht bekannt

Während die P-gp's eine Vielzahl an neutralen oder gering basischen, organischen Verbindungen transportiert, transportieren MRP-1 bis 3 zusätzlich zu den neutralen organischen Verbindungen auch Medikamente, die an GSH, Glukuronsäure oder Sulfat konjugiert wurden (45 ; 62; 73 ). Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte MRP-1 ist eine ausgesprochene Glutathion-S-Konjugat Pumpe (GS-X). Dieses erklärt die Möglichkeit von MRP-1, Medikamente und Fremdstoffe (Xenobiotika), wie Methotrexat oder Arsenit (H<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub>), nach Konjugation mit Glutathion zu transportieren und damit deren intrazelluläre Konzentration zu vermindern. Trotz einer anderen physiologischen Rolle von MRP-2 (Tab.2), dessen Fehlen zum Dubin-Johnson-Syndrom führt (83), haben MRP-1 und MRP-2 ein ähnliches Substratspektrum mit der Ausnahme, dass MRP-2 eine Cisplatin-Resistenz induziert. Von beiden werden auch Vinka-Alkaloide und Anthracycline transportiert, die an saure Liganden in der Zelle konjugiert wurden. Der Transport dieser Substanzen durch MRP-1 und -2 setzt die Anwesenheit von reduziertem GSH voraus. Hierbei wird ein Kotransport von GSH und dem unkonjugierten Substrat angenommen (64, 65, 87, 86). Weiterhin wird in

Tumorzellen häufig eine simultan erhöhte Expression von MRP-1 und gamma-Glutamylcystein Synthetase gefunden, die die Synthese des GSH katalysiert (55).



**Abbildung 3: Zusammenhang zwischen Glutathion (GSH) und MRP-Transport.** Medikamente (X) werden an GSH mittels Glutathion S-Transferase (GST) konjugiert und durch MRP transportiert bzw. es erfolgt ein Kontransport von GSH und unkonjugierten Medikamenten (Y) (9).

Auch MRP-3 transportiert organische Anionen und bevorzugt ebenfalls GSH-Konjugate als Substrate (54). Es spielt in der Resistenz gegenüber Etoposid und Teniposid nicht aber anderer Medikamente eine Rolle. Hingegen sind MRP-4 bis 6 nicht an einer Resistenz gegenüber Antitumor-Medikamenten beteiligt.

Ebenso wie die Funktion von MDR-1 durch das nicht-immunsuppressiv wirkende Cyclosporin-Analoge PSC833 gehemmt und dadurch ein MDR-Phänotyp überwunden werden kann, sind für MRP-1 bzw. -2 potente, kompetitive Inhibitoren wie Leukotrien C<sub>4</sub>, S-Decylglutathion und der Leukotrien D<sub>4</sub> Antagonist MK-571 bekannt (64,50).

MRP-1 wurde in fast allen Tumorzellen gefunden, ist aber wegen der ubiquitären Verteilung nicht streng assoziiert mit einer klinischen Resistenz gegen Chemotherapeutika. Da es dennoch eine wichtige Position in dem Export von Zytostatika einnimmt, wurde das Augenmerk auf dieses Protein als zweite Resistenzbarriere gelenkt.

#### 1.2.4 Das „Lung Resistance-related Protein“ (LRP)

Das „Lung Resistance-related Protein“ (LRP) wurde in nicht-P-gp exprimierenden Nichtkleinzelligen Lungentumoren (NSCLC) mit einem MDR-Phänotyp gefunden, welches später als „human major vault“ identifiziert wurde (99). Diese Vaults sind komplexe Ribonukleoprotein-Partikel, die aus einem 110 kDa „major vault protein“, drei kleineren Proteinen und einem kleinen RNA-Molekül bestehen (42) (Abb.4).



**Abbildung 4: Modellansicht des intakten Vaults.** Übernommen aus Izquierdo et al. (1996) (42).  
Drei verschiedene Perspektiven des LRP-Modells.

Sie sind im Zytoplasma und an der nukleären Membran lokalisiert und zeigen im normalen Gewebe des Epithels des Bronchus, des Verdauungstraktes, der Keratinozyten und der Makrophagen eine hohe Expression (41). Dieses LRP scheint, neben seiner bis jetzt noch unbekanntem physiologischen Funktion, ein wichtiger Resistenzfaktor gegen MDR-bezogene Medikamente (Doxorubicin, Vincristin) und einigen nicht-klassischen MDR-Medikamenten (Cisplatin, Carboplatin und Melphalan) zu sein (43). In Proben humaner Lungentumore waren in den NSCLC 36% (grosszellige, undifferenzierte Karzinome) bis 83% (squamöse Zell-Karzinome) LRP positiv. Hingegen waren in nur 5% der Kleinzelligen Lungentumore (SCLC), die primär chemosensitiver sind als NSCLC, LRP detektierbar (42). Trotz unterschiedlicher Expressionsmuster, verglichen mit P-gp und MRP, ist LRP wichtig für die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, nicht durch Ausschleusung dieser aus der Zelle, sondern durch Umverteilung innerhalb der Zelle und aktiven Export der Zytostatika aus dem Zellkern in das Zytoplasma.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

In vielfältigen Untersuchungen wurden die Expression und Regulation von MDR-Proteinen besonders in Hepatozytenkulturen von Ratten und Mäusen untersucht und verschiedene exogene und endogene Faktoren als Induktoren dieser Resistenz vermittelnden Proteine erkannt. Die Resistenzmechanismen in Lungentumoren ist weniger gut untersucht, was an der Schwierigkeit der Kultivierung und der Zellausbeute humaner Lungenzellen liegen kann. Klinische Studien zeigten, dass in kleinzelligen Lungentumoren (SCLC) die Prognose von der P-gp Expression abhing (95). SCLC waren primär sensibel gegen eine Chemotherapie und zeigten keine MDR-1 Expression (22). Erst eine erworbene Chemoresistenz zeigte sich bei Rezidiven. Auch Patienten mit P-gp positiven SCLC hatten eine viel kürzere Überlebenszeit als P-gp negative. Weitere Studien zeigten, dass bei nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen in 25-50 % der Patientenproben nur MDR-1 detektiert werden konnte, ohne bisher eine

Beziehung zwischen MDR-1 Expression und Überlebenszeit erkennen zu können (22). Konstantere Expressionsmuster wurden bei den ebenfalls MDR-vermittelnden Proteine MRP-1 und LRP dokumentiert.

Kenntnisse über den Mechanismus einer Regulation von MDR-assoziierten Proteinen wie MDR-1, MRP-1 und LRP könnten dazu beitragen, die Entwicklung und Nutzung von Zytostatika im Sinne der Prävention der Entwicklung einer Resistenz zu beeinflussen.

Von einigen Chemotherapeutika, wie z.B. Anthracycline, ist die Generierung von Superoxide,  $H_2O_2$  und Hydroxyl-Radikalen bekannt.

Ob diese Sauerstoffradikale in humanen Bronchialepithelzellen und in AII-Zell- und Clara-Zell- ähnlichen Lungentumorzellen zu einer Beeinflussung der Expression der MDR vermittelnden Proteine MDR-1, MRP-1 und LRP und damit zu einer Entwicklung einer Chemoresistenz beitragen können, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die durchgeführten Untersuchungen sollten Aufschluss geben über:

- die Expression von MDR-1, MRP-1 und LRP Proteinen in humanen Lungentumorzelllinien mit Clara-Zell ähnlicher und AII-Zell ähnlicher Morphologie
- Unterschiede der Expression von MDR-vermittelnden Proteinen in Lungentumorzellen und dem Expressionsmuster von MDR-1, MRP-1 und LRP in humanen Bronchialepithelzell-Kulturen (NHBEK)
- eine mögliche Induzierbarkeit der MDR-Proteine durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS)
- den Nachweis der Funktionsfähigkeit des P-Glykoproteins MDR-1 mittels Rhodamin 123 und Einfluss von Inhibitoren auf die Transportaktivität
- einen möglichen Funktionsnachweis von MRP-1 mittels Einzelzellfluoreszenzmessung und dessen Hemmung durch MK-571

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1 Zellkulturen

**Normale Humane Bronchialepithelzellen (NHBEZ):** Zur Gewinnung normaler humaner Bronchialepithelzellen wurden humane Bronchusresektate tumorfreier Regionen auf Kollagen/Fibronectin beschichtete Kulturschalen ( $\varnothing$  5,8cm) aufgebracht. Epith-o-ser Medium (CCPro, Neustadt/W.; Germany) ermöglichte das gezielte Auswachsen von Epithelzellen. Immunhistochemische Nachweise bestätigten eine eindeutige Zuordnung zu den Epithelzellen (93).

**Tumorzelllinien:** Bei den verwendeten Tumorzelllinien H358 und H322 handelt es sich um humane Lungentumorzelllinien. Die Zellen wurden von Professor Wiebel, Institut für Toxikologie, Gesellschaft für Strahlenforschung, München bezogen. Die Zelllinie H358 stammt von einem nicht-kleinzelligen Lungentumor. Dabei handelt es sich um Alveolar-Typ II Zellen, die p-53 negativ sind. Ebenfalls von einem nicht-kleinzelligen Lungentumor stammen die Zellen der Linie H322. Vom Zelltyp her handelt es sich um Clara-Zellen mit einer endogenen Mutation im Tumorsuppressorgen p-53. Verglichen mit H358-Zellen besitzen die H322-Zellen ein stärkeres Proliferationspotential.

#### 2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Boehringer (Mannheim) oder Serva (Heidelberg) mit dem höchsten kommerziell verfügbaren Reinheitsgrad bezogen.

#### 2.1.3 Zellkulturreagenzien

epith-o-ser	CCPro,
DMEM Trockensubstanz	Gibco, Berlin
Penicillin / Streptomycin	Serva, Heidelberg
Fetales Kälberserum	CCPro
Trypsin	Sigma, München
Kollagen Typ I aus Rattenschwanz	Becton Dickinson, Bedford, USA
Fibronectin	Sigma, München
L-Glutamin	Sigma, München

### 2.1.4 Reagenzien für Plasmamembranpräparation und Western Blot Analytik

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (68) mit Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merk). Für die Eichkurve wurde Rinderserumalbumin (BSA-V, Paesel&Lorei) verwendet. Von der Firma Sigma wurden Tween 20, Triton X-100, Ammonium-persulfat, N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und die Molekulargewichts-standards (rainbow marker: 46-220kDa,  $\beta_2$ -Mikroglobulin: 180kDa) bezogen. Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) wurde von Bio-Rad (München) verwendet. Die Reagenzien für den Proteinnachweis mittels ECL („enhanced chemiluminescence“) stammen von Amersham. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde neben Tween 20 auch Magermilchpulver (Glücksklee) verwendet. Für die Plasmamembranpräparation nach Simpson et al., (103) wurden zusätzlich Tris-HCl (Gibco BRL), EDTA (SIGMA), Saccharose (Roth), PMSF (USB, Amersham Life Science ) eingesetzt. Weitere Proteaseninhibitoren wie: Aprotinin, Antipain, Leupeptin, Pepstatin, E64, Phenanthrolin, Natriumvanadat (SIGMA) kamen zum Einsatz.

### 2.1.5 Chemikalien für die Northern Blot Analytik

Es wurden nur DNase- und RNase-freie Chemikalien verwendet. Bidestilliertes Wasser wurde mit DEPC (Diethylpyrokarbonat) versetzt und autoklaviert. Außerdem wurden TRIzol<sup>TM</sup>-Reagenz (Gibco BRL, Gathersburgh, MD, USA); Agarose (DNA-Grade), Formaldehyd, Ethidiumbromid (SIGMA); MOPS, Formamid, Heringssperma DNA, T4-Polynukleotid-Kinase (10 I.E./ $\mu$ l) (Boehringer Mannheim); Serdolit MB-1 (Serva, Heidelberg) eingesetzt.

### 2.1.6 Antioxidantien und Oxidantien

DMSO, L(+)-Ascorbinsäure und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden von der Firma Merck bezogen. Paraquat stammte von Sigma.

### 2.1.7 Inhibitoren zellulärer Enzymfunktionen

Der Katalase-Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol, der Inhibitor der gamma-Glutamylcystein Synthetase Buthionin-Sulfoximin (BSO) wurden von Sigma bezogen.

### 2.1.8 Chemosensitizer

Der Hemmer des MDR-1 vermittelten Transportes Verapamil (Isoptin<sup>®</sup>) wurde von Knoll AG und der Inhibitor des MRP-vermittelten Transportes, MK-571, von BIOMOL (Hamburg) bezogen.

### 2.1.9 Primer für die RT-PCR

Für die RT-PCR wurden folgende Primer verwendet: **MDR-1:** 5' CCT ATC ATT GCA ATA GCA GG 3' und 5'GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA 3' (**167 bp Fragment (81)**); **MRP:** 5'CTG AGA AGG AGG CGC CCT G 3' und 5'GTG TCC GGA TGG TGG ACT G 3' (**614 bp Fragment (4)**); **LRP:** 5'CCC CCA TAC CAC TAT ATC CAT GTG 3' und 5'TGG AAA AGC CAG TCA TCT CCT G 3' (**405 bp Fragment (110)**) und für  **$\beta$ -Aktin:** 5'ACG GCT CCG GCA TGT GCA AG 3' und 5'TGA CGA TGC CGT GCT GCA TG 3' (**196 bp Fragment (44)**).

### 2.1.10 Oligonukleotidsonde

Als Oligonukleotidsonde zur MDR-1 Detektion wurde eine einsträngige DNA-Sonde, die antisense orientiert ist, genutzt (Synthese durch NAPS Göttingen GmbH). Diese ist komplementär zu den Positionen 1997-2021 der humanen MDR-1 cDNA (14).

**humanes MDR-1:** 5' CCA CGG ACA CTC CTA CGA GTT GAT C 3'

**humanes MRP:** 614 bp cDNA, (4)

**$\beta$ -Aktin** (human, Maus, Ratte): wurde von Life Science Products Inc. bezogen

5'GGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT CAT C 3'

### 2.1.11 Radioaktiv markierte Verbindungen

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-markiertes ATP (spez. Aktivität 6000 Ci/mmol) wurde von NEN (Bad Homburg) und [<sup>3</sup>H]-markiertes Uridin und Leucin von Amersham bezogen.

### 2.1.12 Antikörper

Das transmembranäre, humane P-Glykoprotein MDR-1 wurde mit isoformspezifischem, monoklonalem Antikörper 6/1C (Kamiya Biomedical Company) detektiert.



Das humane LRP-Protein wurde mittels monoklonalem Antikörper LRP56 (Monosan) nachgewiesen. Für beide Primären Antikörper diente als sekundärer Antikörper ein Peroxidase gekoppelter, gegen humane Proteine präabsorbierter Antikörper (Ziege, anti-Maus; Sigma). Für die MRP-1 Detektion wurde der primäre monoklonale Antikörper MRPr1 (Kamiya Biomedical Company, Ratte) eingesetzt. Der sekundäre, Peroxidase gekoppelte Antikörper stammte von ICN (Ziege, anti-Ratte).

### 2.1.13 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<i>Autoklav</i>	Autoklav 3.021	Schütt, Göttingen
<i>Brutschrank</i>	BBD 6220	Heraeus-Instruments
<i>BAS-Imager</i>	BAS-1500 + Image plates 2040 ( <sup>32</sup> Phosphor-sensitiv) Fujix-Kassette TINA 2.09 /BAS-READER	Raytest-Straubenhardt
<i>Counter:</i>	Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter	Wallac Distrib.GmbH, Freiburg
	Hand-Counter LB122 , β-γ-Detektor	Berthold
<i>Densitometer</i>	TINA 2.09 Flachbett-Scanner	Raytest-Straubenhardt Hewlett Packard
<i>Elektrophorese</i>	<u>horizontale Gelkammer:</u> (automatischer Pufferumwälzung) <u>vertikale Elektrophorese-System</u> Mighty Small SE245 Dual Gel Caster Mighty Small II Vertikal Elektrophorese-Kammer Nasstransfer: „Mini Trans-Blot Cell“	MBO  Hoefler Scientific Instruments (San Francisco, USA)  Bio-Rad
	<u>Stromversorgungsgerät:</u> Phero-Stab 330	Biotec-Fischer
<i>Filmmaterial</i>	Hyperfilm-ECL, -MP	Amersham, Braunschweig
<i>Filterpapier</i>	2668/8, 2043b MGL	Schleicher&Schüll, Dassel
<i>Homogenisation</i>	Ultraturrax T25	IKA-Labortechnik

	Homogenisator / Rührmotor	IKA-Werk RE
	Glashomogenisatoren, Pistill 2, 10, 30ml	Braun, Melsungen
<i>Hybridisierung</i>	Hybridisierungsöfen: Biometra OV5	Biometra, Göttingen
	Hybridisierungsröhrchen (3,5x15cm)	Biometra, Göttingen
<i>Mikroskope</i>	Axiovert 25	Zeiss
	invers Fluoreszenzmikroskop	Nikon
<i>Kamera</i>	CCD-Kamera, UV-Tisch	Raytest-Straubenhardt
<i>Küvetten</i>	Halb-Mikro-Küvetten 1,5ml	Brandt
	Quartz Küvetten 1ml	Hellma
<i>Membranen</i>	PVDF-Membran: Immobilon-P, 0,45µm	Millipore, Eschborn
	Nylon-Membran: Hybond-N, 0,45µm	Amersham/Buchler, Braunschweig
<i>Monochromator</i>	MuLTiscan 2; Xenon Lamp Power Supply Mod 35/75; Sperrfilter für Rhodamin 123	Amko LTI <sup>®</sup>
<i>Photometer</i>	Perkin Elmer, Software: UV-Winlab, Lambda 14	Perkin Elmer
	Fluoreszenz-Inversmikroskop mit Fluoreszenz-Objektiv, Amplifier AFX-DX	Nikon
<i>Röhrchen</i>	Polypropylen mit Schraubdeckel 15+50ml	Sarstedt, Nürmbrecht
	Zentrifugenröhrchen 0,5 / 1,5 / 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
<i>RT-PCR</i>	Master cycler gradient	Eppendorf, Hamburg
<i>Säulen</i>	MicroSpin G-25 Säulen	Pharmacia Biotech,
<i>Schüttler</i>	Taumler, Heidolph Polymax 1040	Schütt, Göttingen
<i>Sterilbank</i>	HERA-safe	Heraeus-Instruments
<i>Sterilfiltration</i>	Filter Sartolab-P-plus (0,2+0,45µm)	Sartorius AG, Göttingen
<i>Scanner</i>	UV-Tisch+CSC-Kamer mit orange-Filter	Raytest-Straubenhardt
<i>Ultraschall</i>	Ultraschallbad Sonorex RK106	Schütt, Göttingen
	Ultraschallsonde	Schütt, Göttingen
<i>UV-Flächenstrahler</i>	312 nm, 356 nm	Faust
<i>Wasserbad</i>	GFL 1083	GFL
<i>Zellkultur</i>	Kulturschalen, Kulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
	Borosilikat „covered-glasses“	Nunc, Wiesbaden
	Einmal-Kunststoffpipette: 1, 5 und 10ml	Nunc, Wiesbaden
	Fuchs-Rosenthal-Kammer	Brandt, Germany
<i>Zentrifuge</i>	XL-100 Ultrazentrifuge	Beckmann-USA

GS-15R Centrifuge	Beckmann-USA
Biofuge fresco	Heraeus Instruments
Eppendorf-Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Sterilisation von Materialien und Lösungen

Hitzebeständige Glas-, Plastikmaterialien und Lösungen wurden durch 25-minütiges Autoklavieren bei 120°C sterilisiert. Nicht hitzebeständige Lösungen wurden sterilfiltriert. Die eingesetzten Sterilfilter (0,45µm oder 0,2µm Porenweite) richteten sich nach Grad der Sterilität und Konsistenz der Lösungen.

### 2.2.2 Splitten und Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzellen wurden in Kulturflaschen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95%-iger Luftfeuchtigkeit in DMEM kultiviert, das 10% FKS (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) (Stammlösung 10'000 I.E./ml) enthält. Das Kulturmedium wurde im 48h Rhythmus erneuert. Nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Tumorzellen mit 10ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin / 0,02% EDTA; in PBS) 5min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50ml Falcon-Zentrifugationsröhrchen überführt und 5min bei 4°C, 130xg zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und die Zellzahl mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Tumorzelllinien H358 und H322 wurden mit einer Dichte von 38'000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und in 80%-igem subkonfluenten Wachstumsstadium in die Versuche eingesetzt.

PBS: NaCl (136 mM); KCl (2,68mM); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8,2 mM);  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,47mM); pH 7,4

### 2.2.3 Isolation und Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen

Durch freundliche Unterstützung von Dr. Dorothee M. Runge, war es möglich, auch normale humane Bronchialepithelzellen (NHBE) in die Experimente mit einzu beziehen. Die Bronchus-Resektate stammen von Lungenteilresektionen. Sofern ein Tumor den Resektionsgrund darstellte, wurden nach pathologischer Begutachtung nur

Bronchusstücke des nicht-tumorösen Bereiches gewählt. Nach mehrmaligem Waschen in sterilem PBS diente L15-Medium als Transportmedium. Der Bronchusbaum wurde vom übrigen Lungengewebe mechanisch, mittels Scheren und Pinzetten, unter sterilen Bedingungen getrennt. Etwa 5 mm<sup>2</sup> Stücke wurden auf zuvor mit Kollagen / Fibronectin beschichteten Kulturschalen ausgebracht und mit 4ml epith-o-ser Medium überschichtet. Zu diesem serum-freien Komplexmedium wurden proliferationsfördernde Zusätze, wie epidermale Wachstumsfaktoren, Rinder-Epiphysenextrakt und Insulin, supplementiert. Antioxidantien waren nicht im Medium enthalten. Nach 3-4 Wochen zeigte sich eine subconfluente Kultur zu über 90% Bronchialepithelzellen. Immunhistochemische Nachweise bestätigten eine eindeutige Zuordnung zu den Epithelzellen (93):

CD 68-negativ (Monozyten/Makrophagen), Cytokeratin 7,8/18, 19-positiv (Epithelium), Desmin-negativ (Muskel), LCA-negativ (T-Zellen/Leukozyten), SMA-negativ (Fibroblasten), Vimentin-negativ (Mesoderm)

#### 2.2.4 Zellkulturmedien DMEM, epith-o-ser und BECG

**a) DMEM:** Dieses für die Tumorzelllinien verwendete Medium enthält als Grundlage Dulbecco's modified Eagle's medium (104), welchem 3,7g Natrium-Bicarbonat je 1L Medium zugegeben wird. Nach Einstellung auf einen pH-Wert von 7,4 wurde das DMEM steril filtriert und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurden 1% Penicillin/ Streptomycin (v/v) (10'000 I.E./ml) und 10% FKS (v/v) hinzugegeben.

**b) epith-o-ser** (CCPro, Neustadt/W., Germany; firmeneigene Formulierung): Epith-o-ser wurde zur Kultivierung von humanen Bronchialepithelzellen genutzt. Diesem serum-freien Medium (500ml) wurden ein Supplement (5ml, firmeneigene Formulierung), L-Glutamin (439,761 mg) und Gentamycin (25mg) substituiert.

**c) BECCG:** Als Alternative zum epith-o-ser Medium wurde das BECCG-Medium (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium, PromoCell) eingesetzt. Zum Grundmedium wurde der mitgelieferte Supplement-Mix unter sterilen Bedingungen hinzugegeben und bei 4°C gelagert.

Supplement-Mix: BPE (0,4 %), epidermaler Wachstumsfaktor (0,5 ng/ml),  
Insulin (5µg/ml), Hydrocortison (0,5 µg/ml), Epinephrin  
(0,5 µg/ml), Triiodothyronin (6,5 ng/ml), Transferrin (10 µg/ml)

Vor Verwendung wurden alle Medien auf 37°C erwärmt.

### 2.2.5 Zellzählung und Wachstumskurve

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Auszählung mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer und Verwendung des Zeiss Axioskop 20 Mikroskopes. Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Tumorzelllinien wurde die Zellzahl während der Kulturdauer bestimmt und daraus die Generationszeit berechnet. Die Generationszeit ist die für eine Verdopplung der Zellzahl benötigte Zeit und wie folgt zu berechnen:

$$t_g = \frac{\log 2 \times dt}{\log N - \log N_0}$$

dt = Kulturzeit  
N<sub>0</sub> = Zellzahl zum Zeitpunkt Null  
N = Zellzahl zum Ablesezeitpunkt

### 2.2.6 Vitalitätstest

Als Indikator für die Vitalität der Zellen nach Exposition der verwendeten Testsubstanzen diente der MTT-Test (72). Dieser Test basiert auf der Umwandlung des schwach gelben 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromides (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen zum dunkelblauen, unlöslichen Formazan. Die Farbstoffbildung ist zur Aktivität der Dehydrogenasen proportional und proportional zur Überlebensrate der Zellen. Hierbei kann aber nicht zwischen der Gesamtreaktion einer Zellpopulation und der Reaktion einzelner Zellen der Population unterschieden werden. Nach 30 minütiger Inkubation des MTT/PBS-Gemisches (0,5mg/ml MTT) bei 37°C erfolgte nach Waschen der Zellen mit PBS die Aufspaltung der Zellen und Lösen des Formazans mit saurem Isopropanol (95% (v/v) Isopropanol, 5% (v/v) Ameisensäure), Abzentrifugation der Zelltrümmer und photometrische Bestimmung des Formazans bei 570 nm. Die Versuchsansätze wurden als Dreifachbestimmungen angesetzt. Alle genutzten Substanzen (Vit.C, DMSO, ATZ, BSO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PQ) wurden in verschiedenen Konzentrationen ausgetestet, um subtoxische Bereiche zu ermitteln (Vitalität >80%).

### 2.2.7 <sup>3</sup>H-Uridin Inkorporationsstudien

Um Einflüsse der ausgewählten Substanzen auf die Bildung der RNA in den Tumorzellen zu eruieren, wurde ein Inkorporationsassay unter Verwendung von Tritium markiertem Uridin durchgeführt. Die kultivierten Zellen wurden nach Testsubstanzexposition mit <sup>3</sup>H-Uridin haltigem Medium (3 µCi pro 2ml) überschichtet und bei 37°C für 4h inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurde 2ml eiskalte 10%-ige Trichlor-essigsäure (TCA) hinzugegeben, die Zellsuspension in 15ml Falcon Zentrifugations-

röhrchen überführt und 5 min mit 700xg zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit TCA gewaschen und schließlich mit 1ml NaOH (1M) gelöst. Die Aktivität und damit das eingebaute  $^3\text{H}$ -Uridin wurde mittels Szintillationszähler (Wallac) gemessen.

### 2.2.8 Abbruch der Kultivierung

Zur Präparation von Plasmamembranen wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, im flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur Aufarbeitung gelagert. Für die Gesamtproteingewinnung wurden die Zellen nach dem Waschen (PBS) mit einem Zellschaber und TBE-Puffer (inklusive Proteaseinhibitoren) abgeschabt und in ein 2ml Eppendorf Röhrchen überführt. Die im TBE-Puffer aufgenommenen Zellen wurden in einem 2ml Homogenisationsgefäß und passendem Pistill mit 10 Hüben bei 2000 u/min durch Scherkräfte und durch anschließende Ultraschallbehandlung auf Eis (3x10s bei 200W) homogenisiert. Zellen, die mit IP-Puffer (92) aufgenommen wurden, sind 20min bei 13'000 u/min (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert worden. Es entstanden zwei Fraktionen. Im Überstand befinden sich Zytoplasten und Mikrosomen der Zellen während im Pellet Cytoskelett, Membranbestandteile und Kerne vorhanden sind.

TBE-Puffer (1-fach): 90mM Tris-Borat, 1mM EDTA

Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer):

**2xIP-Puffer:** 2% Triton X-100, 300mM NaCl, 20mM Tris pH=7,4, 2mM EDTA,  
2mM EGTA, Proteasen-Inhibitoren

**Proteaseninhibitoren (50ml):**

0,15ml PMSF (0,5M Stammlsg);

+je 250 $\mu\text{l}$  der 200fach Stammlösung von: Aprotinin, Leupeptin, Antipain,  
Pepstatin, Na-Vanadat, E64,  
Phenanthrolin

+10ml 5-fach TBE-Puffer (bzw. 25ml 2-fach IP-Puffer)

ad 50ml Bidest

### 2.2.9 Präparation von Zellmembranen

Für die Präparation der Plasmamembran wurde eine differentielle Ultrazentrifugation modifiziert nach Simpson et al. (103) durchgeführt.

#### a) Homogenisation von Zellen

Zur Gewinnung der Plasmamembranproteine wurden zuerst die Zellen homogenisiert. Für die Tumorzelllinien wurden ca.  $2 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Diese wurden mit 3x3ml

TES (4°C, mit PMSF) unter Zuhilfenahme eines Gummischabers abgeschabt. Danach wurden sie in ein 30ml Homogenisationsgefäß überführt, das Volumen mit TES auf 20ml ergänzt und jeweils durch 10 Hübe bei 1400 u/min mit einem Teflonpistill homogenisiert.

### **b) Fraktionierung der Zellhomogenate**

Die erhaltenen Homogenate wurden in einer Beckman Kühlzentrifuge (XL-100 Ultra-zentrifuge) 30min bei 4°C mit 17'000xg zentrifugiert (Festwinkelrotor Beckman Ti70). Der Überstand (Mikrosomen-enthaltende, zytoplasmatische Fraktion) wurde abgenommen. Das Sediment, welches die Plasmamembranen, Kerne und Mitochondrien enthält, wurde nach Resuspension in 2ml TES-Puffer in ein 2ml Wheaton Homogenisationsgefäß überführt und durch 12 Hübe bei 2000 u/min homogenisiert. Nach dem Spülen von Glasgefäß und Pistill (1ml TES, 5 Hübe 2000 u/min) wurde das Homogenat auf ein vorgelegtes 38,3%-iges Saccharosekissen aufgeschichtet. Anschließend folgte eine Dichtegradientenzentrifugation in einem Ti 40 SW Ausschwingrotor (Beckman) für 1h bei 4°C mit 100'000xg. Die sich in der Interphase befindliche Plasmamembranfraktion wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit 4-5ml TES-Puffer aufgefüllt, austariert und ein weiteres mal 1h mit 100'000xg bei 4°C zentrifugiert. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte im TBE-Puffer mit zugesetztem Proteaseninhibitorcocktail. Anschließend wurde ein Aliquot für die Proteinbestimmung abgenommen. Der Hauptteil wurde im flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

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

Zur Hemmung der Serin-Proteasen wurden dem TES-Puffer und dem Saccharosekissen kurz vor Gebrauch 1mM PMSF (gelöst in Ethanol) zugesetzt.

#### **2.2.10 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gesamtzellextrakten und Plasmamembranfraktionen wurde in Anlehnung an die Methode nach Lowry et al. (68) durchgeführt. 2-5µl Proteinlösung ad 50µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O wurden mit 150µl 0,1M NaOH auf 200µl ergänzt. Nach Zugabe von 1ml Lowry-Gemisch erfolgte eine Inkubation bei RT (10

min). Von dem zuvor 1:1 verdünnten Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz wurden zum Testansatz 200µl hinzugegeben, gut gemischt und 30min bei RT inkubiert. Die nachfolgende photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte bei 578 nm (Perkin Elmer Photometer). Die Berechnung der Konzentration wurde mit der UV-WinLab (Lambda 14) Software durch eine jeweils parallel vermessene Eichreihe (0-20µg/ml BSA) durchgeführt. Volumenunterschiede von der BSA-Stammlösung (1µg/ml) in der Eichreihe wurden mit TE-Puffer ausgeglichen. Jede Proteinbestimmung wurde als Doppelbestimmung angesetzt.

Das Lowry-Gemisch bestand aus Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1M NaOH [2%(w/v)], CuSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O [0,5% (w/v)] und Kalium-Natriumtartrat [1%(w/v)] in den Volumenanteilen von 50:1:1.

### 2.2.11 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte durch ein denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel mit einem Acrylamidanteil von 7,5% unter Verwendung eines diskontinuierlichen Vertikal-Elektrophorese-Systems. Die Puffersysteme wurden in Anlehnung an die Methode von Laemmli et al.(57) eingesetzt. Da die hier untersuchten Membranproteine sowohl glykosyliert als auch phosphoryliert sind, welches die Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Polyacrylamid-Gel verlangsamt und damit höhere Molekulargewichte vortäuscht, wurde zum Puffersystem Borat hinzugegeben (TBE-Puffer). Borat hängt sich hierbei an die Zuckerreste, welche im Puffersystem nicht mit SDS beladen werden, und verleiht ihnen im basischen Milieu zusätzliche negative Ladungen.

#### a) Herstellung von vertikalen SDS-Polyacrylamid-Minigelen

Zum Gießen der SDS-Polyacrylamid-Minigele wurde eine „Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster“- Kammer genutzt (Plattengröße: 85x100mm). Das 7,5%-ige Trenngel und 4%-ige Sammelgel waren wie folgt zusammengesetzt:

<u>Trenngel 7,5% *</u>		<u>Sammelgel 4% *</u>	
Trenngelpuffer	2,03 ml	Sammelpuffer	520 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	2,0 ml	bidest. H <sub>2</sub> O	620 µl
Borat (0,5M)	1,8 ml	Borat (0,5M)	600 µl
Acrylamidlösung	1,95 ml	Acrylamidlösung	260 µl
Ammoniumpersulfat (10%-ige Lösung)	78,0 µl	Ammoniumpersulfat (10%-ige Lösung)	20 µl
TEMED	7,8 µl	TEMED	2 µl



\* alle Angaben bezogen auf ein SDS-Polyacrylamidgel

Trenngelpuffer: Tris-HCl (1,5 M), SDS (0,014 M), pH=8,8

Sammelgelpuffer: Tris-HCl (0,5 M), SDS (0,14 M), pH=6,8

Der pH-Wert von Trenngel- und Sammelgel-Puffer wurde mit 1N HCl eingestellt.

Acrylamidlösung: 30% Acrylamid/Bis; Solution 29:1 (Bio-Rad Laboratories)

Alle Komponenten des Trenngels wurden zusammen pipettiert, gemischt und 10 min mit der Wasserstrahlpumpe entgast. Nach Zugabe von TEMED wurde das Trenngel gegossen und mit 1% SDS überschichtet. Nach Auspolymerisation bei RT wurde das SDS mit einer stumpfen Kanüle abgesaugt, der Gelkamm eingesetzt (10-zählig; 1,5 mm dick) und das entgaste und mit TEMED versetzte Sammelgel gegossen. Dieses polymerisierte in 15-30 min bei 37°C aus. Danach wurde das Gel in die Elektrophoresekammer umgespannt, mit Elektrophoresepuffer überschichtet und der Gelkamm gezogen.

#### **b) Probenvorbereitung**

Für die Detektion von LRP oder MRP-1 wurden 50µg Gesamtprotein bzw. 50µg Pelletfraktion (20 min. Zentrifugation bei 13'000 u/min aus Protein/IP-Puffer-Gemisch) je Probe mit TBE-Puffer auf ein einheitliches Volumen gebracht. 50µg Plasmamembran wurde für den Nachweis von MDR-1 und MRP-1 eingesetzt. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer (2xLSB) versetzt, 3min bei 95°C denaturiert (Reduktion von S-S-Brücken und vollständiges Lösen der Proteine) und auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Als Anhalt für das Molekulargewicht wurde immer ein Molekulargewichtsstandard (Rainbowmarker: 46-220 kDa; β<sub>2</sub>-Makroglobulin=180 kDa, Sigma) mitgeführt. Dieser Marker-Mix wurde wie die Proben behandelt.

#### 2x Blaupuffer für SDS-Proteingel (2xLSB):

0,1M Tris  
2% (w/v) β-Mercaptoethanol  
70mM SDS  
20% (w/v) Glycerin  
0.002% (w/v) Bromphenolblau

#### Elektrophoresepuffer (8x):

Glycin 1,92 M  
Tris 0,25M  
SDS 1,8mM  
Borat 10mM  
ad 1L pH=8,4 mit konz. HCL

pH = 6,8 (Lagerung bei -20°C)

Nach dem Auftauen wurde der 2xLSB mit 6% (w/v) (Endkonzentration) 1,4-Dithiothreitol versetzt. Der Elektrophoresepuffer wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf eine einfach konzen-

trierte Lösung verdünnt. Die Vertikal-Elektrophorese wurde unter Wasserkühlung mit 15 mA/Gel (Sammelgel) bzw. nach Übertritt der Proteinbanden in das Trenngel mit 25mA/Gel durchgeführt.

### 2.2.12 Nass-Transfer

Die aufgetrennten Proteine wurden durch Nass-Transfer auf Immobilon-PVDF-Membran transferiert. Um das SDS zu entfernen, wurde das Gel 2x10 min in den Transferpuffer getaucht. 5% zugesetztes Methanol verzögerte zwar den Elektrotransfer, verbesserte aber die Elution von Proteinen. Die PVDF-Membran wurde durch Methanolbehandlung aktiviert, in H<sub>2</sub>O bidest. gespült und im Transferpuffer äquilibriert. In den Spannrahmen wurden Filterpapier, Polyacrylamidgel und PVDF-Membran eingespannt und in die Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte mit 18h , 280 mA unter Kühlung.

Transferpuffer: Tris (48 mM), Glycin (39 mM), SDS (0,0375 % (w/v)), Borat(10 mM), Methanol (5% (v/v)), pH 8,3

### 2.2.13 Färbungen

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran mit Ponceau-S angefärbt (5min) und anschließend der Hintergrund mit bidest. H<sub>2</sub>O von der Membran gewaschen. Die Banden des Molekulargewichtsstandards wurden markiert, überschüssige Membran entfernt und fotodokumentiert.

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

Das Polyacrylamid-Gel wurde 15min in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und anschließend mittels Entfärber entfärbt. Im Gel zurückgebliebene Proteinreste blieben blau. Somit war es möglich, die Effizienz des Transfers zu beurteilen.

<u>Coomassie-Blau-Stammlösung (xfach):</u>	<u>Entfärbelösung:</u>
Coomassie-Brillantblau R250 1% (w/v)	Methanol 10% (v/v)
Methanol 5% (v/v)	Eisessig 7,6% (v/v)
in 50%-iger (w/v) Trichloressigsäure	

Zur Herstellung der Coomassie-Blau-Gebrauchslösung wurde die Stammlösung mit 50%-iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) verdünnt.

### 2.2.14 Immunchemischer Nachweis der Proteine

Die PVDF-Membran wurde durch Methanol und  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. aktiviert und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  im Puffer-A + 0,1% (v/v) Tween + 5% Magermilchpulver (1g Fett / 100g Granulat) zum Blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen der Matrix inkubiert. Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten bei RT. Die abgesättigte Membran wurde kurz in Puffer-A gewaschen und 2h mit dem primären Antikörper (1:1000) in Puffer-A + 5% Magermilchpulver inkubiert (Taumler). Zum Entfernen überschüssiger Antikörper wurde die Membran anschließend 3x5min mit Puffer-A + 0,1% (v/v) Tween + 1% Magermilchpulver gewaschen. Der sekundäre, mit Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelte Antikörper wurde anschließend 1h in einer 1:3000 Verdünnung in Puffer-A + 0,1% (v/v) Tween + 1% Magermilchpulver offen weiter inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (5x10min in Puffer-A + 0,1% (v/v) Tween, Horizontalschüttler) wurde die Membran mit dem Peroxidasesubstrat Luminol und dem Cosubstrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bestandteile des ECL-Kits [Amersham]) überschichtet. Die Membran wurde nach 1minütiger Einwirkzeit auf eine Glasplatte blasenfrei gelegt und in Saran<sup>®</sup>-Folie eingeschlagen. Die durch die POD und Substrate erzeugte Chemilumineszenz wurde mit ECL-Filmen in Autoradiographiekassetten detektiert. Die Expositionszeit variierte von 5s bis zu 30min.

Puffer-A: Tris (10 mM), NaCl (154 mM), pH 7,4

Die Austestung der monoklonalen Antikörper erfolgte zuerst mit Proteinen humaner Hepatozyten, welche von Dr. D. Runge (Klinik für Innere Medizin, MLU-Halle) zur Verfügung gestellt wurden. Sowohl MDR-1, MRP-1 und LRP ließen sich mit unterschiedlicher Expression in Kultur nachweisen (91).

### 2.2.15 Isolation von RNA

Die Isolierung der gesamt-RNA erfolgte nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (17) mittels Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurden jeweils  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  kultivierte Zellen mit 1ml TRIzol<sup>™</sup> überschichtet, mit Zellschabern von der Kulturplatte geschabt, in ein 2ml Eppendorf Zentrifugationsröhrchen überführt und 5min bei RT stehengelassen. Chloroform (200 $\mu$ l) wurde für 3min bei RT hinzugegeben. Eine Zentrifugation von 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $12'000 \times g$  führte zur Trennung von RNA- (oben), DNA- (mitte) und Proteinfractionen

(unten). Die RNA-haltige Fraktion wurde in ein neues Dolphin-Tube überführt, mit Isopropanol (Verhältnis 1:1,5) versetzt und geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation (15min, 4°C, 12'000xg) wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 1ml eiskaltem Ethanol zweimal gewaschen. Das Pellet wurde bei geöffnetem Deckel 5min bei 60°C getrocknet, in 50µl HPLC-reinem DEPC- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert, für 3min bei 60°C erhitzt und danach auf Eis gestellt. Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 5µl RNA-Probe in 995µl DEPC- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> pipettiert und 1h bis zur Messung auf Eis stengelassen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 260 und 280nm. Das Verhältnis der Absorption bei 260/280nm lässt Schlüsse über die Reinheit der RNA zu. Im Idealfall liegt dieses bei 2. Bei der eingesetzten Verdünnung der RNA von 1:200 entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1,0 einer Konzentration von 8µg RNA / µl Stammlösung. Zum Schutz vor RNAsen wurden zur Reinigung von Schabern und Pipetten 50 mM NaOH-Bad, UV-Licht-Bestrahlung und das Reinigungsmittel RNase-Stop (Appllichem) angewendet. RNase-freies H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> wurde durch Behandlung mit dem starken RNase-Inhibitor Diethylpyrokarbonat (0,1% DEPC ) und anschließendem Autoklavieren hergestellt.

### 2.2.16 Herstellung von horizontalen denaturierenden Agarosegelen

Für die Auftrennung von RNA wurde eine denaturierende, horizontale Gelelektrophorese eingesetzt. Zur Denaturierung diente das im Probenpuffer enthaltene Formamid und das formaldehydhaltige Agarosegel. Die mRNA wurde in einem 1%-igen Agarose-Gel (Trennung der RNA mit 0,5 bis 7 kbp) auftrennt. In einem autoklavierten Gefäß wurden 1g Agarose, 10ml 10-fach konzentrierter 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Puffer (USB Amersham, Life Science) und 76 ml DEPC- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bis zum vollständigen Lösen aufgekocht. Nach Abkühlen auf 50°C wurde 14 ml 37%-iges Formaldehyd hinzugegeben (Endkonzentration 3,7%) und das Gel luftblasenfrei gegossen.

MOPS (10-fach): MOPS (0,2 M), Natriumacetat (50 mM), EDTA (10 mM)

pH 7,0 ; sterilfiltriert

### 2.2.17 Probenvorbereitung

30µg RNA wurden pro Bahn eingesetzt. Die eingesetzten RNA-Mengen wurde mit DEPC- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf ein einheitliches Volumen gebracht. Jeder Probe wurde 10-fach MOPS, 37%-iges Formaldehyd und Formamid zur entsprechenden Endkonzentration

von 10% (v/v), 2,2M und 50% (v/v) zugesetzt und 1/5-tel des Endvolumens mit Blaupuffer hinzugegeben.

Blaupuffer:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,005 M), Bromphenolblau (0,45 % (w/v)), Glycerin (13,7 M)

Blaupuffer und Ethidiumbromidlösung (1mg/ml, Merk) wurden im Verhältnis 50:1 kurz vor Gebrauch gemischt. Zum Deionisieren von Formamid wurden 50ml Formamid unter sterilen Bedingungen 30 min mit 5g Serdolit MB-1 Ionenaustauscherharz gerührt und anschließend über einen Faltenfilter das Austauscherharz abfiltriert. Das deionisierte Formamid wurde aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.18 Elektrophorese

Das auspolymerisierte Agarosegel wurde mit 1-fach konzentriertem MOPS-Puffer überschichtet und die Kämme gezogen. In die entstandenen Taschen wurden die Proben pipettiert und eine konstante Spannung von 80 Volt angelegt. Die gleichmäßige Beladung des Geles wurde mittels UV-Durchlicht geprüft und mit der CCD-Kamera dokumentiert. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der RNA und ermöglichte die Visualisierung der 28S und 18S rRNA Banden (interner Molekulargewichtsstandard).

### 2.2.19 RNA-Transfer auf Nylonmembranen

Der sich an die elektrophoretische Auftrennung anschließende Kapillartransfer der RNA auf Nylonmembran lehnte sich an die Methode nach Southern et al. (1975) (105) an. Die Nylonmembran (0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße) wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  benetzt und in 2xSSC (Standard-Natrium-Citrat-Puffer) äquilibriert. Der zuvor mit 2xSSC befeuchtete Docht (Filterpapier) überragte die Glasplatte, so dass seine Enden in die Pufferwanne tauchten. Hierauf wurden von unten nach oben zwei weitere Filterpapiere, das Gel mit Taschenöffnung nach unten, Nylonmembran und vier Lagen Filterpapiere luftblasenfrei platziert. Das Gel wurde mit Parafilm zu allen Seiten hin abgedichtet. In das Pufferreservoir wurden 800ml 20xSSC gefüllt. Der Aufbau wurde mit saugfähigen Kleenex-Tüchern überschichtet (10-15cm), die mit einem Gewicht (800g) beschwert wurden. Die Transferzeit betrug 24 bis 48h. Zur Überprüfung der Transferleistung wurde nach Abbruch des Transfers das Restgel unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert. Im Anschluss an den Transfer wurde die Nylonmembran 10min in 2xSSC gespült und im feuchten Zustand 2-3min mit UV-Licht bestrahlt, um die RNA zu fixieren. Bromphenolblau, Ethidiumbromid und Salze wurde mit  $95^\circ\text{C}$  heißer 1xSSC+ SDS (0,05%) Lösung

und heißem H<sub>2</sub>O <sub>bidest.</sub> entfernt. Anschließend wurde die Membran getrocknet, eingeschweißt und lichtgeschützt aufbewahrt oder gleich der Prähybridisierung zugeführt.

20xSSC: NaCl (3 M), Trinatriumcitrat (0,3 M), pH 7,0

### 2.2.20 Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot

#### 2.2.21 Markierung von Oligonukleotiden

Zur radioaktiven Markierung der Oligonukleotide wurde das <sup>32</sup>Phosphat in  $\gamma$ -Position von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch die T4-Polynukleotid-Kinase auf das 5'-Ende der Oligonukleotide übertragen. Für den Markierungsansatz wurden 50 pmol (MDR-1, MRP-1) Oligonukleotid (=3 $\mu$ l), 1 $\mu$ l 10-fach konzentrierter 37°C warmer Reaktionspuffer (Boehringer) und 5 $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (600Ci/mmol) eingesetzt. Zum Starten der Reaktion wurde 1 $\mu$ l T4-Polynukleotid-Kinase zugegeben und der Ansatz für 1h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde mit eiskaltem 0,1M EDTA gestoppt. Anschließend wurden die markierten Oligonukleotidsonden über eine MicroSpin G25 Sephadex-Säule (Pharmacia) von freiem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP gereinigt. Nach Vortexen und Zentrifugieren (1min bei 735xg) der Säule wurde der Markierungsansatz auf die Mitte der Sephadex-Säule pipettiert und für weitere 2 min zentrifugiert. Die Radioaktivität des Eluats wurde im Abstand von 50 cm mit dem Radioaktivitätsmonitor ermittelt. Dem Eluat (Markierungsansatz) wurde 300 $\mu$ l Heringssperma DNA-Lösung zugesetzt (Stammlösung: 10mg/ml).

#### 2.2.22 Nachweis von mRNA durch Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-markierten Sonden

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurden die Membranen für mindestens 2h bei 38°C (MDR-1,  $\beta$ -Aktin) bzw. bei 58°C (MRP) im Hybridisierungssofen mit der Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde der Markierungsansatz hinzugegeben und 16h bei entsprechender Temperatur hybridisiert. Nach Abbruch der Hybridisierung wurde die überschüssige Ladung durch mehrmaliges Waschen beginnend mit 37°C aufsteigend und abnehmender Salzkonzentration (2xSSC / 0,1% SDS (w/v); 1xSSC / 0,1%SDS (w/v) und 0,1xSSC / 0,1%SDS (w/v)) entfernt. Die Aktivitätsmessung erfolgte mit dem  $\beta$ - $\gamma$ -Counter in 1cm Abstand. Das Waschen wurde bei Erreichen einer konstanten Aktivität beendet.

Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte mittels Bio-Imaging-Analyzer, BAS 1500. In einer Autoradiographiekassette wurde auf die markierte Membran die [<sup>32</sup>P]-sensitive Nachweisplatte 4-24h aufgelegt. Die Abschirmung natürlicher Umgebungs-

strahlung erfolgte durch Bleiabschirmung. Danach wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham) aufgelegt und für 3 Wochen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  exponiert.

Prähybridisierungslösung: NaCl (0,9 M), Trinatriumcitrat (0,09 mM), deionisiertes Formamid (50% (v/v)), SDS (17 mM), Denhardts-Lösung (10% (v/v), 50-fache Lösung), Heringssperma (denaturiert) 400 $\mu\text{g/ml}$

Denhardts-Lösung stammte von Merck. Heringssperma (Stammlösung 10mg/ml) wurde mit Ultraschall behandelt, um 500-700kb große DNA-Fragmente zu erhalten. Die Kontrolle erfolgte über ein 2%-iges Agarosegel. Die Denaturierung der Heringssperma-DNA erfolgte durch Kochen bei  $95^{\circ}\text{C}$ , 5 min und anschließendem Abkühlen auf Eis.

### 2.2.23 RT-PCR

2 $\mu\text{g}$  der isolierten RNA wurden auf ein einheitliches Volumen von 2 $\mu\text{l}$  gebracht. Nach einem DNase I -Verdau erfolgte mit den unter 2.1.9 erwähnten Primern eine reverse Transkription und eine nachfolgende Amplifikation. Dabei wurde für MDR-1 ein 167 bp Fragment bei einer Annealing-Temperatur von  $55^{\circ}\text{C}$  und 28 Reaktionszyklen gebildet. Unter gleichen Bedingungen entstand das cDNA-Fragment von MRP (613 bp; Annealing-Temperatur  $56^{\circ}\text{C}$ , 30 Zyklen), LRP (405 bp; Annealing-Temperatur  $55^{\circ}\text{C}$ , 28 Zyklen) und  $\beta$ -Aktin (196 bp;  $55^{\circ}\text{C}$  Annealing-Temperatur, 25 Zyklen). Die PCR begann mit einer initialen Denaturierung bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 2min gefolgt von 25-30 Zyklen von 30 s Denaturierung ( $94^{\circ}\text{C}$ ), 30 s Annealing bei 55 oder  $56^{\circ}\text{C}$  und 45 s Elongation bei  $72^{\circ}\text{C}$ . Im letzten Zyklus wurde eine 15 minütige Elongation bei  $72^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Expression von MDR-1, MRP- und LRP-mRNA wurde mit der RT-PCR und den entsprechenden Primern an der RNA humaner Hepatozyten ausgetestet (91).

### 2.2.24 Bestimmung des reduzierten Glutathions

Das Glutathion (GSH) ist das Tripeptid für Glutamylxysteinylglycin. Es ist ein spezifischer, niedermolekularer SH-Gruppenträger. Von den nicht-proteingebundenen SH-Gruppen im Gewebe sind mindestens 95% Glutathion. Der Nachweis der SH-Gruppen erfolgte mit dem Ellmann's Reagenz (5,5-Dithiohis-2-Nitrobenzoesäure, DTNB, 19,8mg/5ml ) unter Ausbildung einer Disulfidbindung zwischen der SH-Gruppe des Glutathions und einem Molekül Thionitrobenzoesäure. Das zweite Molekül Thionitro-

benzoesäure bedingt eine starke Gelbfärbung des Ansatzes, welche photometrisch gemessen wurde (Methode nach Ellmann et al. (24); Henninghausen (37)).

-0,1M K-Na-Phosphatpuffer nach Sörensen (P-Puffer):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1M),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,1M), EDTA (1,861g/l), pH= 8,0

-10%-ige TCA-EDTA-Lösung: EDTA (372 mg /l), TCA (10 % (v/v)),  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

-Glutathion, reduziert (Merck): 2mM Stammlösung

Die Lungentumorzellen H358 und H322 ( $2 \times 10^7$  Zellen) wurden in 2ml 0,25M Saccharose im Eisbad homogenisiert. Zur Proteinfällung wurden 2ml Homogenat mit 2ml 10%-iger TCA-EDTA-Lösung versetzt und 10-20 min geschüttelt. Nach Zentrifugation (455 u/min, 15 min; Biofuge fresco, Heraeus) wurde der Überstand abgenommen. Diesem proteinfreien Überstand wurden P-Puffer und DTNB hinzugefügt und nach 20min die Extinktion bei 412 nm photometrisch ermittelt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Eichreihe mit reduziertem GSH mitgeführt und der errechnete GSH-Gehalt auf die gemessene Proteinmenge pro Ansatz umgerechnet.

### **2.2.25 Messung der MDR-1 abhängigen Transportaktivität**

Zur Untersuchung der funktionellen Aktivität von MDR-1 wurden Influx- und Efflux-Studien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-123 (Rho-123) durchgeführt. Rho-123 gilt als spezifisches Substrat für MDR-1 (114). Dabei diffundiert Rho-123 passiv durch die Zellmembran und wird in MDR-1 positiven Zellen sehr schnell durch aktiven Efflux (MDR-1 Transport) aus der Zelle in den extrazellulären Raum transportiert. Diese Verminderung der intrazellulären Konzentration von Rho-123 läßt sich spezifisch u.a. durch Verapamil hemmen (79, 59). Den spezifischen Transport von Rho-123 durch MDR-1 wurde durch weitere Studien, die eine spezifische Bindung von Rho-123 an das P-Glykoprotein zeigten, untermauert (78). Nach photometrischer Charakterisierung von Rho-123 (Fluoreszenz-Photometer SFM 25) erfolgte die Etablierung der Bestimmung intrazellulären Farbstoffes mittels Einzelzellfluoreszenz-Messung an Rattenhepatozyten. Influx- und Efflux-Studien zeigten eine Korrelation zwischen der *mdr1b*-Transportaktivität (MDR-1, human), Kulturdauer und Hemmbarkeit durch Verapamil.

Die Transportstudien wurden an den Lungentumorzelllinien und NHBE, kultiviert auf Kammerdeckgläschen mit 0,8mm dünnem Borosilikatglas-Boden (NUNC), mit der hierfür entwickelten Technik der Einzelzellfluoreszenz-Messung am inversen Fluoreszenz-Mikroskop durchgeführt. Mit dem Fluoreszenz-Inversmikroskop, Amplifier



AFX-DX und monochromatischem Licht (Exzitation= 460nm, Emmission im Sperrfilterbereich mit einem Maximum bei 490 nm gemessen) wurden abwechselnd Nullwert (530nm Exzitation) und Emmission des intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffes Rho-123 mit 30 Messungen pro Sekunde und 10s Messdauer durchgeführt. Der Strahlengang des induzierten Fluoreszenzlichtes in den einzelnen Zellen erfolgte rückwärts über Borosilikatglas, Immersionsöl, Fluoreszenz-Objektiv, Sperrfilter/ Umlenkspiegel, Amplifier. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte rechnergestützt (GEM, DSCAN-Software Amko LTI<sup>®</sup>) wobei für jeden Messpunkt der absolute Wert und Hintergrund durch „linear fit“ ermittelt wurde. Die Einzelzellmessung bietet sich besonders bei nur wenig zur Verfügung stehenden Zellen an, wie bei den NHBEC's gegeben. Dieses stellt den großen Vorteil der hier entwickelten Methode dar. Weiterhin erübrigt sich die Relativierung auf die Proteinmenge, wie in herkömmlichen photometrischen Verfahren praktiziert, da der gemessene Wert sich auf eine gesamte Zelle bezieht.

#### **2.2.26 Messung der MRP-1 abhängigen Transportaktivität**

Zur Untersuchung der MRP-1-Funktion wurde dieselbe Versuchsanordnung wie zur MDR-1-Funktionsprüfung verwendet. Der spezifische Fluoreszenzfarbstoff, der durch MRP-1 transportiert wird, stellte 5,6-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF; 30µg/ml; Molecular Probes) (19) dar. Das CDF wurde in seiner Eigenschaft als Fluoreszenzfarbstoff ebenfalls untersucht und zeigte ein ähnliches Spektrum wie Rho-123. Die spezifische Hemmung der MRP-Transportaktivität (30) erfolgte mit dem MRP-Inhibitor MK-571 (20µg/ml; Biomol).

#### **2.2.27 Auswertung der durchgeführten Experimente**

Die Experimente wurden, wenn möglich, als Dreifachbestimmung unabhängiger Kulturplatten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden von repräsentativen Versuchen dargestellt und als arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ ) angegeben. Um Schwankungen der mRNA- und Protein-Grundexpression zwischen den Versuchen zu relativieren, wurden die Kontrollwerte jeweils 100% gesetzt und die Messwerte der Versuchspunkte auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

Arithmetischer Mittelwert: 
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$n$  = Anzahl der Einzelmessungen;  $x_i$  = Messwert einer Einzelmessung

Bei der Mittlung von Messwerten unabhängiger Kulturplatten wurde zur Abschätzung des Messfehlers der Einzelmessungen die Standardabweichung (SD) angegeben.

Standardabweichung: 
$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde der arithmetische Mittelwert mit (MW) und die Standardabweichung mit (SD) bezeichnet.

Die Signifikanz der erhaltenen Daten wurde unter Verwendung des t-Testes (nach Student) für ungepaarte bzw. gepaarte Werte ermittelt. Hierbei wurden die Mittelwerte  $\bar{x}_1$  und  $\bar{x}_2$  zweier Vergleichsgruppen mit der Stichprobengröße  $n_1$  und  $n_2$  unter Berücksichtigung der Varianzen der Meßergebnisse  $(SD)^2$  miteinander verglichen. Die errechneten t-Werte wurden mit den Werten aus einer Tabelle für die t-Verteilung verglichen. Waren die berechneten t-Werte größer als die für eine angenommene statistische Sicherheit von  $P = 95\%$  angegebenen t-Werte, wurde von signifikanten Ergebnissen ausgegangen. Als Signifikanzniveau, also die Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Aussage nicht zutreffend ist, wurde  $p = 1-P$  angegeben. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurden als Signifikanzniveaus \*  $p < 0,01$  und \*\*  $p < 0,001$  unterschieden.

$$SD^2 = \frac{SD_1^2 (n_1 - 1) + SD_2^2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2} \quad t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{SD} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

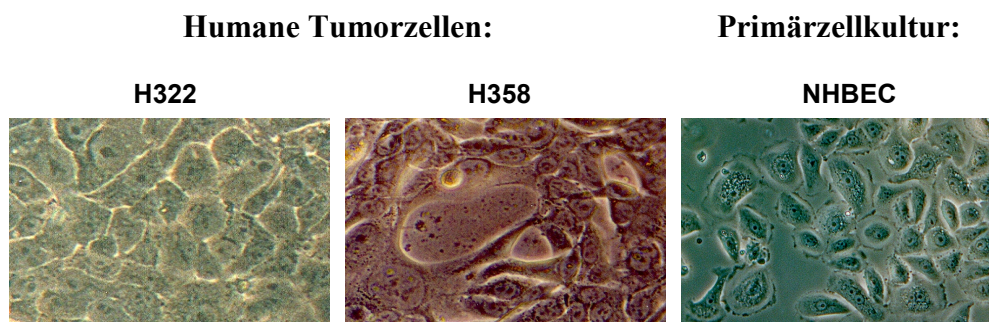
### 3. Ergebnisse

Eine Vielzahl von neoplastischen Veränderungen ( z.B. Lungentumore, hepatozelluläre Karzinome) zeigen häufig eine intrinsische d.h. nicht durch Chemotherapeutika induzierte Expression von multidrug-resistance Proteinen vergesellschaftet mit einer primären Resistenz gegenüber einem großen Spektrum an nicht strukturverwandten Chemotherapeutika. Klinische Studien zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von MDR und fehlendem Erfolg einer Chemotherapie bei kleinzelligen Lungentumoren (95) .

Ein Teil der Wirkung von zytotoxischen Substanzen, die in der Chemotherapie eingesetzt werden, beruht auf der Bildung intrazellulärer Radikale. Die endogenen Regulationsmechanismen dieser Überexpression sind noch weitgehend ungeklärt.

In den nachfolgenden Experimenten wurde deshalb das Expressionsmuster und die Funktion der drei wichtigen Vertreter dieser Resistenzproteine MDR-1, MRP-1 und LRP in Abhängigkeit von Promotoren reaktiv oxidativer Substanzen (ROS) in Lungentumorzellen und Normalen humanen Bronchialepithelzellen untersucht.

#### 3.1 Zellkulturen der verwendeten Lungenzellen



**Abbildung 5:** H322= nicht-kleinzelliges Karzinom der Lunge, Clara-Zell ähnlich; H358= nicht-kleinzelliges Karzinom, AII-Zell ähnlich; NHBEC= normale humane Bronchialepithelzellen

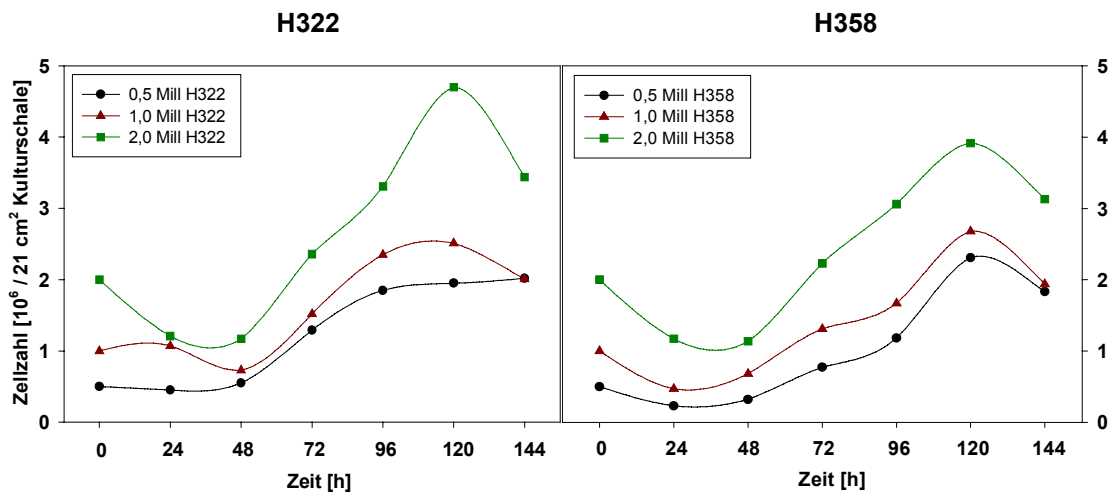
#### 3.2 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Lungentumorzelllinien

##### 3.2.1 Wachstumskurve und Generationszeit

Um gleichbleibende Bedingungen für die Versuche definieren zu können, wurde das Wachstumsverhalten der humanen Tumorzelllinien (H358, H322) untersucht.

Die Wachstumskurven sowohl der Clarazell-ähnlichen H322 als auch der AII-Zell-ähnlichen H358 zeigen ein ähnliches Verhalten. Nach Aussaat der Zellen nimmt innerhalb der ersten 48h die Zellzahl pro Kulturschale ab mit anschließender,

kontinuierlicher Zunahme der Zellzahl bis 120h (Abb.6). Zu diesem Zeitpunkt bieten die Zellen ein konfluentes Zellbild. Beide Tumorzelllinien wachsen während der gesamten Kulturdauer in einem Monolayer und nicht übereinander (dreidimensional).



**Abbildung 6: Wachstumsverhalten humaner Lungentumorzelllinien.**

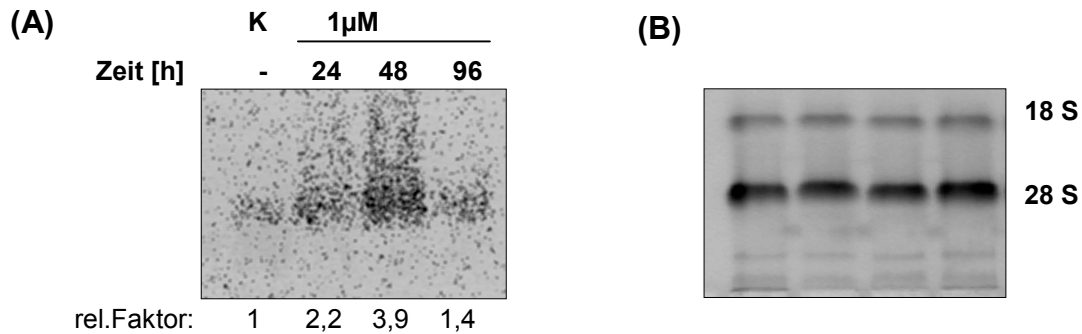
Ausplattung: 0,5 ,1 oder 2 Millionen Zellen pro Kulturschale ( $21 \text{ cm}^2$ ); Abtrypsinierung, Bestimmung der Gesamtzellzahl mit der Fuchs-Rosenthal Kammer (MW,n=3)

Die errechnete Generationszeit beträgt für die H322 Zellen im linearen Wachstumsbereich ca. 60 h und für die H358-Zellen ca. 80 h. Die Generationszeit drückt aus, wieviel Stunden die Zellen brauchen, um eine neue Generation hervorzubringen. Alle durchgeführten Experimente wurden in einem Zeitintervall zwischen 48 und 120h nach Zellaussaat durchgeführt, um Schwankungen, bedingt durch Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit, mit den daraus resultierenden Unterschieden in RNA- und Proteinsynthese, zu reduzieren.

### 3.3 Expression der MDR-1-mRNA in humanen Tumorzelllinien

Um zu untersuchen, ob die humanen Lungentumorzelllinien MDR-1-mRNA bilden und diese in ihrer Expression stimulierbar ist, wurden die Tumorzellen in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Doxorubicin – ein typischer Induktor des P-Glykoproteins MDR-1 - bis zu 96h kultiviert. Aufgrund der vielfältigen Wirkung des Zytostatikums ( Interkalation mit der DNA, Hemmung der RNA- und Proteinsynthese, Bildung intrazellulärer Radikale) wurde zur Konzentrationsfindung neben dem MTT-Vitalitätstest (25) der  $^3\text{H}$ -Uridin Inkorporationsassay verwendet. Er zeigte einen signifikanten Abfall der RNA-Synthese (auf ca. 40%, $p < 0,001$ ) durch Doxorubicin ( $> 1 \mu\text{M}$ , 20h) ohne Beeinflussung des MTT-Wertes (Ergebnis nicht gezeigt). Wie in Abb.7 gezeigt, induzierte  $1 \mu\text{M}$  Dororubicin nach 48h die MDR-1-mRNA Menge (4-fach gesteigert), welche nach 96 h wieder auf

Kontrollwertniveau sank. Somit konnte die Expression und Induzierbarkeit der MDR-1-mRNA unter Doxorubicin-Einfluss nachgewiesen werden.



**Abbildung 7: Induktion von MDR-1 mRNA durch Doxorubicin.** (A) Northern Blot Analyse (25µg RNA / Bahn). Clara-Zell ähnliche Lungentumorzellen H322 wurden in An- oder Abwesenheit von 1µM Doxorubicin (Doxo) 24h-96h kultiviert. K= Kontrolle, relative Faktor = densitometrische Auswertung der Bindung der  $[^{32}\text{P}]$ -markierten Sonde. (B) Ethidiumbromid gefärbtes Gel (28S- und 18S-rRNA) als Beladungskontrolle.

### 3.4 Vitalitätstest –MTT der verwendeten Substanzen

Alle eingesetzten pro- und antioxidativen Substanzen wurden mittels Vitalitätstest ausgetestet, um nicht zytotoxische Konzentrationen zu erreichen:

**Tab.3:**

Substanz	Konzentration	Vitalität bei H322	Vitalität bei H358
Doxorubicin (20h)	1µM	100% 61,2	100% 62,01
	5µM	91% 60,37	86% 67,4
	10µM	55% 65,9	83% 64,6
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20h)	0,5mM	93% 62,9	89% 67,23
	1mM	85% 64,54	77% 65,84
	2mM	46% 64,84	36% 65,21
Paraquat (20h)	50µM	92% 62,7	94% 64,26
	100µM	85% 66,9	80% 67,55
	500µM	66% 66,7	65% 612,7
1mM BSO+Parquat (20h)	50µM	91% 60,87	91% 63,3
	100µM	73% 65,35	69% 611,1
	500µM	43% 65,89	38% 67,6
Ascorbinsäure (24h)	1mM	124% 64,25	97% 63,1
	5mM	129% 67,41	84% 64,3
	10mM	105% 65,51	72% 65,5
DMSO (24h)	1% (v/v)	93% 63,67	94% 63,1
	2% (v/v)	60% 61,07	73% 64,72
	4% (v/v)	47% 62,99	41% 66,87
BSO (20h)	0,5mM	101% 64,13	102% 62,13
	1mM	100% 60,96	100% 64,17
	2mM	98% 62,75	100% 68,29
3-Amino-1,2,4-triazol (20h)	1mM	97% 68,24	109% 68,89
	10mM	88% 610,84	98% 61,36
	50mM	90% 60,56	94% 65,59

n>3, Standardabweichung angegeben (6), Kontrolle wurde auf 100% gesetzt.

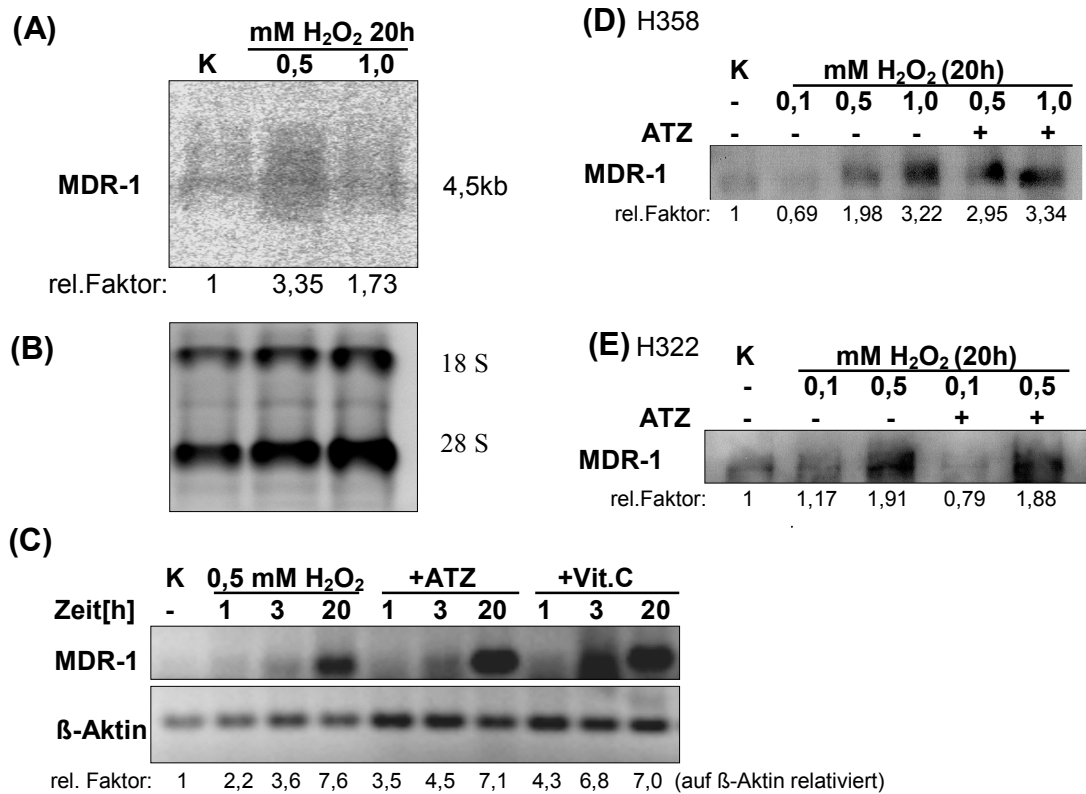
### **3.5 Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf die Expression der Multidrug-Resistance Proteine in Lungentumorzellen**

Um den Einfluss von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf die Expression der Multidrug-Resistance Proteine in den von Lungentumoren abstammenden Zellreihen H322 und H358 zu untersuchen, wurden das Herbizid Paraquat und als Vergleichssubstanz  $H_2O_2$  verwendet. Paraquat induziert intrazellulär reaktive Moleküle mit oxidativer Potenz wie  $H_2O_2$ , Hydroxylradikale, Superoxidanionen und Singulett-sauerstoff.

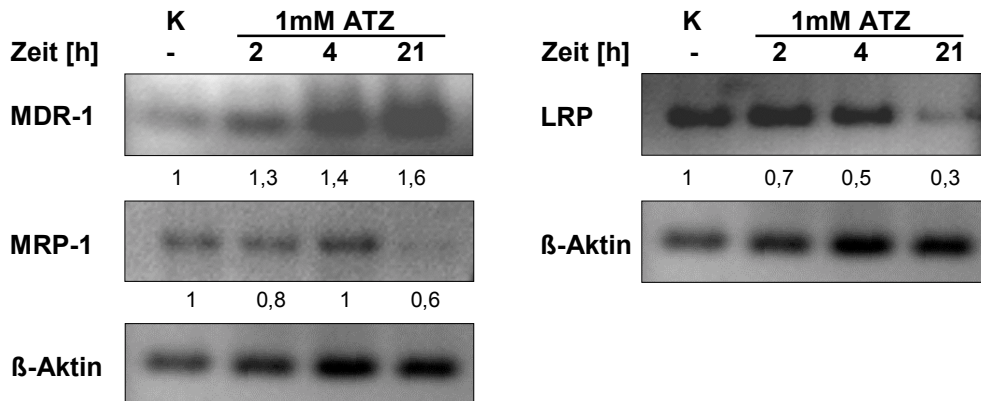
#### **3.5.1 $H_2O_2$ als Induktor des P-Glykoproteins MDR-1 in humanen Lungentumorzelllinien**

Als Modellsubstanz für die Erzeugung eines oxidativen Stresses wurde  $H_2O_2$  gewählt. Ein möglicher Einfluss von  $H_2O_2$  auf die MDR-1-mRNA- und Protein-Expression von AII-Zell ähnlichen und Clara-Zell ähnlichen humanen Lungentumorzelllinien wurde untersucht. Dabei wurden  $H_2O_2$  sowie die antioxidativen und prooxidativen Substanzen in Konzentrationen eingesetzt, die nicht zytotoxisch wirkten.

Wie in Abb.8A dargestellt, führte eine Inkubation der H322-Zellen mit 1,0 und 0,5 mM  $H_2O_2$  für 20h zu einer 1,7 bzw. 3,4 fachen Erhöhung der intrinsischen MDR-1-mRNA-Expression. Auch die sensitivere RT-PCR zeigte eine zeitabhängige Überexpression der MDR-1-mRNA mit einem Anstieg auf das 7,5 fache nach 20h gegenüber der Kontrolle (K) (Abb.8C). Um die Spezifität der Effekte von  $H_2O_2$  auf die MDR-1-mRNA-Expression zu prüfen, wurden im jeweiligen Versuchsansatz Zellen mitgeführt, die 1h mit 1mM des Katalasehemmstoffes ATZ (107) vorinkubiert wurden, bevor sie ebenfalls mit  $H_2O_2$  behandelt wurden. Zur Abschwächung der radikalischen Wirkung wurden die Zellen 20h vor  $H_2O_2$  Exposition mit 1mM Vit.C als Antioxidans beladen. Auf RT-PCR Ebene zeigte sich keine Veränderung der mRNA-Expression nach  $H_2O_2$  Gabe durch eine Vorinkubation mit ATZ. Andererseits bewirkt eine alleinige Behandlung der Zellen mit 1mM ATZ über den selben Zeitraum eine Überexpression der MDR-1-mRNA (um 60% nach 21h ATZ) (Abb.9). Eine Vorbehandlung mit Ascorbinsäure führte nicht zu einer Abschwächung der MDR-1 mRNA Synthese. Die RT-PCR der H358-Zellen zeigte das selbe Ergebnis wie die der H322 und wurde deshalb nicht gesondert dargestellt.



**Abbildung 8: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermittelte Induktion von MDR-1 und Hemmung durch Antioxidantien.** (A) Northern Blot Analyse (25µg RNA/Bahn). H322-Zellen: MDR-1-mRNA nach 20h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) Ethidiumbromid gefärbtes Gel.=Kontrolle zu (A); (C) RT-PCR Analysen. Mit 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte H322-Zellen in An- oder Abwesenheit von 1mM 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ; 1h v.i.) oder 1mM Ascorbinsäure (Vit.C, 20h v.i.). K=Kontrolle. In (D) H358 und (E) H322 sind Western Blot Analysen gezeigt. Plasmamembranproteine, MDR-1 Detektion. (ATZ) wurde 1h vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appliziert.

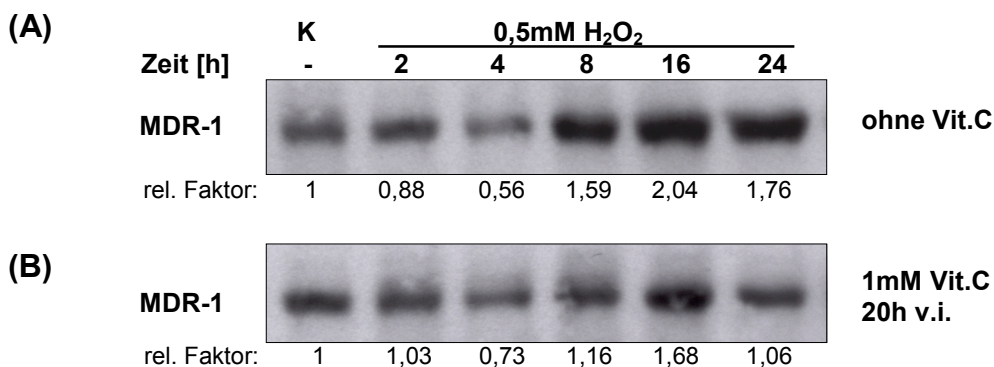


**Abbildung 9: Einfluß von 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) auf die MDR-1-, MRP- und LRP-mRNA Synthese in Lungentumorzellen.** RT-PCR-Analyse. H358 wurden mit 1mM ATZ für 2-21h inkubiert. K=Kontrolle, β-Aktin=Beladungskontrolle. Angegeben ist die densitometrische Auswertung (auf β-Aktin relativiert).

Außerdem war von Interesse, wie sich die MDR-1 Protein-Expression unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Einfluss verändert. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an der Plasmamembran zu einer Lipidperoxidation führt, ist auch eine Störung des membranständigen MDR-1 zu vermuten. Deshalb wurde zur spezifischen Anreicherung des MDR-1 die Plasmamembran isoliert. Eine Detektion der Western Blots mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern gegen das P-Glykoprotein

MDR-1 ergab eine Induktion des intrinsisch gering exprimierten Proteins durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb.8 D+E). Die H322-Zellen reagierten mit einem maximalen Anstieg von MDR-1 durch 20h 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW=1,7360,17, n=3). Die Vorbehandlung mit 1mM ATZ zeigte keinen zusätzlichen Effekt. Die MDR-1-Protein Expression wurde in den H358-Zellen durch 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 20h maximal stimuliert (MW=3,260,5; p<0,001). Die Vorbehandlung mit 1mM ATZ zeigte eine signifikante Verstärkung des MDR-1 Proteins durch 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um 50% (MW=3,360,313, p<0,001) gegenüber einer alleinigen Inkubation mit 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW=1,8960,23).

Wie in Abb.10 zu sehen ist, führte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer Induktion von MDR-1-Protein, maximal ausgeprägt nach 16h mit einer 2fach höheren Proteinmenge (H358: MW= 1,876 0,74; H322 (nicht gezeigt): MW=1,7660,17). Ebenfalls in dieser Abbildung dargestellt ist die Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Vit.C vorbehandelte Zellen. Die Präsenz von Vit.C reduzierte die MDR-1 Protein-Expression und -Induktion durch 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 24h um 40% (H358, MW=1,0660,06) bzw. um 36% (H322 (nicht gezeigt): MW=1,1360,24).



**Abbildung 10: Einfluss von Vitamin C auf die Expression von MDR-1 Protein in H358 Tumorzellen.** Western Blot Analyse. H358 Zellen wurden (A) 2-24h mit 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder (B) 20h 1mM Vitamin C mit nachfolgendem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5mM, 2-24h) behandelt. Relativer Faktor = densitometrische Auswertung im Verhältnis zur Kontrolle (K).

### 3.5.2 Paraquat als MDR-1 Induktor in humanen Lungentumorzelllinien

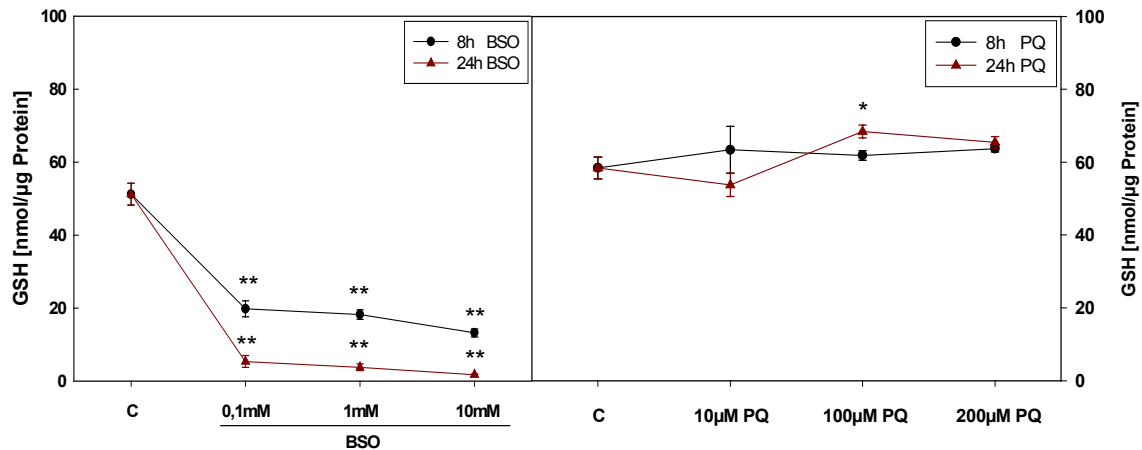
Das Herbizid Paraquat (PQ) wurde wegen seiner spezifischen Anreicherung in Lungenzellen (39) und der kontinuierlichen intrazellulären Bildung von Superoxidradikalen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen ausgesucht. Diese Radikale können durch GSH unter Mithilfe der Glutathionperoxidase schnell und effizient abgefangen werden.

Um zu untersuchen, in wieweit dieser Resistenzmechanismus Einfluß auf die Expression und Funktion der Multidrug-Resistance Proteine hat und wie stark die Auswirkungen von Buthionin-Sulfoximin (BSO) auf den GSH-Pool sind, wurde der GSH-Gehalt in den Tumorzellen bestimmt. Beide Tumorzelllinien zeigten das selbe Verhalten auf die

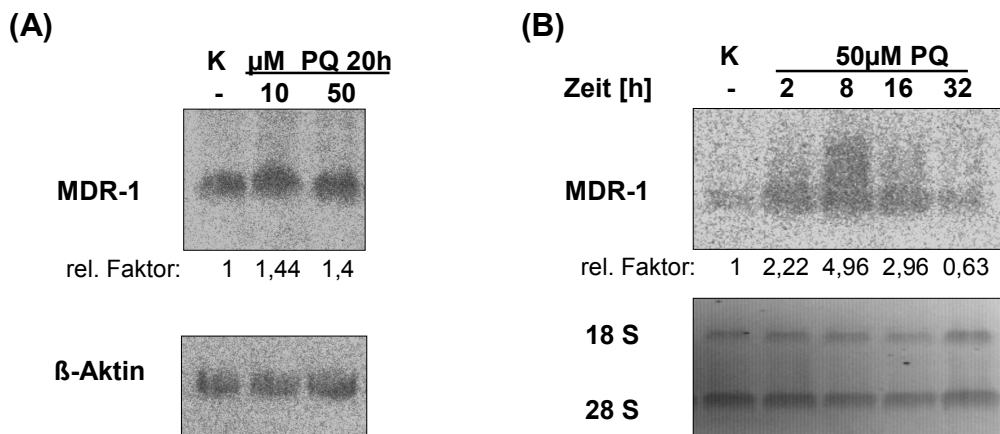


untersuchten Einflüsse wie BSO und PQ auf den GSH-Gehalt. Hier gezeigt anhand der Zelllinie H358 (Abb.11). BSO senkte den intrazellulären GSH-Gehalt nach 8h um 61,3% (0,1mM BSO) bzw. 64,4% (10mM BSO), nach 24h um 89,5% (0,1mM BSO) bzw. 96,5% (10mM BSO). Paraquat bewirkte kaum eine Änderung der intrazellulären GSH-Konzentration. Für 100 $\mu$ M PQ kann von einem tendenziellen Anstieg von +17% ausgegangen werden.

**Abbildung 11: Einfluss von Buthionin-Sulfoximin (BSO) und Paraquat (PQ) auf das reduzierte Glutathion (GSH) der Tumorzellen.** 3 Tage kultivierte H358 wurden mit BSO oder



PQ für 8h und 24h inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des reduzierten GSH gemessen. MW  $\pm$  SD einer Dreifachbestimmung. \*\* =  $p < 0,001$ ; \* =  $p < 0,01$

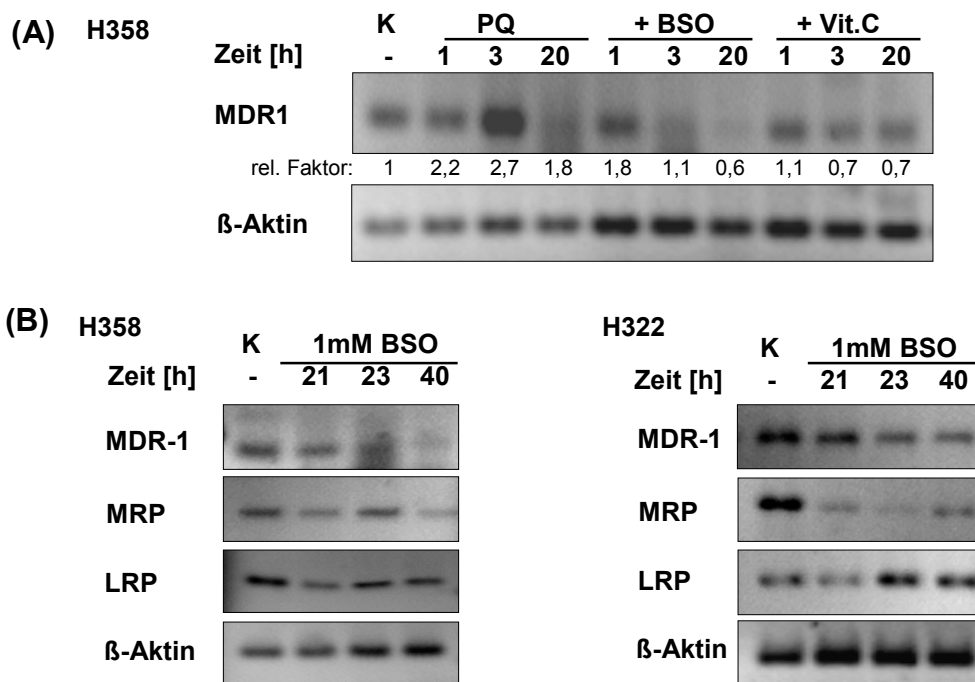


**Abbildung 12: Einfluss von Paraquat (PQ) auf die MDR-1-mRNA-Expression.** Northern Blot Analysen (25 $\mu$ g RNA/Bahn). (A) H322: 20h kontinuierlich mit 10 oder 50  $\mu$ M PQ inkubiert. (B) H358: mit 50 $\mu$ M PQ 2h-32h behandelt. Relativer Faktor = densitometrische Auswertungen als Verhältnis zur Kontrolle (K). Ethidiumbromid gefärbtes Gel als Beladungskontrolle.

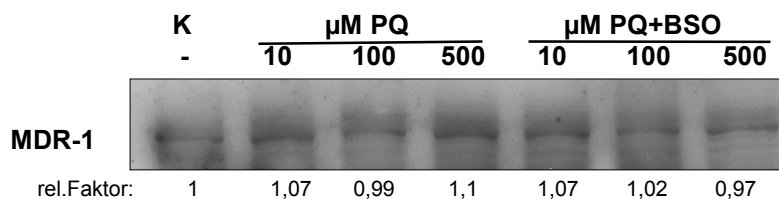
Angelehnt an die Versuchsbedingungen für  $H_2O_2$  wurde die Wirkung von PQ induzierten Radikalen auf die MDR-1 Expression untersucht. Eine Assoziation zwischen der intrazellulären GSH-Menge und oxidativer Schädigung der Zellen durch Paraquat wurde beschrieben (10). BSO vermindert den GSH-Gehalt der Zellen (Abb.11) und kann somit die radikalische und toxische Wirkung von PQ erhöhen (Tab.3). Paraquat steigerte

die MDR-1-mRNA Expression (Abb.12+13). Unter dem Einfluss von BSO und Vit.C verminderte sich die gebildete MDR-1-mRNA (H358 exemplarisch gezeigt, H322 zeigte dieselben Reaktionen).

Da BSO vorbehandelte Zellen auf PQ bedingte Radikale nicht wie erwartet reagierten, wurde der alleinige Effekt von BSO auf die MDR-1-mRNA untersucht. Dabei zeigte sich unter gleichen Zeit- und Konzentrationsbedingungen, dass durch BSO die Synthese der MDR-1-mRNA in Korrelation mit  $\beta$ -Aktin abnahm (H322 um 90%, H358 um 24% nach 40h 1mM BSO) (Abb.13B).



**Abbildung 13: Expression von MDR-1 mRNA unter Paraquat (PQ) und verändertem Glutathiongehalt durch Buthionin-Sulfoximin (BSO).** RT-PCR Analyse. H358 wurden mit 50 $\mu$ M PQ 1h, 3h oder 20h behandelt. 1mM BSO oder 1mM Vit.C wurden 20h vor PQ-Exposition vorinkubiert. (A) Effekte von PQ, PQ mit BSO- bzw. Vit.C- Vorinkubation auf die MDR-1 mRNA. rel.Faktor = densitometrische Auswertung (auf  $\beta$ -Aktin relativiert)(B) BSO-Wirkung auf die mRNA-Expression von MDR-1, MRP und LRP.  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle.



**Abbildung 14: Wirkung von Paraquat (PQ) auf die MDR-1 Protein-Expression in humanen Lungentumorzellen.** Western Blot Analyse. H322-Zellen wurden mit 10, 100 und 500 $\mu$ M PQ über 20h inkubiert. 1mM BSO wurde 20h vorinkubiert. Eingesetzt wurden jeweils 50 $\mu$ g Plasmamembranprotein. rel. Faktor = densitom. Auswertung, K=Kontrolle

Für das MDR-1 Protein scheinen diese Veränderungen auf mRNA-Ebene wenig Auswirkungen zu haben. Wie aus der Abb. 14 hervorgeht, führte eine 20 stündige Be-

handlung mit 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M oder 500 $\mu$ M PQ mit und ohne 1mM BSO Vorinkubation nicht zu einer Änderung des MDR-1-Proteingehaltes.

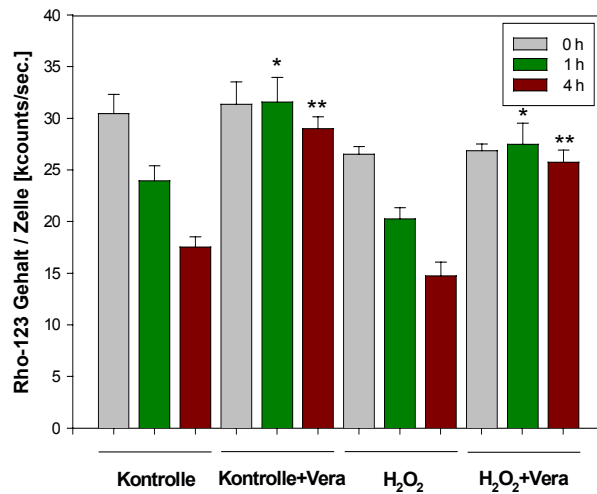
### **3.6 P-Glykoprotein vermittelter Rhodamin-123 -Transport in Lungentumorzelllinien**

Um die Funktionalität der Überexpression des P-Glykoproteins MDR-1 in AII-Zell ähnlichen H358 und Clara-Zell ähnlichen H322 Lungentumorzelllinien zu untersuchen, wurde die Methode der Einzelzellfluorometrie für adhärent wachsende Zellen zur Bestimmung der MDR-1 abhängigen Transportaktivität mittels Rhodamin-123 (Rho-123) etabliert (siehe Methoden).

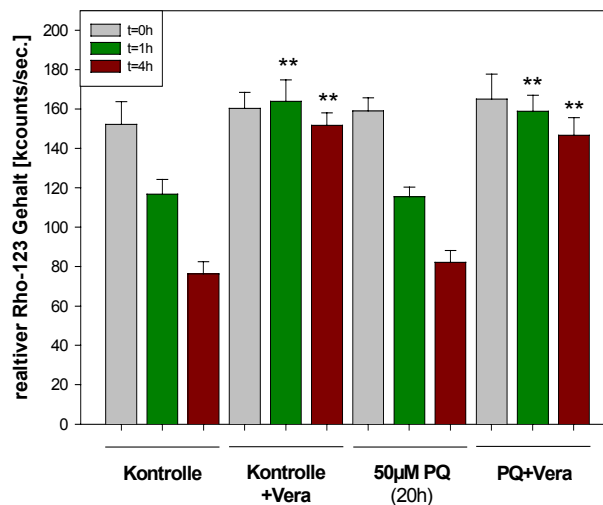
Sowohl die H322 als auch die H358 Zellen zeigten dieselben Verhältnisse zwischen P-Glykoproteinmenge und intrazellulärer Rho123-Konzentration. Deshalb wird im folgenden exemplarisch jeweils eine der Zelllinien graphisch dargestellt.

#### **3.6.1 Hemmbarkeit des MDR-1 vermittelten Transportes**

Nach Beladung der Zellen mit Rho-123 wurden die zuvor 4d in Kammerdeckgläschen kultivierten Zellen zum Zeitpunkt Null, nach 1h und 4h mittels Einzelzellfluoreszenzmikroskopie vermessen. Dabei zeigte sich eine schnelle und starke Abnahme des Rho123-Gehalts der Zellen (Abb.15). Wurde zum Zeitpunkt Null dem Medium 10 $\mu$ M Verapamil zugegeben, zeigte sich eine signifikante Retention des Farbstoffes durch eine funktionelle Hemmung des P-Glykoproteins. Eine Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einer Überexpression von MDR-1-Protein (Abb.8D+E). Wurden diese mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorbehandelten Zellen 4h mit Rho123 inkubiert, kam es aufgrund des erhöhten MDR-1-Proteinspiegels zu einer verminderten Retention an Rho123 schon zum Zeitpunkt Null (Abb.15). Der anschließende ungehemmte Efflux über 1 und 4h verhielt sich ähnlich dem Efflux der unbehandelten Zellen (K). Eine Hemmung des aktiven Effluxes konnte durch Zugabe von 10 $\mu$ M Verapamil erreicht werden. Die Behandlung der Lungentumorzelllinien mit PQ führte, wie in Abb.14 gezeigt, nicht zu einer Veränderung der MDR-1 Proteinmenge. Dieses Ergebnis schlug sich auch im Funktionsassay des Proteins nieder. Wie in Abb.16 dargestellt, zeigte sich kein Unterschied in der Rho123 Konzentration der PQ-behandelten und unbehandelten Zellen.



**Abbildung 15: Hemmung der MDR-1 abhängigen Transportaktivität in humanen Tumorzelllinien.** H322 wurden 4h mit 2,5µg/ml Rho-123 inkubiert. Der aktive Efflux von Rho-123 durch MDR-1 und Hemmbarkeit durch 10µM Verapamil (Vera) wurde an nativen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen gemessen (0,5mM, 20h). Bestimmung von Rho-123 durch Einzelzell-Fluorimetrie. Gezeigt sind MW±SD einer Vierfachbestimmung. \*= p<0,01 ; \*\*= p<0,001



**Abbildung 16: MDR-1 Funktionsnachweis an Paraquat behandelten H358.** Nach Behandlung mit 50µM Paraquat (PQ, 20h) wurden die Zellen 4h mit Rho-123 (2,5µg/ml) inkubiert. Der relative intrazelluläre Gehalt von Rho-123 wurde bestimmt. Hemmung des aktiven Effluxes erfolgte durch Verapamil (Vera). Gezeigt sind MW ± SD, n=4; \*\*=p<0,001.

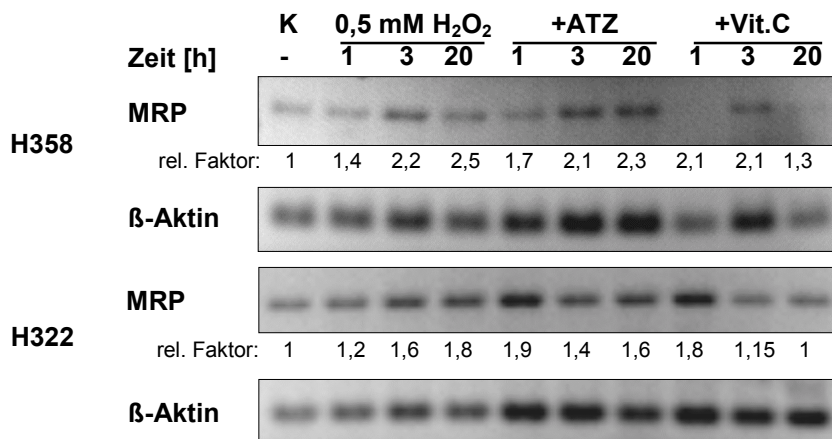
### 3.7 Das Multidrug-Resistance-associated Protein (MRP) als weiterer Vertreter der Resistenzproteine in Tumorzellen

In der MRP-Unterfamilie wird MRP-1 für den Transport von Zytostatika und Fremdstoffen (Xenobiotika) verantwortlich gemacht. Somit nimmt MRP-1 einen wichtigen Platz in der Entwicklung von Resistenzen gegen eine Vielzahl von Chemo-

therapeutika und Xenobiotika ein. Im weiteren wurde die Expression und Funktion dieses Proteins in den AII- und Clara-Zell-ähnlichen Lungentumorzelllinien untersucht.

### 3.7.1 Expression von MRP-mRNA in Lungentumorzelllinien

Um zu prüfen, ob die intrazelluläre Freisetzung von ROS eine Induktion von MRP vermitteln könnte, wurden die Lungentumorzelllinien H322 und H358 mit  $H_2O_2$  behandelt. Zur Identifizierung der ROS-spezifischen Wirkungen auf die Expression von MRP wurden die Zellen 1h mit 1mM 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) oder 20h mit 1mM Ascorbinsäure (Vit.C) vorbehandelt. Die Hemmung der Katalase durch ATZ führt zu einer intrazellulären Erhöhung von ROS. Dem entgegengesetzt wirkt Vit.C protektiv gegenüber Radikalen. In beiden Lungentumorzelllinien zeigte sich in der RT-PCR ein zeitabhängiger Anstieg der MRP-mRNA (Abb.17) nach  $H_2O_2$ -Exposition. Diese ließ sich durch das prooxidativ wirkende ATZ nicht verstärken. Eine 20 stündige Vorinkubation mit 1mM Vit.C führte nach 3 und 20h  $H_2O_2$  Exposition zu einer Verminderung der MRP-mRNA Expression.

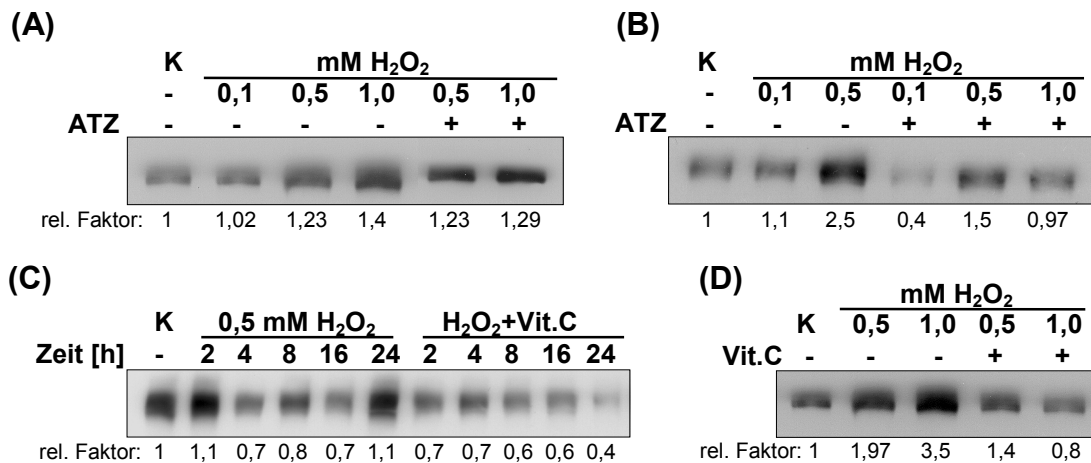


**Abbildung 17: Einfluss von  $H_2O_2$  die MRP-mRNA in H322 und H358 Tumorzellen.** RT-PCR Analysen. Die Behandlung erfolgte mit 0,5mM  $H_2O_2$  für 1-20h mit und ohne Vorbehandlung der Zellen durch Vit.C (1mM, 20h) oder ATZ (1mM, 1h). Relativer Faktor=densitometrische Bestimmung von MRP, korreliert auf  $\beta$ -Aktin.

### 3.7.2 Induktion von MRP-1-Protein durch $H_2O_2$

In den folgenden Experimenten wurde der Wirkung von  $H_2O_2$  auf die MRP-1- Protein-Expression untersucht. Dabei schienen H322 sensibler auf diesen Stress zu reagieren als die H358 (Abb.18). 1,0mM  $H_2O_2$  (20h) führte zu einer maximalen Überexpression von MRP-1 Protein bei den H322 (MW=3,6160,32) und H358 (MW=1,3860,08). Eine 1 stündige Vorinkubation mit ATZ bewirkte eine Abnahme des MRP-1 Proteingehaltes um 34% in den H322-Zellen, jedoch keine Veränderung bei den H358. In der zeitlichen Verlaufsbeobachtung zeigte sich, daß  $H_2O_2$  eine zeitweise Verminderung mit nachfol-

gender Überexpression (24h) von MRP-1 Protein in der Plasmamembran bewirkte (Abb.18C).



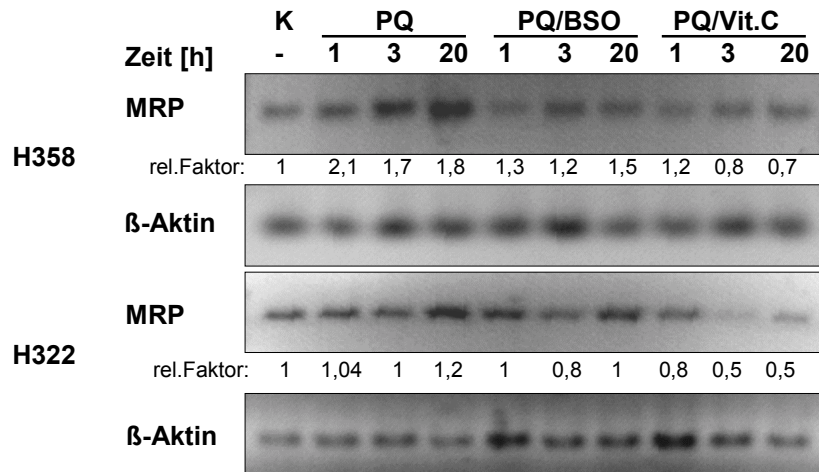
**Abbildung 18: Induktion von MRP-1 durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Western Blot Analysen. (A+C) AII-Zell ähnlichen H358- und (B+D) Clara-Zell ähnliche H322-Tumorzellen wurden mit 0,1 - 1,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 20 h behandelt. 1mM ATZ (Hemmung des AOE Katalase) wurde 1h vorinkubiert. (C) H358: Inkubation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-24h) mit und ohne 1mM Vit.C Vorinkubation (20h). (D) H322: 20h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +/- 1mM Vit.C (20h Vorbehandlung).

### 3.7.3 Wirkung von Antioxidantien auf die MRP-1-Protein Expression

Die als Antioxidanz genutzte Ascorbinsäure bewirkte in beiden Tumorzelllinien eine zeitabhängige Downregulation des MRP-1 Proteins, welches in der Plasmamembranfraktion nachgewiesen wurde (Abb.18C+D). Eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition der Ascorbinsäure vorbehandelten Zellen führte nicht (H358) oder nur zu einem sehr geringen (H322) Anstieg des MRP-1 Proteins verglichen mit der Kontrolle.

### 3.7.4 Expression von MRP-mRNA nach Paraquat-Exposition

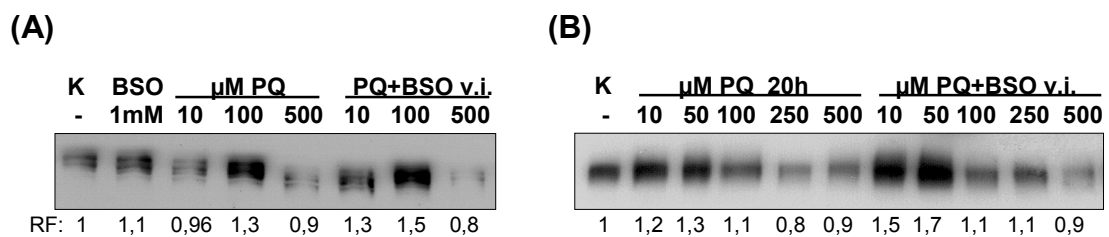
Die Reaktion der Lungentumorzellen auf einen oxidativen Stress durch das Herbizid Paraquat (PQ) zeigte sich in einem tendenziellen Anstieg der MRP-1-mRNA Expression der H322-Zellen und stärkeren Induzierbarkeit in den H358-Zellen (Abb.19). Das als Prooxidans verwendete und 20h vor dem PQ-Expositionsbeginn verabreichte BSO führte mit PQ zusammen nach 1, 3 und 20h zu kaum einer Veränderung (H322) bzw. geringen Verminderung (H358) der MRP-mRNA im Vergleich zur alleinigen PQ Exposition. Eine alleinige Behandlung der Zellen mit 1mM BSO über dieselbe Zeitspanne hinweg (Abb.13B) zeigte eine zeitabhängige Abnahme der MRP-mRNA nach 21h um 38% , nach 40h um 72%. Die 20 stündige Vorbehandlung mit 1mM Vit.C und folgender 1, 3 und 20 stündige Inkubation von Vit.C und PQ gleichzeitig zeigte in den H322 eine verminderte MRP-mRNA Bildung mit einer maximalen Abnahme nach 3 und 20h PQ. Dieser abschwächende Effekt von Vit.C auf die PQ induzierte MRP-mRNA war bei den H358 Zellen geringer ausgeprägt.



**Abbildung 19: Induktion von MRP-mRNA in H322 und H358 humanen Lungentumorzellen durch Paraquat (PQ).** RT-PCR Analysen. Die Tumorzellen wurden mit 50 $\mu$ M PQ über 20h inkubiert. 1mM BSO (GSH-Reduktase Hemmung) und 1mM Ascorbinsäure (Vit.C) wurden 20h vor PQ Exposition dem Kulturmedium hinzugegeben. (Kontrolle=  $\beta$ -Aktin).

### 3.7.5 Induzierbarkeit von MRP-1 Protein durch Paraquat

Die Tendenz, die sich in der Beeinflussung der MRP-mRNA Synthese widerspiegelte, wurde durch die Detektion des MRP-1-Proteins in der Plasmamembran weiter verfolgt. Es zeigte sich, dass eine niedrige Konzentration von PQ (50 $\mu$ M) über 20h das MRP-1 induzieren konnte. BSO konnte die MRP-1-Expression zusätzlich um 25,6% $\pm$ 1,14 steigern (H322, Abb20). Höhere Konzentrationen von PQ über 20h führten zu einer Abnahme der in der Plasmamembran detektierbaren MRP-1-Proteinmenge. Toxische Effekte wurden bei einer Koinkubation von 1mM BSO und 500 $\mu$ M PQ beobachtet (Tab.3) und könnten eine Ursache für die MRP-1 Suppression darstellen.



**Abbildung 20: Induktion von MRP-1 Protein durch Kurzzeit- und Langzeit-behandlung mit Paraquat (PQ).** Western Blot Analysen. (A) H358: Inkubation mit PQ (2h). Wechsel zu PQ-freiem Medium bis 20h. (B) H322: kontinuierliche Inkubation über 20h mit PQ. Vorinkubation (v.i.) mit 1mM BSO für 20h. RF=relativer Faktor, bezogen auf Kontrolle (K)

Ebenfalls in Abb.20 ist die Expressionssteigerung von MRP-1-Protein nach einer Kurzzeitbehandlung mit 100 $\mu$ M PQ (2h PQ, Mediumwechsel, weitere 18h ohne PQ) zu sehen. BSO alleine führte kaum zu einer Beeinflussung des MRP-1-Proteins. Der prooxidative Effekt von BSO auf die Wirkung PQ bedingter Radikale zeigte sich nach

Koinkubation von PQ und BSO (Zellen wurden mit 1mM BSO vorbehandelt) in einer Verstärkung des MRP-1 Proteins unter 10 und 100 $\mu$ M PQ (um 19,8%<sup>64,6</sup>) verglichen mit der alleinigen PQ-Inkubation. Eine hohe Konzentration von PQ (500 $\mu$ M) verminderte die Expression von MRP-1.

### **3.8 Carboxy-2,7-dichlorofluorescein (CDF) als MRP-1 Substrat zum Nachweis des MRP-1 vermittelten Transportes**

Der Transport von Xenobiotika von intrazellulär in den extrazellulären Raum durch das MRP-1 stellt neben dem MDR-1 vermittelten Transport einen weiteren Schutzmechanismus der Zelle dar. Um die Funktion des intrinsisch exprimierten und induzierbaren MRP-1 Proteins zu untersuchen, wurde der für den MRP-1-Transport spezifischen Fluoreszenzfarbstoff CDF verwendet (27, 19). Nach Charakterisierung des Farbstoffes hinsichtlich Emissions- und Excitations-Eigenschaften, wurde in gleicherweise wie für die MDR-1 Funktionsmessung verfahren.

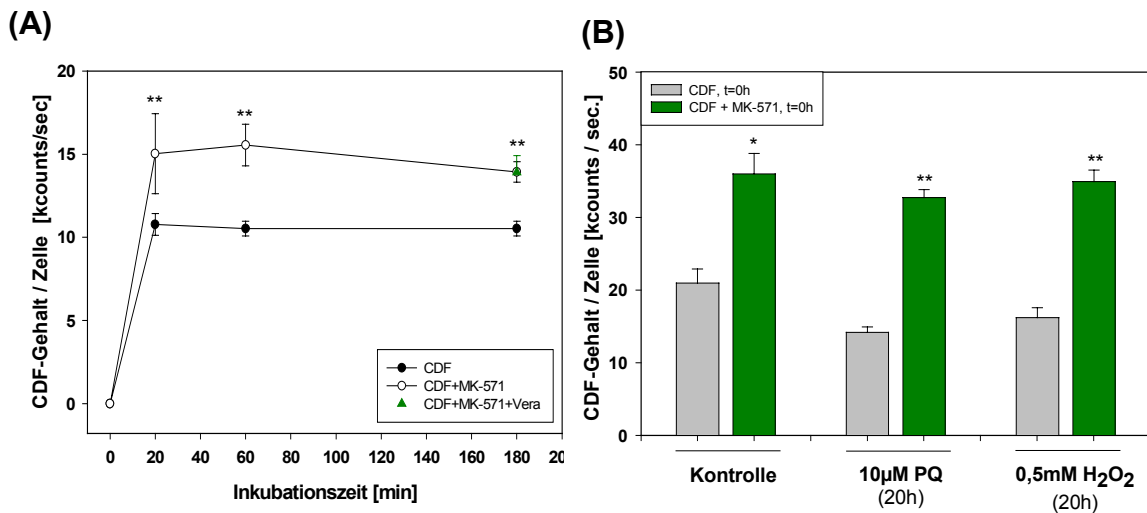
#### **3.8.1 Influxstudie und Spezifität des MRP-1 vermittelten Transportes**

Für den Funktionalitätstest des MRP-1-Proteins wurden auf Borosilikat-Kammern kultivierte H358- und H322-Tumorzellen verwendet. Mit einer Konzentration von 30 $\mu$ g CDF / ml DMEM wurden die Zellen bis zu 180min inkubiert. Zum Nachweis eines MRP-1 spezifischen Mechanismus wurden die Zellen sowohl mit als auch ohne den MRP-1 Blocker MK-571 (30) inkubiert. Dieser eigentliche Leukotrienrezeptor Antagonist MK-571 interferierte in den Versuchen von Gekeler (1995) (30) in einer Konzentration von 20 $\mu$ M mit dem MRP-1 vermittelten Transport verschiedener Krebszellen.

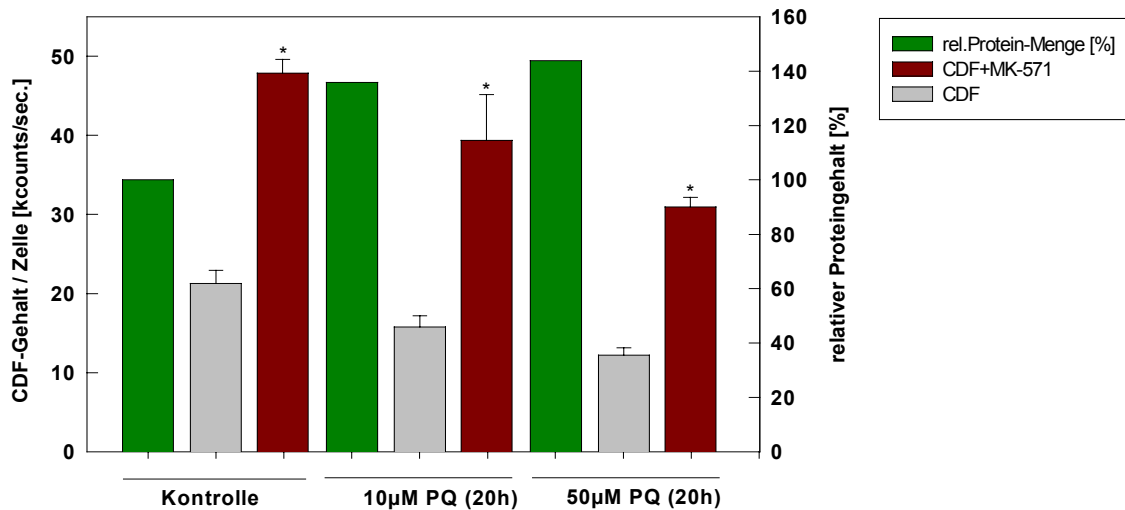
Wie in Abb.21A zu sehen ist, nehmen die Zellen den Farbstoff innerhalb von 20min maximal auf. Danach stellt sich ein Gleichgewicht zwischen passivem Influx und aktivem Efflux ein. Da die MRP-1-Proteinmenge und der resultierende aktive Efflux der Zellen recht hoch ist, ist der gemessene CDF-Gehalt relativ niedrig. Erst durch eine Hemmung dieser aktiven Eliminierung durch MRP-1 mit 20 $\mu$ M MK-571 zeigte sich eine vertärkte Retention des Fluoreszenzfarbstoffes. Um zu überprüfen, ob diese Hemmung spezifisch für das MRP-1 Protein ist oder durch die Funktion des P-Glykoproteins MDR-1 überlagert wird, wurden die Zellen gleichzeitig mit CDF, dem MRP-1 Hemmstoff MK-571 und dem funktionellen MDR-1-Hemmer Verapamil (Vera, 10 $\mu$ M) inkubiert. Nach einer Inkubation mit CDF und MK-571 ohne Vera (o) oder mit



Vera ( $\blacktriangle$ ) ergaben die Messungen dieselbe Menge intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffes (Abb.21A). Daraus ergibt sich, daß das MDR-1 an diesem CDF-Transport nicht beteiligt ist und somit das System aus CDF und MK-571 spezifisch für MRP-1 ist.



**Abbildung 21: Nachweis der MRP-1 Funktion durch Hemmung des Carboxy-2,7-dichloro-fluorescein (CDF) Transportes in humanen Lungentumorzellen.** Einzelzellfluoreszenzmessung. Adhärente Zellen wurden mit 30µg/ml CDF beladen. **(A)** H358: Influx von CDF in An- oder Abwesenheit des MRP-1 Inhibitors MK-571. **(B)** H322: MRP-1 Protein abhängige CDF-Gehalt (+/- MK-571). Gezeigt sind MW±SD, n=3; \* = p<0,01; \*\* = p<0,001



**Abbildung 22: MRP-1 Protein Funktionsassay im Vergleich zum MRP-1 Proteingehalt.** Einzelzellfluoreszenzmessung. In H358-Zellen wurde der CDF-Gehalt nach dessen Inkubation mit oder ohne MK-571 gemessen (linke Skala). Zum Vergleich von induziertem MRP-1-Protein wurde diese mit aufgetragen (rechte Skala). Dargestellt sind MW±SD, n=4; \* = p<0,001.

### 3.8.2 Abhängigkeit der MRP-1 Funktion vom MRP-1 Proteingehalt

Untermauert wird die Spezifität des MRP-1 vermittelten Transportes von CDF und dessen Hemmbarkeit durch MK-571 durch den Vergleich der MRP-1 Aktivität mit der

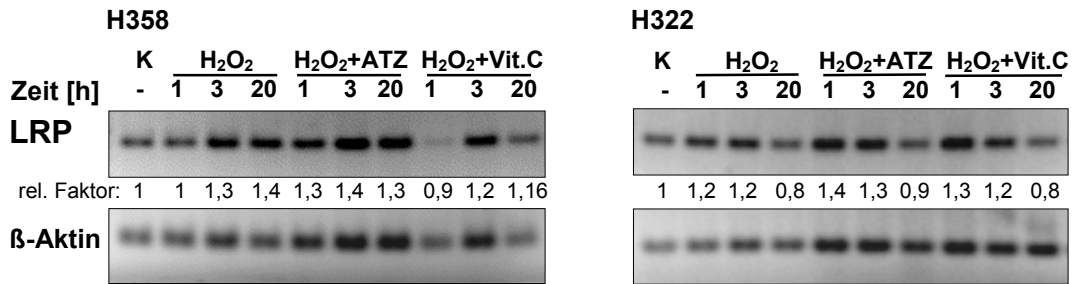
MRP-1 Proteinmenge (Abb.22). Für diesen Versuch wurden die Tumorzelllinien mit dem MRP-1 Induktor PQ in einer Konzentration von 10 und 50 $\mu$ M für 20h inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen mit CDF in An- oder Abwesenheit von MK-571 für 4h inkubiert und direkt nach der Beladung der Zellen der intrazellulären CDF-Gehalt via Einzelzellfluoreszenzmessung bestimmt. Das überexprimierte MRP-1-Protein, bedingt durch 50 $\mu$ M PQ (20h), senkte die intrazelluläre Fluoreszenzmenge verglichen mit der Kontrolle ( $p < 0,001$ ). Es zeigte sich zwischen dem intrazellulären CDF-Gehalt und der MRP-1-Proteinmenge eine indirekte Korrelation. Auch die Hemmbarkeit des MRP-1 vermittelten Transportes ist tendentiell vermindert. Auch eine oxidative Stimulation der MRP-1 Expression durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5mM 20h) hatte einen verminderten CDF Gehalt, bedingt durch einen stärkeren aktiven Efflux, zur Folge (Abb.21). Die Ergebnisse ließen auf ein funktionell aktives MRP-1-Protein schließen.

### **3.9 Das Lung-Resistance-related Protein (LRP) als weitere Resistenzbarriere in Lungentumorzellen**

Neben den wichtigen Vertretern der Resistenzproteine MDR-1 und MRP-1 wird als weitere Ursache in der Entwicklung von Resistenzen die Rolle des Lung-resistance Proteins (LRP) diskutiert. Dieses primär in Lungenzellen exprimierte Protein ist nicht am transmembranären aktiven Transport beteiligt, sondern ist durch die Lage nahe zum Zellkern und Strukturen des Zytoskeletts an der schnellen Umverteilung von Xenobiotika involviert. So kann eine Überexpression von LRP in nicht-kleinzelligen Lungentumoren (NSCLC) eine Resistenz gegenüber Zytostatika wie z.B. Cisplatin erzeugen (7).

#### **3.9.1 Einfluss der radikalischen Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Expression von LRP in humanen AII- und Clara-Zell ähnlichen Lungentumorzellen**

Wie auch bei den zuvor untersuchten MDR – Proteinen war von Interesse, ob durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedingte Erhöhung intrazellulärer Radikale die Tumorzellen als Abwehrreaktion eine Veränderung in der LRP-mRNA Expression zeigen. Hierfür wurden, unter den gleichen Versuchsbedingungen wie für die Untersuchung des ROS-Einflusses auf die MDR-1 und MRP-1 Expression, die humanen Clara- und AII-Zell ähnlichen Lungentumorzelllinien mit 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Die RT-PCR Ergebnisse (Abb.23) zeigten in den H358 Zellen, dass dieser radikalische Stress eine Zunahme der LRP-mRNA-Synthese nach 3h und 20h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition bewirkte, der bei den H322 weniger ausgeprägt war (in Korrelation mit  $\beta$ -Aktin).



**Abbildung 23: Einfluss von  $H_2O_2$  auf die LRP-mRNA Expression in humanen Lungentumorzellen.** RT-PCR Analyse. H322 und H358 Tumorzellen wurden 1h, 3h und 20h mit 0,5 mM  $H_2O_2$  inkubiert. 1mM ATZ wurde 1h und 1mM Ascorbinsäure (Vit.C) 20h vor  $H_2O_2$  Exposition vorinkubiert. relative Faktor =Verhältnis zur Kontrolle (auf  $\beta$ -Aktin relativiert)

Eine Vorinkubation mit 1mM ATZ führte in den H358 (3h und 20h  $H_2O_2$ ) zu einem zusätzlichen Anstieg der LRP-mRNA-Synthese, aber auch der  $\beta$ -Aktin Kontrolle. Eine Inkubation dieser Zellen mit ATZ allein bewirkte eine zeitabhängige Verminderung der LRP-mRNA-Synthese (Abb.9, s.3.5.1). Nach 21h, welches einer 20-stündigen Inkubation mit  $H_2O_2$  und 1h ATZ-Vorinkubation entspricht, war die LRP-mRNA auf 30% gefallen. Diese entgegengesetzte Wirkung von ATZ auf die LRP-mRNA kann eine Ursache für eine verringerte Response der LRP-Expression bei Koinkubation von ATZ und  $H_2O_2$  sein. Im Unterschied zu den H358 kam es in den H322 nach 20h Koinkubation von ATZ und  $H_2O_2$  zu einer Abnahme der LRP-mRNA-Synthese.

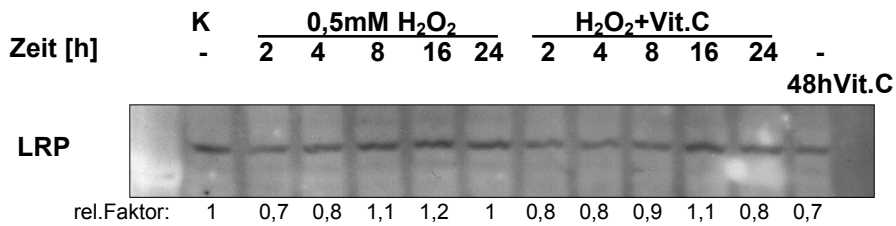
Wurden die Zellen mit 1mM Vit.C 20h vorinkubiert kam es in beiden Zelllinien zu einer Abnahme der LRP-mRNA-Expression und abgeschwächten Induktion durch  $H_2O_2$  (+Vit.C). Dieses spricht für eine ROS-abhängige Expression von LRP und einer geringeren Synthese unter Antioxidantien.

### 3.9.2 Einfluss von $H_2O_2$ auf die LRP-Protein Expression

Die LRP-Protein Expression wurde unter Verwendung von Gesamtproteinen mittels Western Blot und Verwendung monoklonaler Antikörper gegen das 110kDa grosse LRP detektiert. In den kultivierten Tumorzelllinien H322 und H358 zeigte sich nach  $H_2O_2$ -Exposition eine transiente Abnahme nach 2h und 4h. Anschließend kam es zu einer tendenziellen Zunahme des LRP-Proteingehaltes zwischen 8h und 24h (Abb.24). Durch eine 20 stündige Vorbehandlung der Zellen mit 1mM Vit.C wurde die Wirkung von  $H_2O_2$  abgeschwächt.

Insgesamt sind die Veränderungen der LRP-Expression so gering, dass nicht von einer Induzierbarkeit durch  $H_2O_2$  ausgegangen werden kann. Die geringe Veränderung der

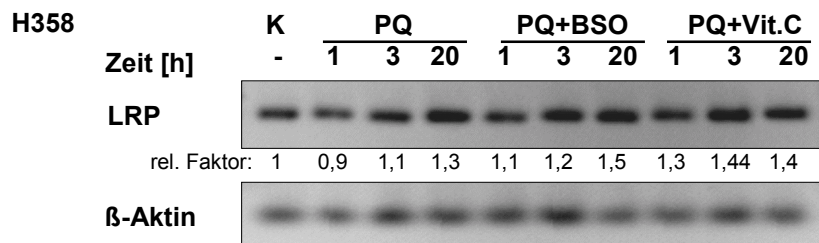
LRP-Expression durch  $H_2O_2$  ließ sich durch eine ATZ-Vorinkubation nicht steigern (nicht gezeigt).



**Abbildung 24: Einfluss von  $H_2O_2$  auf die LRP-Protein Expression.** Western Blot Analyse. H358 wurden mit 0,5 mM  $H_2O_2$  +/- 1mM Vit.C-Vorbehandlung inkubiert.

### 3.9.3 Effekt von Paraquat auf die Expression von LRP-mRNA und Protein

Auch durch eine Behandlung mit Paraquat zeigten sich Unterschiede in der Auswirkung auf die Bildung der LRP-mRNA. Die beiden Tumorzelllinien H358 und H322 reagierten nur mit einer geringen Steigerung der LRP-mRNA auf diesen Stimulus (Abb.25, hier H358 für beide Zelllinien als Beispiel). Eine Vorbehandlung mit 1mM BSO zur Erhöhung der radikalischen Wirkung von PQ oder eine 20 stündige Vorbehandlung mit 1mM Vit.C zum Schutz vor ROS bewirkte kaum eine Veränderung der LRP-mRNA Synthese gegenüber einer Behandlung mit PQ allein.



**Abbildung 25: Paraquat (PQ) und Buthionin-Sulfoximin (BSO) Einfluss auf die LRP-mRNA Expression.** RT-PCR Analyse. Die Tumorzellen wurden 1- 20h mit  $50\mu M$  PQ inkubiert. 1mM BSO oder 1mM Ascorbinsäure (Vit.C) wurden 20h vorinkubiert.

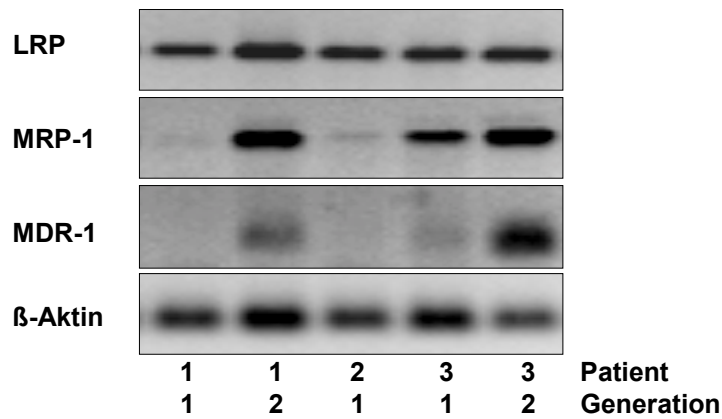
Die Behandlung der Zellen mit BSO (ohne PQ) bewirkte, wie bereits gezeigt, eine Abnahme der LRP-mRNA Synthese mit einer gleichzeitigen, leichten Zunahme der  $\beta$ -Aktin-mRNA zu späteren Zeitpunkten (23 und 40h). Diese Beeinflussung der LRP-mRNA war so gering, dass man vermutlich davon ausgehen kann, dass die LRP-mRNA-Induktion PQ spezifisch ist. Auf Proteinebene scheint die Bildung von LRP anders auszusehen. Dabei bewirkten 10, 50 und  $100\mu M$  PQ (20h) mit oder ohne Präinkubation von 1mM BSO keine Veränderungen in der detektierbaren LRP-Proteinmenge (ohne Abb.).

### **3.10 Expression und Induzierbarkeit von Multidrug-Resistance Proteinen in serum-frei kultivierten humanen Bronchialepithelzellen**

Die Untersuchung an den humanen AII- und Clara-Zell ähnlichen Lungentumorzelllinien hatten die Bedeutung von reaktiven Sauerstoff Spezies für die Expression von Multidrug-Resistance Proteinen gezeigt. Die Experimente konnten auf die Detektion dieser Proteine in den nicht tumorösen NHBEK-Kulturen und dem Funktionsnachweis von MDR-1 und MRP-1 erweitert werden. Die Untersuchung einiger NHBEK-Kulturen sollte Aufschluss darüber geben, ob die Grund-expression von MDR-1, MRP-1 und LRP und Beeinflussung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder PQ sich ähnlich den Lungentumorzellen verhält.

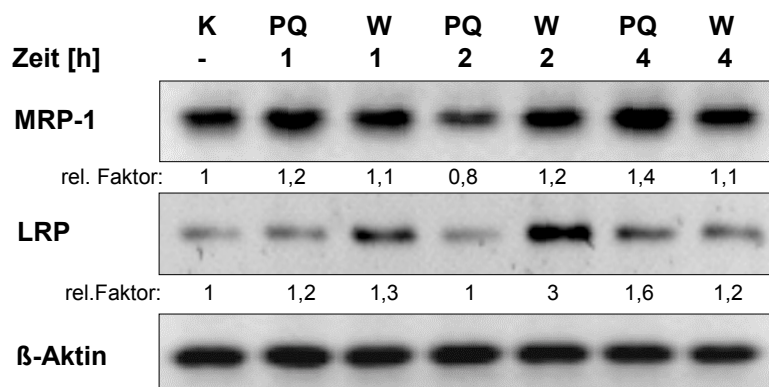
#### **3.10.1 Multidrug-Resistance Proteine und deren interindividuellen Expressionsunterschiede in NHBEK-Kulturen**

Humane Bronchialepithelzellen wurden bis zu einem subkonfluenten Wachstum serumfrei kultiviert. Die RT-PCR Analysen ergaben interindividuelle und kulturdauerabhängige Unterschiede in der Expression von MDR-1-, MRP- und LRP-mRNA. Es zeigten sich sowohl bei unterschiedlich lang kultivierten Bronchialepithelzellen ,1.-3. Generation (eine Generation umfasst einen Wachstumszeitraum von 2 bis 4 Wochen, nach jeder Generation wurden die primären Gewebestücke umgesetzt und weiter kultiviert), als auch zwischen den Zellkulturen verschiedener Patienten eine gleichmässige Expression der LRP-mRNA ohne interindividuelle Unterschiede. Dieses ist in Abb.26 anhand von 3 verschiedenen Bronchialepithelkulturen dargestellt. Im Unterschied zur stabilen LRP-mRNA Expression zeigten sich stärkere Unterschiede in der MRP-mRNA Synthese. Dabei scheint in einigen Kulturen die MRP-mRNA sehr schwach gebildet zu werden (Pat.2). Kulturen anderer Resektate (Pat.1) wiesen in der ersten Generationszeit eine geringe MRP-mRNA Synthesen auf, die aber schon in der zweiten Kulturperiode (2.Generationszeit) deutlich zunahm. Ein Mittelweg scheint in der Kultur der NHBEK vom Pat.3 aufzutreten. Hier zeigte sich in der ersten Wachstumsperiode (1.Generation) eine mittelstarke MRP-mRNA Synthese, die in der zweiten Generationszeit gesteigert wurde. Größere Schwankungen waren bei der Untersuchung der MDR-1 mRNA Expression zu beobachten. So zeigten einige Kulturen besonders in der ersten Generationszeit (Wachstumsperiode) keine MDR-1 mRNA Synthese (Pat.1,2), oder eine geringe, die mit der Dauer der Kultur verstärkt wurde (Pat.3).



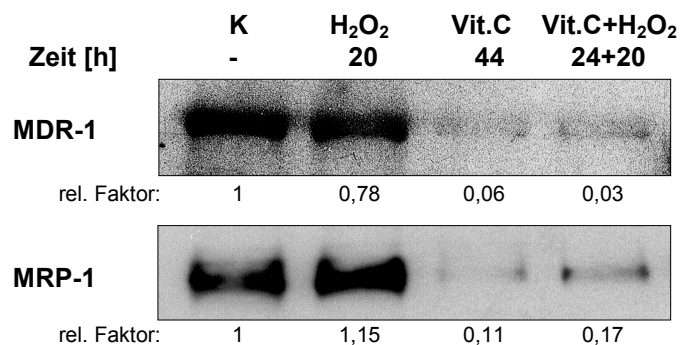
**Abbildung 26: Kulturabhängige mRNA-Expression von MDR-1, MRP und LRP.** RT-PCR. Kultur der Resektate 3er männlicher Patienten (1, 2 und 3). Generation 1= 2-4 Wochen Kultur, Generation 2 = Zweitkultur der Bronchusresektate über 4 Wochen.

Insgesamt zeigten sich in den NHBEC-Kulturen interindividuelle und kulturdauerabhängige Expressionsunterschiede der MRP- und MDR-1-mRNA Synthese. In der Untersuchung einer weiteren NHBEC-Kultur wurden in einem Zeitfenster von 1-4h die Zellen einer Exposition mit 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 10 $\mu$ M PQ ausgesetzt (Abb.27). Die Detektion der MDR-1- und MRP- und LRP-mRNA mit der RT-PCR zeigte in dieser Kultur nach der ersten Wachstumsperiode keine Expression der MDR-1 mRNA. Hingegen war die MRP-mRNA in den unbehandelten Zellen gut exprimiert und ließ sich durch ein- und vierstündige PQ Exposition verstärken (1h: MW=1,160,15; 4h: MW 1,460,04). Eine vergleichbare Tendenz war bei LRP zu erkennen (1h: MW=1,360,12; 4h: MW=1,260,44). Eine einmalige Exposition der Zellen gegenüber 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatte im gleichen Beobachtungszeitraum kaum einen Effekt auf die MRP-mRNA-Bildung. Die NHBEC's reagierten andererseits mit einem Anstieg der LRP-mRNA auf 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (max.=2h).



**Abbildung 27: Wirkung von ROS auf die MRP- und LRP-mRNA Expression in NHBEC.** (Pat.4); RT-PCR. K = unbehandelte NHBEC. PQ = 10 $\mu$ M Paraquat, W = 100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Keine MDR-1 mRNA nachweisbar. β-Aktin = Kontrolle.

In einer anderen Kultur (Pat.5) wurde das MDR-1-Protein nach Inkubation von 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20h detektiert (Abb.28). Eine 20 stündige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition bewirkte einen um 22% verminderten Gehalt des MDR-1-Proteins und eine um 15% stärkere Expression des MRP-1-Proteins gegenüber der jeweiligen Kontrolle. Wurden die Bronchialepithelzellen mit 1mM Vit.C als Antioxidans 44h behandelt, so kam es auf MDR-1 und MRP-1-Proteinebene zu einer Abnahme der spezifischen Proteine um 93% bzw. 89%. Zellen, die mit Vit.C 24h vorinkubiert wurden, zeigten 20h nach der einmaligen Gabe von 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur eine geringe Veränderung des MDR-1- Proteingehaltes (-3,6%) und eine Verstärkung der MRP-1-Proteinmengen (+ 53%) verglichen mit Vit.C behandelten Zellen.

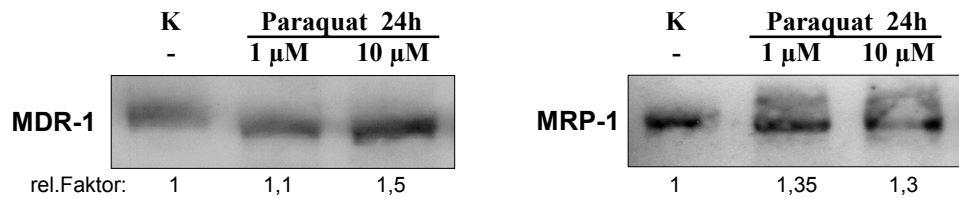


**Abbildung 28: MDR-1, MRP-1-Proteinexpression in NHBEC.** Western Blot Analyse. Die NHBEC-Kultur (Pat.5) wurde mit 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20h (+/- 1mM Vit.C 20h Vorbehandlung) behandelt. LRP war nicht detektierbar.

Die Verbesserung der Kulturbedingungen durch das Antioxidans Vit.C scheint protektiv zu wirken und das MDR-1 Protein zu supprimieren. Unter normalen Kulturbedingungen war die Expression von MRP-1- Protein hoch und konnte durch ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nur noch gering überexprimiert werden konnte. Die Expressionssteigerung um 17% von MRP-1 Protein nach 20 h 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition zeigte sich auch in weiteren Kulturen (Pat.6, Abb.30B).

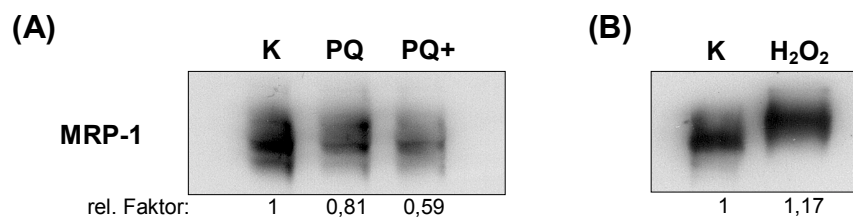
### 3.10.2 Paraquatwirkung auf die Expression der MDR-Proteine in den NHBEC

Aufgrund kontinuierlicher ROS-Bildung und seiner Lungenspezifität wurde die Wirkung von Paraquat (PQ) auch an den NHBEC-Kulturen getestet. Wie in Abb.29 dargestellt, war das MDR-1 Protein durch 10µM stärker als durch 1µM PQ über 24h induzierbar. Bei der Untersuchung der MRP-1 Proteinexpression unter gleichen Voraussetzungen zeigte sich ein ähnliches Verhalten wie das von MDR-1 (Abb.29). Dabei führte eine 24 stündige Behandlung mit 1 und 10µM PQ zu einer Expressionssteigerung des MRP-1 Proteins (+30%).



**Abbildung 29: Induktion von MDR-1- und MRP-1-Protein durch Paraquat (PQ).** Western Blot Analyse (Gesamtprotein). NHBEC-Kultur: Pat.7 (72a, männlich).

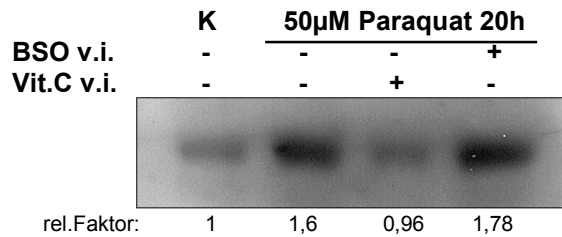
Andererseits bewirkte eine kurzzeitige Behandlung der NHBEC (Pat.3, Abb.30A) mit 100µM PQ (2h 100µM PQ, anschließend 20h ohne PQ) eine Abnahme der MRP-1-Protein Expression um 20%. Durch 20 stündige Vorbehandlung mit 1mM Vit.C erfolgte eine zusätzliche Verminderung des MRP-1 Gehaltes um weitere 20%. Die NHBEC-Kultur des Pat.3 wurde aus Bronchusresektaten eines mit Taxol und Carboplatin vortherapierten Patienten gewonnen. Alle anderen Kulturen stammten von unbehandelten Patienten. Ob die Vorbehandlung mit Chemotherapeutika oder die höhere PQ-Konzentration Ursache für die PQ bedingte MRP-1 Abnahme war, konnte nicht eruiert werden.



**Abbildung 30: Einfluss von PQ und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die MRP-1 Proteinexpression in NHBEC.** Western Blot Analyse. (A) Pat.3: Kurzzeitbehandlung mit 100µM PQ (2h) + 20h Kultivierung ohne PQ. += 1mM Vit.C 24h vorbehandelt. (B) Pat.6: 0,1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20h; K=Kontrolle

In der Reaktion auf radikalische Stimuli scheinen die NHBEC ähnlich den Lungentumorzellen H322 und H358 mit der Überexpression von MDR-1 und MRP-1 zu reagieren. Die NHBEC-Kultur von Pat.5 zeigte eine starke basale Expression von MDR-1 und MRP-1 Protein. Eine Exposition der NHBEC (Pat.7) gegenüber 10µM und 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu keiner Veränderung der LRP-Protein Expression (nicht gezeigt). Hingegen führte eine Inkubation mit 50µM PQ über 20h zu einem Ansteigen der Expression des LRP-Proteins (1,6 fach vs Kontrolle; Abb.31). Eine Vorbehandlung der Zellen mit 1mM Ascorbinsäure 20h vor PQ Inkubation verhinderte die Induktion von LRP durch PQ (-64% vs PQ allein). Zur Verstärkung der PQ bedingten radikalischen Wirkung wurde 1h vor PQ-Inkubation den Zellen 1mM BSO zur GSH-Suppression angeboten. Diese Kombination führte zu einer weiteren Expressionssteigerung um nochmals +18% (verglichen mit einer alleinigen PQ-Inkubation).

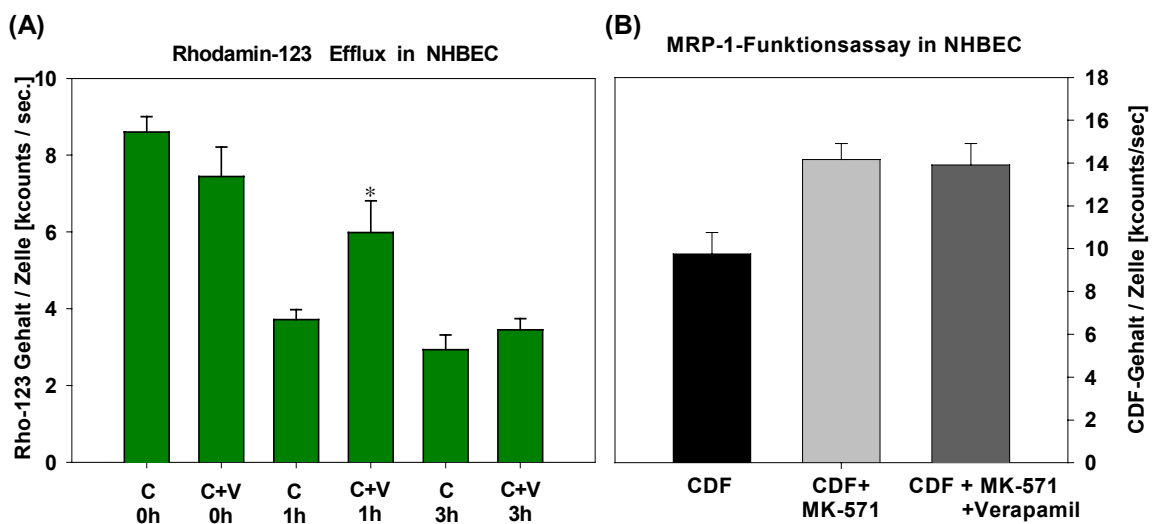




**Abbildung 31: Induktion von LRP-Protein durch Paraquat (PQ).** Western Blot Analyse. NHBEC (Pat.8; 45a, männlich). 1mM BSO oder Vit.C wurden 20h vorinkubiert.

### 3.11 Funktionsnachweis der MDR-1- und MRP-1-Proteine mit Rho-123 und CDF durch Einzelzellfluoreszenzmessung

Wie schon bei den humanen Lungentumorzelllinien H322 und H358 gezeigt, wurde zum Funktionsnachweis der transmembranären Proteine MDR-1 und MRP-1 mit der Einzelzellfluorimetrie durchgeführt. Hierzu wurden die präparierten Bronchusstücke auf Kollagen/Fibronectin beschichtete Kammerdeckgläschen für 4 Wochen in BECG-Medium kultiviert. Anschließend wurden sie mit 2,5µg/ml Rho-123 für 2h inkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen weiter in BECG-Medium mit oder ohne 10µM Verapamil zur MDR-1 Hemmung weiter inkubiert und zum Zeitpunkt Null, 1h und 3h nach Beladung der Rho-123-Gehalt an jeweils 10 Zellen gemessen.



**Abbildung 32: MDR-1- und MRP-1-Funktionsassay in NHBEC.** Einzelzell-Fluoreszenzmessung. **(A)** Pat.8: Messung des aktiven Rho-123 Transportes und Hemmbarkeit durch 10µM Verapamil (V) als MDR-1 Funktionsnachweis. **(B)** Pat.6: MRP-Funktionsassay durch Bestimmung des intrazellulären CDF-Gehaltes (Beladung mit 30µg/ml) und MRP-Hemmung durch MK-571. 10µM Verapamil (Vera) als MDR-1-Hemmer. MW6SD, n=10; \*= $p < 0,01$ ; \*\*= $p < 0,001$

Wie in Abb.32 erkennbar ist, wurde der MDR-1 bedingte aktive Efflux von Rho-123 durch Koinkubation von 10 $\mu$ M Verapamil deutlich gehemmt (1h-Wert). Nach 3h zeigte sich ein weitestgehender Ausgleich der intrazellulären CDF-Konzentrationen. Damit wurde das detektierte MDR-1 Protein als ein funktionell aktiver Transporter charakterisiert.

Die Funktionalität des MRP-1 Proteins wurde unter gleichen Voraussetzungen untersucht. Anstelle von Rho-123 wurde hier der Fluoreszenzfarbstoff CDF eingesetzt, der als spezifisches MRP-1-Substrat gilt. Die normalen humanen Bronchialepithelzellen (Pat.6) wurden hierfür 2h mit 30 $\mu$ g/ml CDF in An- oder Abwesenheit von 20 $\mu$ M MK-571, einem funktionellem MRP-1 Hemmer, bzw. 20 $\mu$ M MK-571 und 10 $\mu$ M Verapamil gleichzeitig inkubiert.

Durch die Koinkubation von CDF mit MK-571 zeigte sich ein Anstieg des intrazellulären CDF-Gehaltes (+45%) verglichen mit der Kontrolle, da während der Inkubationsphase der aktive Efflux von CDF durch MRP-1 funktionell gehemmt wurde. Eine Beladung der Zellen mit CDF und gleichzeitiger Behandlung mit MK-571 und 10 $\mu$ M Verapamil (MDR-1 Hemmung) verstärkte nicht die Hemmung des Effluxes, was eine Beteiligung des P-Glykoproteins MDR-1 ausschließt. Damit konnte nachgewiesen werden, dass das basal exprimierte MRP-1-Protein der NHBEC-Pat.6 (Abb.30B) funktionell aktiv ist.

## 4. Diskussion

Das Auftreten von Lungentumoren ist in Europa zu den häufigsten Neoplasien der Männer geworden und die Inzidenz bei Frauen steigt schnell (102). Epidemiologische Studien zeigten, dass Rauchen die Hauptursache für Lungenkrebs ist (84). Die Gruppen der kleinzelligen (SCLC) und nicht-kleinzelligen (NSCLC) Lungenkarzinome zeigen eine unterschiedliche Reaktion auf die Behandlung mit Chemotherapeutika. Die meisten Patienten mit SCLC zeigen initial ein gutes Ansprechen auf eine Chemotherapie. Jedoch kommt es in der Mehrheit der Fälle zu einer erneuten Bildung eines resistenten Tumors. Dieses Rezidiv zeigt auch gegen initial nicht verwendete Chemotherapeutika eine Resistenz. Etoposid zum Beispiel hat in unbehandelten kleinzelligen Lungentumoren eine 40-50%ige, jedoch in Rezidiven eine weniger als 10%ige Erfolgsrate (36). Während die SCLC eine erworbene Chemoresistenz manifestieren, zeigen NSCLC eine intrinsische Chemoresistenz mit ungünstiger Prognose. Das Vorhandensein dieser primären oder sekundären, erworbenen Resistenzen gegen Chemotherapeutika ist immer noch ein grosses Hindernis einer erfolgreichen Behandlung vieler Tumorerkrankungen. Solche Resistenzen werden durch eine Vielzahl zellulärer Faktoren bestimmt. Hierzu zählen u.a.

- das Versagen der Aufnahme und Aktivierung von Medikamenten,
- die Veränderung der Menge der Zielenzyme wie die Dihydrofolat-Reduktase und Topoisomerase II,
- eine Aktivierung von Enzymsystemen, welche in die Reparatur der DNA-Schäden involviert sind,
- eine verstärkte Expression detoxifizierender Enzyme wie die Glutathion-S-Transferase und ein verstärkter Efflux von Chemotherapeutika durch transmembranäre Transporter wie MDR1, MRP1 (26).

Die Überexpression dieser ATP-abhängigen Transporter vermindert in Krebszellen die intrazelluläre Konzentration von Medikamenten und erzeugt somit einen Multidrug-Resistance Phänotyp.

Bis heute sind über 100 Mitglieder der ABC-Transporter Familie identifiziert worden. Die klassische Form der Multidrug-Resistance wird durch P-Glykoprotein (MDR) bedingt. Beim Menschen sind von diesem 2 Gene bekannt (MDR-1, -2), wobei aber nur MDR-1 einen Multidrug-Resistance Phänotyp hervorruft. Dieses wird in exkretorischen Organen exprimiert wie z.B. Colon, Niere, Leber, Magen, Plazenta, Gefässe der Blut-Hirn-Schranke (111).

Alternativ gibt es nicht-P-gp vermittelte Mechanismen der Multidrug-Resistance. Das ebenfalls transmembranär lokalisierte Multidrug resistance-associated Protein MRP-1, welches von Cole und Deeley identifiziert wurde (1), ist eher ubiquitär verteilt und wird in Lungentumoren aber auch in normalen Lungengewebe gefunden (8). Als physiologische Funktion ist ein Leukotriene C<sub>4</sub> Transport und Export von Glutathion gebundenen Xenobiotika bekannt. Die Korrelation zwischen einer MRP-Expression und Chemoresistenz von Lungenkarzinomen gegen Daunomycin, Doxorubicin, Etoposid und Vinblastin unterstreicht die Rolle von MRP in der Resistenz von NSCLC und Rezidiven eines zunächst sensitiven SCLC.

Eine intrinsische Resistenz durch das P-Glykoprotein wurde in soliden Tumoren wie das Hepatozelluläre-Karzinom und bei Adenokarzinomen des Kolons und der Niere gefunden (26). Aber auch im Rahmen einer Cholestase oder Leberregeneration wurde eine Überexpression von MDR-Genen festgestellt (100, 77). Untersuchungen zeigten, dass die Expression MDR-assoziiierter Proteine in Hepatozyten durch reaktive Sauerstoffspezies induziert werden können (120). Die Lunge ist selbst zwangsläufig gegenüber einer Reihe von Promotoren reaktiver Sauerstoffspezies exponiert (106).

Da die beteiligten Regulationsmechanismen der MDR-1, MRP-1 und LRP-Proteine in der Lunge weitgehend ungeklärt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit die Expression dieser Multidrug-Resistance Proteine in Lungenzellen untersucht. Als *in vitro*-Modellsystem zur Untersuchung der MDR-vermittelnden Proteine wurden AII-Zell ähnliche H358, Clara-Zell ähnliche H322 humane Lungentumorzelllinien im Vergleich zu normalen humanen Bronchialepithelien genutzt. Untersucht wurden neben der Expression in der Kultur auch der Einfluss von Promotoren für Sauerstoffradikale, die in größerem Maße von Chemotherapeutika freigesetzt werden können, auf die Expression der MDR-1-, MRP-1- und LRP-Proteine und deren Funktionalität (MDR-1, MRP-1).

#### **4.1 Expression des P-Glykoproteins MDR-1 in humanen Lungentumorzelllinien und Induktion durch reaktive Sauerstoffspezies**

Die permanenten Lungentumorzellen H358 und H322 wurden als Modelle zur Untersuchung der MDR-Proteine genutzt. Die AII-Zell ähnlichen H358 und die Clara-Zell ähnlichen H322 wuchsen zu einem Monolayer aus und zeigten bei weiterer Kultivierung kein dreidimensionales Wachstum. Für Monolayer-Kulturen ist die Ausbildung eines MDR-Phänotypes ein verzögerter Prozess (49), der eine höhere Dosis oder wiederholte Applikationen von

Chemotherapeutika erfordert. Für dreidimensionale Kulturen wird eine engere Beziehung zu *in vivo* Bedingungen vermutet als für zweidimensionale (108). Die gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das Verhalten der MDR-Protein-Expression in einer zweidimensional wachsenden Kultur und können nur ein Hinweis auf das Expressionsmuster der MDR-assoziierten Proteine in Lungentumoren, also *in vivo*, sein.

Die kleinzelligen Lungenkarzinome (SCLC) machen 20-25% aller Lungentumore aus. Diese reagieren sehr sensibel auf eine initiale Chemotherapie (Erfolg in 90% der Fälle). Häufig kommt es aber zu einem Rezidiv mit Ausbildung eines MDR-Phänotypes der Tumorzellen (18). Nicht-kleinzellige Lungentumore (NSCLC) zeigen dagegen überwiegend eine geringe initiale Erfolgsrate.

Die Frage nach der Bedeutung der Menge der exprimierten MDR-Proteine für die Resistenzentstehung und klinischen Relevanz ist schwer zu beantworten. Gerade für Tumoren *in vivo* werden transiente und niedrige Mengen an P-gp/MDR als klinisch relevante adaptive Mechanismen angesehen (34). Das gering exprimierte MDR-1-Protein in den H358 und H322 kann somit dennoch funktionelle Bedeutung für einen MDR-Phänotyp haben. Klinische Studien zeigten eine enge Beziehung zwischen der Überlebensrate der Patienten und MDR-1-positiven bzw. negativen Lungentumoren (95). Dabei hatten Patienten mit MDR-1-negativen Lungentumoren eine mittlere Überlebensdauer von 10 Monaten, während diese bei Lungentumoren mit MDR-1-positiven Zellen nur 2 Monate trotz Chemotherapie betrug.

Dass die Expression des P-Glykoproteins MDR-1 in Lungentumoren nicht konstant ist, zeigten verschiedene Studien. Untersuchungen von Proben aus NSCLC, in nicht-tumorösen Lungengewebe und -Zelllinien zeigten wenig oder keine MDR-1-mRNA (58). Hingegen konnte in einer anderen Studie anhand von humaner Lungentumorproben in 15 von 86 NSCLC das MDR-1-Protein detektiert werden (96). Ob die häufige primäre Resistenz der NSCLC durch MDR-Proteine geprägt ist, ist noch ungeklärt und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Viele Chemotherapeutika zeigen neben den gewünschten zytostatischen Effekten, z.B. durch Interkalation mit der DNA und Induktion von DNA-Strangbrüchen, toxische Effekte, die den Erfolg einer Chemotherapie limitieren. Dazu gehört die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS)(z.B. durch Doxorubicin) und die Eigenschaft, oft selbst Substrate der MDR-Proteine (MDR-1 und MRP-1) zu sein. Aber auch eine fraktionierte Bestrahlung führt *in vivo* zur Überexpression von P-Glykoprotein in humanen Lungentumoren (70). Die Überexpression von P-gp nach Bestrahlung ist potentiell klinisch signifikant in Lungentumoren, bei denen die Bestrahlungstherapie oft ein Teil der initialen Therapie ist (70). Bekannt ist, dass Chemotherapeutika und eine Strahlentherapie Induktoren von ROS sind. Als hypothetischer

Regulationsmechanismus wurde in dieser Arbeit der Einfluss von ROS auf die Expression von MDR-1 untersucht.

In den Kulturen der humanen nicht-kleinzelligen Lungentumorzellen (H358, H322) zeigte sich in der exponentiellen Wachstumsphase nur eine geringe Menge des detektierbaren P-Glykoproteins (MDR-1) verglichen mit humanen Hepatozyten (91). Die Ursache hierfür kann in der Regulation über verschiedene Transkriptionsfaktoren beruhen. Häufig wird die Expression und Induktion des *mdr1b*/MDR-1 mit dem Tumorsuppressor Genprodukt p53 in Verbindung gebracht (61). Man geht davon aus, dass eine p53-Mutation einen spezifischen stimulierenden Effekt auf den MDR-1-Promotor und der wild-type p53 eine hemmende Wirkung auf ihn hat (16). Da die H358 und H322 p53 negativ sind bzw. eine p53-Mutation aufweisen, es aber nicht zu einer hohen MDR-1 Gen Expression kommt, müssen hier andere regulatorisch Mechanismen wirken. Die Promotoren des humanen MDR-1 Gens enthalten eine Vielzahl von Erkennungsseiten für SP1, NF-Y und YB-1 Transkriptionsfaktoren, welche die MDR-1-Promotor-Aktivität erhöhen können (82). Hingegen übt NF-R1 in Doxorubicin resistenten K562-Zellen einen negativen Effekt auf die MDR-1-Gen Expression aus. Ogretmen et al. (1999) zeigten an MCF-7 Zellen, dass ein Komplex aus NF-kappaB / p65 und c-Fos an einer negativen Regulation der MDR-1 Promotorenaktivität involviert ist (82). Ein solcher Komplex könnte in den H358 und H322 Ursache der geringen MDR-1-mRNA- und Protein-Expression sein.

Unter der Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ließen sich MDR-1-mRNA und MDR-1-Protein induzieren. Dieser Effekt von ROS auf das MDR-1 steht mit Ergebnissen anderer Untersuchungen in Einklang, welche die Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf das vergleichbare *mdr1b* in Rattenhepatozyten zeigte (120). Deng et al. (2001) zeigten in Hepatomzelllinien (Ratte) die Steigerung der NF-kappaB-DNA-Bindungsaktivität und folgender *mdr1b* Überexpression durch ROS-Generierung und Hemmbarkeit dieses Effektes durch GSH und N-Acetylcystein (21). Ascorbinsäure führte auch zu einer Verminderung der NF-kappaB-Aktivität (75). Der bekannte oxidative Schutz von Ascorbinsäure (89), welches als wasserlöslicher Radikalfänger wirkt, wurde ausgenutzt, um auf einen oxidativ bedingten Regulationsmechanismus für MDR-1 schließen zu können.

Die mRNA- und Protein-Expression verhielten sich nicht immer gleichsinnig. Eine Behandlung der Lungentumorzelllinien mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) führte zu einer Überexpression der MDR-1 mRNA. Die mit ATZ oder Ascorbinsäure vorbehandelten Zellen zeigten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition keine zusätzliche Veränderung der MDR-1-mRNA Expression verglichen mit einer alleinigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung. Die unter Ascorbinsäure

stärkere Expression der MDR-1-mRNA könnte auf einer allgemeinen Steigerung der Transkription beruhen. Das MDR-1-Protein wurde hingegen unter Ascorbinsäure herunterreguliert. Diese Dissoziation erfolgt möglicherweise in der translationellen oder posttranslationellen Phase. Dieser Unterschied zeigte sich auch nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition der Ascorbinsäure vorbehandelten Zellen. Während diese mRNA-Expression sich nur gering von der Expression der Zellen ohne Ascorbinsäure unterscheidet, zeigte sich im Western Blot eine Suppression des gebildeten MDR-1-Proteins und Hemmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten MDR-1 Überexpression. Durch den oxidativen Schutz der Ascorbinsäure im Medium werden die Wachstumsbedingungen für die Tumorzellen verbessert. So wurde gezeigt, dass von den Mediumzusätzen und anderen Wachstumsbedingungen die Stabilität und damit die Halbwertszeit des P-Glykoproteins abhängt (74). Oxidativer Schaden und Proteinfaltung können zu einer schnelleren Degradation und Abbau durch Ca<sup>++</sup> aktivierte Proteasen führen. Somit kann die P-gp-Halbwertszeit in humanen MDR-positiven Zellen von 16h verkürzt oder durch eine wachstumsbedingte Regulation (z.B. hohe Zelldichte (nur Monolayer)) bis auf 72h verlängert werden (74). Die membranschädigende Wirkung der ROS mit konsekutiv verstärktem Proteinabbau und nachfolgender Überexpression, die in Anwesenheit von Ascorbinsäure schwächer ausfällt, kann eine Erklärung für die vorübergehende Abnahme des MDR-1-Proteins durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bieten.

Allerdings ist bisher die Signifikanz der P-Glykoprotein-Stabilisierung durch die veränderten Wachstumsbedingungen, die Beeinflussung der Proteinfunktion und die Menge der Expression unbekannt. Vermutlich ist dieser Prozeß wichtig für die Zellen, um sich an veränderte Umgebungsbedingungen anzupassen. Verfolgt man den Gedanken weiter, könnte ein Vermeiden der Induktion von Radikalen (z.B. durch antioxidativ wirkende Substanzen) in der Prävention der Entwicklung eines MDR-Phänotypes der Tumorzellen *in vivo* hilfreich sein.

Weiterhin war von Interesse, ob sich die MDR-1 Expression durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> steigern lässt. Ein Mechanismus des schnellen Abbaus von intrazellulärem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist die Disproportionierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch das tetramere Hämprotein Katalase. Dieses hauptsächlich peroxisomal gelegene Enzym besitzt eine hohe Spezifität für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (85) und eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit (69), so dass niedrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen (100µM, abhängig vom Zelltyp) primär durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgewandelt werden. Erst höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen (0,5-1mM) werden durch GSH/GSH-Peroxidase abgefangen. 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) ist ein spezifischer Hemmer der Katalase. Masaki et al. (69) zeigten, dass eine Inkubation humaner Fibroblasten mit ATZ zu einem Anstieg der intrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration um das 1,4fache gegenüber unbehandelten Zellen führte. ATZ selbst ist aber

auch über eine Erhöhung intrazellulärer Radikale zu einer NF-kappaB vermittelten MDR-1-mRNA Induktion fähig (99). So induzierte ATZ allein die MDR-1-mRNA-Synthese in den Tumorzellen. Das unterstützt die Hypothese einer radikalisch bedingte Aktivierung von MDR-1. Warum H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ATZ vorbehandelten Zellen kein MDR-1 induzieren konnte, war nicht zu eruieren. Als Nebenbefund der vorliegenden Arbeit ergab sich unter ATZ eine Abnahme der mRNA von Katalase und MnSOD, was eine verminderte Synthese dieser Antioxidativen Enzyme zur Folge haben kann. In wie weit ATZ Einfluss auf die gesamtzelluläre antioxidative Kapazität der Zellen hat, muessen zukünftige Untersuchungen zeigen.

In den hier durchgeführten Experimenten zeigten sich in den ATZ vorbehandelten Lungentumorzelllinien H322 keine und in den H358 eine 50%ige höhere MDR-1-Proteinüberexpression nach Exposition von 0,5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verglichen mit Zellen, die mit der selben Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein behandelt wurden (Abb.8). Der höhere Gehalt der H322 an Glutathion (GSH) gegenüber den H358 und eine hohe Aktivität der Glutathion S-Transferase (117) können Ursache für eine fehlende zusätzliche radikalbedingte Steigerung des MDR-1-Proteins in den H322 Zellen sein. Da für diesen Abfangmechanismus von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die GSH-Peroxidase mit Hilfe von GSH keine Interaktion mit ATZ bekannt ist, kann dieses ein möglicher Grund für die unterschiedliche Reaktion der beiden Lungentumorzellen zu sein. Zusammenfassend kann man sagen, daß durch einen Anstieg der intrazellulären ROS es zu einer Steigerung der gebildeten MDR-1-Proteinmenge kommt und somit ein radikalischer Stress eine Ursache der MDR-1 Überexpression darstellt.

#### **4.2 Auswirkung Paraquat induzierter Radikale auf die Expression von MDR-1 in humanen Lungentumorzellen**

Während eine Hyperoxie in Rattenlungen überwiegend die Typ I-Zellen (95% der Lungenoberfläche) und Endothelzellen schädigt, kommt es drei Tage nach einer Paraquat (PQ)-Vergiftung zu einem kompletten Verlust des alveolären Epithels (Typ I+II Zellen) ohne das kapilläre Endothel zu beeinträchtigen (33). Die selektive Schädigung der Lunge durch PQ wird durch einen aktiven, energieabhängigen Prozess gegen einen Konzentrationsgradienten hervorgerufen, der PQ in den Lungenzellen anreichert und 24h nach i.v.-Applikation (Ratte) sich eine Lungen/Plasma Konzentrationsverhältnis von 42:1 einstellt (6, 118). PQ führt in den Lungenmikrosomen experimentell zu einer erhöhten O<sub>2</sub><sup>-</sup> Bildung und massivem NADPH-Verbrauch. Die gebildeten O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radikale werden durch Superoxiddismutasen zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und



weiter durch Katalase zu  $\bullet\text{OH}$  umgewandelt. Somit wirkt ein anderes radikalisches Spektrum als bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dessen Wirkung auf die MDR-1 Expression zuvor beschrieben wurde. Die durch den Reduktions-Oxidationsmechanismus gebildeten enormen Mengen an Sauerstoffradikalen wirken selbst toxisch und stimulieren die Lipidperoxidation mit destruktiver Eigenschaft auf die Biomembranen (33). Die Untersuchung des Mechanismus der PQ-Toxizität in Mäusen und Ratten zeigte, dass reduziertes Glutathion und Ascorbinsäure die PQ-induzierten Sauerstoffradikale abfangen können (12). Ob die permanent gebildeten Sauerstoffradikale Einfluss auf die MDR-1 mRNA und -Protein-Expression haben, wurde durch Hemmung der GSH-Synthese durch BSO oder durch oxidativen Schutz mittels Ascorbinsäure in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Die MDR-1-mRNA Veränderungen durch PQ, BSO und Kombination von PQ und BSO spiegelten sich jedoch nicht in der MDR-1-Proteinexpression wieder. Die Detektion des membranständigen MDR-1 Proteins zeigte keine Beeinflussung durch PQ, BSO oder der Kombination aus beiden.

Für PQ ist eine Erhöhung der AP1-Bindungsaktivität beschrieben worden (63). Denkbar ist, dass in den H322 und H358 über diesen oder einen ähnlichen Weg (NF-kappaB) die MDR-1 Gen-Expression durch PQ stimuliert und durch Vit.C über eine Stabilisierung von Transkriptionsfaktoren gehemmt wird. Die fehlende Reaktion auf PQ mit einer MDR-1 Proteinüberexpression konnte nicht geklärt werden.

Untersuchungen an Mäusen zeigten interessanterweise neben der Hemmung der GSH-Bildung durch BSO und einer Verstärkung PQ-bedingter ROS-Wirkungen eine Induktion von Metallothionein (76). Dieses cysteinreiche Protein dient als Radikalfänger und war durch die Kombination von BSO und PQ signifikant erhöht gegenüber der Induktion durch PQ allein. Ein so induzierter Radikalfänger würde möglicherweise eine potentielle Induktion von MDR-1 durch ROS dämpfen, jedoch wahrscheinlich nicht unterdrücken können. Wie in isolierten AII-Pneumozyten der Ratte (115) zeigten sich auch in den hier untersuchten Lungentumorzellen nach 24h PQ eine geringe Erhöhung der Menge reduzierten GSH's und eine Depletion des reduzierten GSH's durch BSO.

Ein Einfluss von PQ auf die MDR-1 mRNA konnte hier dargestellt werden. Nicht jedoch eine Veränderung des MDR-1 Proteingehaltes. Das für die Zelle entscheidende Korrelat MDR-1-Protein scheint somit in den genutzten Versuchsbedingungen nicht durch PQ bedingte Radikale induzierbar zu sein.

### **4.3 Funktionsnachweis des MDR-1-vermittelten Transportes durch das MDR-1-Substrat Rhodamin 123.**

Zur Untersuchung der MDR-1 Funktionalität wurde das gut charakterisierte System der primären Rattenhepatozyten als Referenz genutzt. In mehreren Studien wurde ein strikter Zusammenhang zwischen der *mdr1b*/P-Glykoprotein Überexpression in Kultur und der abnehmenden intrazellulären Rhodamin 123 (Rho-123) Konzentration durch *mdr1b*-vermittelten Efflux und dessen Hemmbarkeit durch P-Glykoprotein-Inhibitoren bzw. Chemosensitizern gesehen (78, 79, 120). Dieses System wurde als spezifisch für *mdr1b* (=humanes MDR-1) angesehen, da die Beteiligung anderer MDR-Phänotyp vermittelnder Proteine wie MRP-1 und -2 durch den Leukotrienrezeptor-Antagonist MK-571, ein spezifischer Inhibitor des MRP-vermittelten Transportes (30), ausgeschlossen werden konnte. Dieser MDR-1 Funktionsassay wurde zur Etablierung der inversen Einzelzellfluoreszenz-Mikroskopie genutzt. Ein speziell für Rho-123 abgestimmter Umlenk- und Sperrfilter erlaubte die Induktion der Fluoreszenz mit monochromatischem Licht und Messung des intrazellulären Rho123 Gehaltes.

Die Lungentumorzellen H358 (AII-Zell ähnlich) und H322 (Clara-Zell ähnlich) wurden auf unbeschichteten Borosilikat-Kammerdeckgläsern in DMEM kultiviert. Im Gegensatz zu den Rattenhepatozyten, zeigte sich in den humanen Tumorzellen H358 und H322 nur eine induzierbare Fluoreszenz von Rho123, die 1/10-tel der meßbaren Fluoreszenz der Rattenhepatozyten betrug. Diese geringe Fluoreszenz nach Beladung der Zellen mit Rho123 mag durch die geringere Zellgröße der Lungen-tumorzellen bedingt sein. Der aktive Efflux durch das MDR-1 kann auch nur ein Bruchteil dessen sein, was die Rattenhepatozyten gewährleisten, da der MDR-1-Gehalt in den Lungentumorzellen nur gering ist. Die Hemmbarkeit des aktiven Effluxes von Rho123 erfolgte durch 10µM Verapamil. Dabei blockiert Verapamil das cross-linking zwischen den transmembranären Segmenten 6 und 12 (TM6+12). TM 6+12 sind wichtig für den Transport von Xenobiotika, da sie direkt die 2 transmembranären Domänen zu ihren entsprechenden ATP-bindenden Domänen verbinden. Dieser cross-talk ist notwendig, um die ATPase durch Konformationsänderung von TM6+12 durch sog. cross-linking zu stimulieren, welche dann erst die Energie für den transmembranären Transport bereitstellt (67).

Beide Tumorzellen H322 und H358 zeigten einen zeitabhängigen aktiven Efflux von Rho123, der durch Verapamil signifikant gehemmt wurde. Eine Induktion von MDR-1 durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte auch sein Korrelat in dem geringeren intrazellulären Rho123-Gehalt durch stärkeren aktiven Efflux. PQ zeigte keine MDR-1 Induzierbarkeit mit einem konsekutiven gleichen MDR-1 Funktionsverhalten wie die Kontrollzellen. Die gezeigte Korrelation zwischen der

MDR-1-Menge in den humanen Lungentumorzellen und dem MDR-1 abhängigen aktiven Efflux von Rho-123 weist auf ein funktionell aktives P-Glykoprotein hin.

#### **4.4 Expression des Multidrug Resistance-associated Protein (MRP-1) in humanen Lungentumorzelllinien durch reaktive Sauerstoffspezies**

Die Untersuchung des MRP Genes in Lungentumorzelllinien zeigte in NSCLC-Zelllinien immer, aber in SCLC-Zelllinien seltener eine MRP-Expression (18). Eine MRP-Protein-Überexpression wird für eine fehlende Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika in Pgp-negativen Zellen angesehen.

Während das zuvor beschriebene P-Glykoprotein MDR-1 einen transmembranären Transportmechanismus für Chemotherapeutika, hydrophobe Analgetika, Lipide, Hormone und Cholesterol darstellt, werden organische Ionen, konjugierte und unkonjugierte Xenobiotika als Substrate der MRP-Transporter angesehen. Das hier untersuchte MRP-1, welches für den Export von Xenobiotika und Zytostatika verantwortlich gemacht wird, unterscheidet sich von beispielsweise MRP-2 (cMOAT), welches permanent in Hepatozyten exprimiert wird und im Bilirubin-Transport involviert ist, weniger durch das Spektrum der Substrate, als durch die Membranlokalisation, die domän-spezifischen Lokalisationen der ATPasen und die kinetischen Eigenschaften (unterschiedliche  $K_m$  für die Substrate) (20). Besonders für MRP-1 wird eine Substrat-abhängige ATPase-Aktivität und damit Transport-Aktivität beschrieben (13).

In den Experimenten zeigte sich ein viel höherer Gehalt an MRP-1 Protein in der Plasmamembran der Lungentumorzellen, verglichen mit MDR-1. Eine Studie, die anhand verschiedener Tumore die Expression von p53 untersuchte zeigte, dass eine Expression des wild-type p53 in humanen Prostatakrebs, Melanom und Kolonkarzinom die MRP-1-Transkription, -Translation und -Funktion unterdrückt (112). Eine p53 Mutation hatte nicht diesen Effekt. Eine weitere Studie berichtete über die Fähigkeit von p53, die MRP-1 Promotor-Aktivität zu vermindern (116). Durch den Verlust oder eine Mutation des p53, welches in der Tumorprogression oft geschieht, kann MRP-1 verstärkt exprimiert werden. Die genutzten H358 und H322 zeigten eine hohe basale MRP-1-mRNA und -Protein-Expression, welches mit dem bekannten p53-Verlust bzw. Mutation korreliert.

In beiden Tumorzelllinien liessen sich MRP-mRNA und MRP-1-Protein durch  $H_2O_2$  bedingte Sauerstoffradikale induzieren. Auch die antioxidative Wirkung von Ascorbinsäure machte sich in einer deutlichen Abnahme der MRP-1 Expression und  $H_2O_2$ -induzierten

Überexpression bemerkbar. Diese 2 Parameter sprechen für eine enge Beziehung zwischen ROS und dem MRP-1-Gehalt der Lungentumorzellen. Die MRP-1 Expression kann durch die Transkriptionsfaktoren YB-1 und SP1 gesteigert werden (109, 119). YB-1 ist an den Effekten externer Stimuli wie Cisplatin, Mitomycin C und UV-Licht beteiligt. Die Translokation von YB-1 vom Zytoplasma in den Zellkern durch umweltbedingte Stressfaktoren ist ein allgemeiner Aktivierungsmechanismus von YB-1. Eine Steigerung des oxidativen Stresses kann über diesen Weg zu einer MRP-1 Überexpression führen.

Eine alleinige Behandlung der Tumorzellen mit ATZ führte zu einer Abnahme der MRP-mRNA.  $H_2O_2$  konnte in ATZ-vorbehandelten Zellen keinen weiteren Anstieg erreichen. Beide Lungentumorzelllinien zeigten unter dem kombinierten Einfluss von  $H_2O_2$  und ATZ eine Abnahme des detektierbaren MRP-1-Proteins selbst bei niedrigen  $H_2O_2$  Konzentrationen. Dieses unerwartete Phänomen der MRP-1-Protein Suppression, die in den Clara-Zell ähnlichen H322 stärker erfolgte als in den AII-Zell ähnlichen H358, konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund der komplexen gesamtzellulären ATZ-Effekte nicht geklärt werden. Denkbar ist, dass ATZ neben der Katalasehemmung und der damit verbundenen Erhöhung intrazellulärer Radikale noch weitere zelluläre, bislang nicht untersuchte Wirkungen hat. Diese können an der Abnahme der MRP-1-Protein Expression beteiligt sein.

Auch PQ ist ein potenter Induktor der MRP-1-mRNA und des MRP-1-Proteins. Die Suppression des GSH-Gehaltes der Zelle durch BSO sollte zu einer Verstärkung der PQ-bedingten Radikale führen. Wider Erwarten führte einerseits eine BSO-Behandlung (20h) mit und ohne anschließende PQ Inkubation zu einer Abnahme der MRP-mRNA (H322>H358), andererseits zu einer Zunahme des MRP-1-Proteins. Eine Inkubation mit BSO über 24h und konsekutiver GSH-Suppression wurde mit einer Verstärkung der DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-I (AP1) assoziiert (51). Die Hemmung der MRP-1-mRNA Synthese durch BSO läßt auf eine translationelle / posttranslationelle Beeinflussung schließen, die zu einem Anstieg der MRP-1-Protein-Expression in der Plasmamembran führt. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass oxidativer Stress zu einer MRP-1 Gen Aktivierung führt und dadurch das MRP-1 Protein in der Plasmamembran überexprimiert wird.

#### **4.5 Hemmung des MRP-1-vermittelten Transportes und Anreicherung des MRP-1-Substrates CDF**

Eine Bedeutung der Erkenntnisse über die Induzierbarkeit von MRP-1 für die klinische Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika lässt sich erst mit dem Nachweis

der MRP-Funktionalität postulieren. Der kürzlich beschriebene Transportmechanismus des organischen Anions Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) durch MRP-1 (19) und die Hemmbarkeit von MRP-1 durch MK-571, einem Leukotrien LTD<sub>4</sub> Rezeptor Antagonist (30), wurden ausgenutzt, um mittels Einzelzellfluorimetrie die MRP-1 Funktion nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass sich in Anwesenheit von MK-571 der intrazelluläre CDF-Gehalt deutlich erhöht und damit das funktionstüchtige MRP-1 eine zu überwindende Barriere der erfolgreichen Chemotherapie darstellt. Diese könnte durch andere Modulatoren wie Rifampicin B, Probenecid oder Indomethacin in Kombination mit Chemotherapeutika klinische Relevanz erfahren (19). Courtois et al. (1999) zeigten, dass Rifampicin B das MRP-1 hemmt, aber keine Interaktion mit P-gp Aktivität zeigt. Probenecid und Indomethacin waren starke Inhibitoren des CDF-Effluxes mit nur einer geringen Interaktion mit MRP-2.

#### **4.6 Expression des Lung Resistance-related Protein (LRP) in humanen Lungentumorzellen**

Während sich die untersuchten Proteine MDR-1, mit einer sehr niedrigen basalen Expression, und das stärker exprimierte MRP-1 durch reaktive Sauerstoffspezies induzieren lassen, zeigt sich hingegen beim LRP sowohl auf mRNA und Protein Ebene eine recht stabile Grundexpression.

In den durchgeführten Experimenten wurde die Induktion der LRP-mRNA-Synthese durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PQ ersichtlich. Das relativ konstant exprimierte LRP-Protein liess sich kaum durch radikalischen Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induzieren. Das ebenfalls eingesetzte Paraquat (PQ) bewirkte ebenfalls nur einen tendentiellen Anstieg der LRP-mRNA, der sich kaum durch eine Vorinkubation der Zellen mit BSO oder Ascorbinsäure beeinflussen liess. Die Menge an detektierbarem LRP-Protein zeigte keine Veränderung unter dem Einfluss von Paraquat. Die fehlende Reaktion auf PQ und die nur geringe Sensibilität des LRP-Proteins gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lassen den Schluss zu, dass sich LRP durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedingten zellulären Effekte nicht wesentlich in der Expression beeinflussen lässt und PQ bedingte Radikale keinen Einfluss haben. Möglicherweise werden diese gebildeten Radikale durch GSH, Glutathionperoxidase, SOD und Katalase zu stark entkräftet, um die Zelle zur LRP-Überexpression anzuregen(323). Über den kürzlich charakterisierten LRP-Gen Promotor ist noch wenig bekannt, aber es wird eine Beteiligung von Radikalen an der LRP-Gen Regulation vermutet (60).

Das in der Nähe des Zellkerns lokalisierte LRP scheint ein fester Bestandteil der nicht-kleinzelligen Lungentumorzellen zu sein, um durch eine rasche Umverteilung von Zytostatika innerhalb der Zelle die DNA vor einer Interkalation mit Xenobiotika zu schützen.

Studien über die Expression von MDR-Proteinen in humanen Tumoren zeigten eine überwiegende Expression von LRP (78%) und MRP (87%), jedoch weniger häufig eine P-gp Expression (24%) (42). Zelllinien, die von Tumoren abgeleitet wurden, sollen gering sensibel für Chemotherapeutika sein und hohe LRP-Mengen besitzen. Unter den 3 MDR-assoziierten Proteinen zeigte LRP den grössten individuellen Wert als Marker für die *in vitro* Resistenz zu den MDR-bezogenen Chemotherapeutika Doxorubicin und Vincristin und auch zu einigen nicht-klassischen MDR-Medikamenten (Cisplatin, Carboplatin und Melphalan) (43). Somit ist LRP, auch aufgrund seiner häufig primären Expression, in der Lage, eine Lücke in der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu schliessen, die nicht durch P-gp und MRP abgedeckt ist. Auch eine signifikante Korrelation zwischen vorheriger Chemotherapie und erhöhter LRP-Menge wurde in einigen Tumoren gefunden (97). Proben von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) sind je nach histologischem Typ zwischen 36% und 83% LRP-positiv (42) und meistens primär wenig sensibel auf eine zytostatische Therapie. In den kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC), ein primär chemosensitiver Typ der Lungenkarzinome, wurden nur in 5% LRP detektiert. Ein Zusammenhang zwischen der LRP-Expression und der Chemoresistenz liegt nahe, konnte allerdings noch nicht bestätigt werden. Es ist auch nicht zu erwarten, dass der alleinige LRP-Nachweis ein prognostisches Kriterium abgibt. Dafür sind die Resistenzmechanismen viel zu komplex. Aber es kann ein Baustein im gesamten Abwehrsystem tumoröser Zellen darstellen und in Kombination mit MDR-1 und MRP-1 eine effektive Therapie durch einen geringeren intrazellulären Gehalt an Zytostatika, im Vergleich zu nicht-tumorösen Zellen, verhindern.

#### **4.7 Reaktive Sauerstoffspezies als Mediatoren der MDR-1-, MRP-1- und LRP – Expression in normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) im Vergleich zu den Lungentumorzelllinien H322 und H358**

Anhand der humanen permanenten Lungentumorzelllinien wurde die basale Expression und Reaktion auf intrazelluläre Sauerstoffradikale von den 3 MDR-vermittelnden Proteinen charakterisiert. Um die Bedeutung dieser Proteine für nicht tumoröse Lungenzellen beurteilen zu können, die im Falle einer Chemotherapie den selben Konzentrationen wie die primären Lungentumore ausgesetzt wären, wurden kultivierte normale humane Bronchialepithelzellen (NHBE) untersucht. Die Erwartung, dass die MDR- Expression in den Kulturen verschiedener Spender unterschiedlich ausfällt, hatte sich bestätigt. Allerdings waren die Schwankungen von MDR-1 so unerwartet gross, dass in einigen Kulturen kein MDR-1 Protein detektierbar war. Geringere Schwankungen des MRP-1-Proteins waren detektierbar.

Trotz dieser Schwankung der MDR-1 Expression in NHBEC-Kulturen ist den Lungentumorzellen gemeinsam, dass beide Zelltypen wenig MDR-1 Protein exprimieren. Des Weiteren reagierten die NHBEC viel empfindlicher auf Radikale wie  $H_2O_2$  und PQ. Höhere  $H_2O_2$  Konzentrationen als 0,1 mM wurden nicht toleriert, welches 1/10 der eingesetzten Konzentration für die H322 und H358 entspricht. Aufgrund bisheriger Ergebnisse zeichnet sich der Trend ab, dass PQ-bedingte Radikale sowohl MDR-1 als auch MRP-1 induzieren kann, während  $H_2O_2$  das MRP-1 Protein induzierte, nicht aber das MDR-1. Auch die fehlende Reaktion von LRP auf  $H_2O_2$  und die LRP-Protein-Überexpression durch PQ und PQ/BSO Koinkubation in den NHBEC's deutet auf eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber den Tumorzellen hinsichtlich MDR-1-, MRP-1- und LRP- Proteinexpression hin. Die limitierte Anzahl der zur Verfügung stehenden NHBEC-Kulturen und die starken interindividuellen Unterschiede in der basalen Expression der MDR-1- und MRP-1- Proteine erschweren die Übertragbarkeit der Erkenntnisse über die Beeinflussung der Expression der MDR-Proteine von den Tumorzellen auf die humanen Bronchialepithelzellen. Dennoch kann man von einer potentiellen Induzierbarkeit der MDR-1-, MRP-1- und LRP-Proteine ausgehen, die jedoch nicht in ihrer Ausprägung vorhersagbar ist, wie in den permanenten Lungentumorzelllinien H322 und H358.

Dass trotz dieser interindividuellen und kulturdauerabhängigen Unterschiede der MDR-1- und MRP-1-Proteinexpression diese Proteine klinische Relevanz haben dürften, zeigten die durchgeführten Funktionsassays dieser Proteine. Beide waren funktionell aktiv und liessen sich durch die spezifischen Inhibitoren hemmen.

Diese Ergebnisse der Arbeit legen die Beeinflussbarkeit der MDR-vermittelnden Proteine in Lungenzellen durch ROS und deren Hemmbarkeit durch spezifische Inhibitoren dar. Ausgehend vom Grundgedanken, dass Zytostatika durch ROS-Bildung selbst Anteil an der Entstehung einer Resistenz durch Induktion von MDR-Proteinen haben, kann dieser Mechanismus durch Antioxidative Substanzen reduziert oder durch funktionelle Inhibitoren wie z.B. Cyclosporin A unterbrochen werden. Allerdings werden in ähnlicher Weise auch die normalen Lungenzellen beeinflusst und damit ihre Toleranz gegenüber Zytostatika.

## 5. Zusammenfassung

Die Lunge ist durch die Exposition gegenüber Schadstoffen aus der Luft (Rauchen), aber auch durch Chemotherapeutika (Doxorubicin), verstärkt Sauerstoffradikalen ausgesetzt, die einen zellulären Schaden hervorrufen können. Das P-Glykoprotein MDR-1 und das Multidrug Resistance-associated Protein MRP-1, beide verankert in der Zellmembran, und das Lung-Resistance related Protein LRP sind durch aktiven Transport fähig, die Zelle vor einer Schädigung durch Fremdstoffe zu schützen. Diese Proteine können an der Entstehung primärer und sekundärer Resistenzen kleinzelliger (SCLC) und nicht-kleinzelliger (NSCLC) Lungentumore beteiligt sein.

Über eine Überexpression von MDR-1, MRP-1 und LRP in humanen Lungenzellen ist bisher wenig bekannt. Daher sollte die vorliegende Arbeit dazu beitragen, ob intrazelluläre Sauerstoffradikale an einer Regulation der MDR-assoziierten Proteine beteiligt sind.

- Die permanenten humanen Lungentumorzelllinien (H322 und H358) wurden zur Untersuchung der MDR-1, MRP-1 und LRP Proteine genutzt. Deren Expression wurde mittels Northern Blot, RT-PCR und Western Blot Techniken nachgewiesen. Zur Erhöhung des zellulären Gehaltes an reaktiven Sauerstoffspezies wurden die Modellsubstanzen  $H_2O_2$  und Paraquat genutzt. Die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen wurden durch den Vitalitätstestes MTT mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromides ausgetestet. Mit Hilfe der Einzelzellfluorimetrie wurden die Funktionen von MDR-1 (durch Rhodamin-123) und MRP-1 (durch Carboxy-2,7-dichlorofluorescein) nachgewiesen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit den Untersuchungen an Kulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen verglichen.
- AII-Zell- und Clara-Zell-ähnliche humane Lungentumorzellen zeigten eine schwache basale P-Glykoprotein/MDR-1 Expression. Die Erhöhung der intrazellulären ROS durch Applikation von  $H_2O_2$  führte zu einer gleichsinnigen Überexpression von MDR-1-mRNA und Protein bzw. Hemmung dieser durch Antioxidantien. Ein zusätzlich erhöhter intrazellulärer Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Inkubation mit dem Katalaseinhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) führte in den H358 nur zu einer geringen zusätzlichen MDR-1-Expressionssteigerung, jedoch nicht in den H322. Ein radikalischer Stress durch PQ hingegen konnte die MDR-1-mRNA, nicht aber die Protein-Expression beider Zelllinien erhöhen.
- Durch die Etablierung der Methode zur Bestimmung der MDR-1 Transportaktivität mittels Einzelzellfluorimetrie für adhärent wachsende Zellen, konnte gezeigt werden, dass



das exprimierte MDR-1 funktionell aktiv ist. Der etablierte Inhibitor der MDR-1 Funktion Verapamil führte zu einer Hemmung des MDR-1 und damit des MDR-1 abhängigen Rhodamin-123 Effluxes.

- Beide Lungentumorzelllinien zeigten eine starke intrinsische Expression von MRP-1, welches auf eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition mit der gleichsinnigen Überexpression von mRNA und Protein und einer Abnahme unter Antioxidantien reagierte. Eine Vorbehandlung mit ATZ zur Katalasehemmung führte allerdings zu einer Abnahme der MRP-1 Protein-Expression. Im Gegensatz zu MDR-1, liess sich MRP-1 durch PQ-vermittelte Radikale induzieren und durch GSH-Suppression mittels BSO zusätzlich verstärken.
- Unter Nutzung der Einzelzellfluorimetrie wurde mittels Carboxy-2',7',-dichlorofluorescein (CDF) die Funktionalität des MRP-1 nachgewiesen. Der aktive Efflux konnte durch den MRP-1 Inhibitor MK-571 gehemmt werden. Dabei konnte eine Beteiligung von MDR-1 am Transport von CDF mittels Koinkubation von Verapamil ausgeschlossen werden. Da sich das Gleichgewicht zwischen passivem Einstrom und aktiven Efflux innerhalb weniger Minuten einstellte kann man davon ausgehen, dass ein schneller und effektiver Transport von CDF durch MRP-1 vorliegt. Die Transportkapazität für Xenobiotika durch MRP-1 wird somit bedeutender sein, als der MDR-1 vermittelte Transport.
- In den Lungentumorzelllinien H358 und H322 haben intrazelluläre Radikale auf das basal gut exprimierte LRP den geringsten Einfluss.
- Als relevante nicht-tumoröse Zellen für die Exposition gegenüber Xenobiotika wurden Kulturen von normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) unter ähnlichen Bedingungen wie die Lungentumorzelllinien hinsichtlich der MDR-1, MRP-1 und LRP Expression untersucht. Die Primärzellkulturen zeigten erhebliche interindividuelle Unterschiede in der basalen Expression der MDR-Proteine. MDR-1 zeigte grosse, MRP-1 geringere Schwankungen zwischen den Patientenproben. Die LRP-Proteinexpression war relativ konstant. Auch mit der Zunahme der Kulturdauer erhöhte sich die Grundexpression von MDR-1- und MRP-mRNA. Ähnlich den Lungentumorzellen reagierten die NHBE auf Promotoren für intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Dabei konnte gezeigt werden, dass die MDR-1-, MRP-1- und LRP-Protein Expression empfindlich für PQ bedingte Radikale ist. Der erhöhte intrazelluläre Gehalt an ROS, bedingt durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, stimulierte die MRP-1 Expression, jedoch nicht der LRP- und MDR-1-Proteine.

Es konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre ROS und der Redoxstatus der untersuchten Zellen eine Rolle in der Regulation der MDR-vermittelnden Proteine MDR-1, MRP-1 und

LRP spielen. Besonders MDR-1 und MRP-1 zeigten sich als sensibel gegenüber einem oxidativen Stress. Diese reaktiven Sauerstoffspezies können durch Zytostatika, Rauchen, Bestrahlung oder Sauerstoffbeatmung induziert werden. Die aufgrund der Radikale überexprimierten MDR-assoziierten Proteine können therapeutische Bedeutung durch Vermittlung primärer oder sekundärer Resistenzen erlangen. Bei einem Nachweis von MDR-Proteinen in Lungentumoren (in vivo) können Kombinationen mit funktionellen MDR-1 und MRP-1 Hemmern zu einer Erhöhung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika führen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Almquist K.C., Loe D.W., Hipfner D.R., Mackie J.E., Cole S.P., Deeley R.G.:** „Characterization of the mr 190'000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cells“ *Cancer Res.* 55(1) (1995) 102-10
2. **Ambudkar S.V., Lelong I.H., Zhang J., Cardarelli C.O., Gottesman M.M., Pastan I.:** „Partial purification of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug stimulatable ATP-hydrolysis.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 8472-76,
3. **Bakos E., Evers R., Szakas G., Tusnady G.E., Welker E., Szabo K., de Haas M., van Deemter L., Borst P., Varadi A., Sarkadi B.:** „Functional multidrug resistance protein (MRP) lacking the N-terminal transmembrane domain.“ *J Biol Chem* 273(1998) 32167-75
4. **Barrand M.A., Heppell-Parton A.C., Wright K.A., Rabbits P.H., Twentyman P.R.:** „A 190-kilodalton protein overexpressed in non-P-glycoprotein-containing multidrug resistant cells and its relationship to the MRP gene.“ *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 110-117
5. **Bellamy W.T.:** „P-glycoprotein and multidrug resistance“ *Ann Rev Pharmacol Toxicol* , 36 (1996) 161-83
6. **Bend J.R., Serabjit-Singh, C.J., Philpott R.M.:** „The pulmonary uptake, accumulation and metabolism of xenobiotics.“ *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25 (1985) 97-145
7. **Berger W., Elbling L., Micksche M.:** „Expression of the major vault protein lrp in human non-small-cell cancer cells: activation by short term exposure to antineoplastic drugs.“ *Int. J. Cancer* 88 (2000) 293-300
8. **Berger W, Elbling L, Hauptmann E, Micksche M.:** „Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) and chemoresistance of human non-small-cell lung cancer cells.“ *Int J Cancer.* 73(1) (1997) 84-93
9. **Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J.:** „A family of drug transporters: multidrug resistance-associated proteins.“ *Journal of the National Cancer Institut,* 92 (16) (2000) 1295-302
10. **Brown L.A., Bai C., Jones D.P.:** „Glutathione protection in alveolar type II cells from fetal and neonatal rabbits.“ *Am. J. Physiol* 262 (1992) 305-12
11. **Burnette, W.N.:** „Western blotting“: electrophoretic transfer of protein from sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.* 112 (1981) 195-203
12. **Bus J.S., Cagen S.Z., Olgaard M., Gibson J.E.:** A mechanism paraquat toxicity in mice and rats.“ *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35 (1976) 501-51
13. **Chang X.B., Hou Y.X., Riordan J.R.:** „ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein.“ *J Biol Chem* 272 (1997) 30962-30968
14. **Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B.:** „Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells.“ *Cell.* 47(3) (1986) 381-9.
15. **Chin, K.V., Pastan, I., Gottesman, M.M.:** „Function and regulation of the human multidrug resistance gene.“ *ADV Cancer Res* 60 (1993) 157-80
16. **Chin K.V., Ueda K., Pastan I., Gottesman M.M.:** „Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53.“ *Science* 255 (5043) (1992) 459-462
17. **Chomczynski, P., Sacchi, N.:** „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.“ *Analyt. Biochem.* 162 (1987) 156-159
18. **Cole S.P.C., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M.V., Deeley R.G.:** „Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant lung cancer cell line.“ *Science,* 258 (1992) 1650-54

19. **Courtois A., Payen L., Lagadic, D., Guillouzo A., Fardel O.:** „Evidence for a multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)- related transport system in cultured rat liver biliary epithelial cells.“ *Life Science*, 64(9) (1999) 763-774
20. **Cui Y., König J., Buchholz U., Spring H., Leier I., Keppler D.:** „Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells.“ *Molecular Pharmacology* 55 (1999) 929-937
21. **Deng L., Lin-Lee Y.C., Claret F.X., Kuo M.T.:** „2-acetylaminofluorene up-regulates rat mdr1b expression through generating reactive oxygen species that activate NF-kappa B pathway.“ *J Biol Chem* (2001) 276(1):413-20
22. **Doyle L.A.:** „Mechanisms of drug resistance in human lung cancer cells.“ *Seminars in Oncology*, 20(4) (1993) 326-337
23. **Doyle L.A., Gao Y., Yang W., Ross D.G.:** „Characterization of a 95 kilodalton membrane glycoprotein associated with multi-drug resistance.“ *Int J Cancer*: 62 (1995) 593-598
24. **Ellmann G.L.:** *Arch. Bioch. Biophys.* 82 (1959) 70-77
25. **Fardel O., Lecureur V., Daval S., Corlu A., Guillouzo A.:** „Up-regulation of P-glycoprotein expression in rat liver cells by a doxorubicin treatment.“ *Eur J Biochem* 246(1) (1997) 186-192
26. **Fardel O., Lecureur V., Guillouzo A.:** „The P-glycoprotein multidrug transporter.“ *Gen. Pharmac.* 27(8) (1996) 1283-1291
27. **Fardel O., Lecureur V., Corlu A., Guillouzo A.:** „P-glycoprotein induction in rat liver epithelial cells in response to acute 3-methylcholanthrene treatment.“ *Biochem. Pharmacol.* 51 (1996) 1427-1436
28. **Fath M.J., Kolter R.:** „ABC transporter: Bacterial exporters.“ *Microbiol. Rev.* 57 (1993) 995-1017
29. **Gartner J., Moser H., Valle D.:** „Mutations in the 70-kDa peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrom.“ *Nat Genet.* 1 (1992) 16-23
30. **Gekeler V., Ise W., Sanders K.H., Ulrich W.R., Beck J.:** „The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance.“ *Biochemical Biophysical Research Communications* 208 (1995) 345-352
31. **Gottesman M.M., Pastan I.:** „The multidrug transporter, a double-edged sword.“ *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 12163-12166
32. **Gottesman M.M., Pastan I.:** „Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 62 (1993) 385-427
33. **Gram T.E.:** „Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity.“ *Pharmacol Reviews* 49(4) (1997) 297-341
34. **Graham C.H., Kobayashi H., Stankiewicz K.S., Man S., Kapitain S.J., Kerbel R.S.:** „Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents.“ *J. Nat. Cancer Inst.* 86 (1994) 975-982
35. **Gros P., Raymond M., Housman D.:** „Cloning and characterization of mouse mdr genes.“ *Mol Cell Biol* 8(7) (1988) 2770-2778
36. **Harper P.G., Dally MB, Geddes DM, Spiro SG, Smyth JF, Souhami RL.:** „Epipodophyllo-toxin (VP16-213) in small cell carcinoma of the Bronchus resistant to initial combination chemotherapy.“ *Cancer Chemother Pharmacol* 7(2-3) (1982) 179-80
37. **Henninghausen G.:** *Z. ges. Hygiene* 30 (1984) 11-14
38. **Higgins C.F.:** „ABC-transporters: from microorganisms to man.“ *Annu Rev Cell Biol.* 8 (1992) 67-113
39. **Hoet P.H.M., Lewis C.P.L., Demedts M., Nemery B.:** „Putrescine and paraquat uptake in human lung slices and isolated type II pneumocytes.“ *Biochem Pharmacol* 48(3) (1994) 517-24

40. **Hopper E., Belinsky M.G., Zeng H., Tosolini A., Testa J.R., Kruh G.D.:**, Analysis for the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily.“ *Cancer Lett* 162 (2) (2001 Jan 26) 181-91
41. **Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Flens M.J., et al.:**„Expression of the non-P-glycoprotein multidrug-resistance associated protein LRP in normal human tissues and tumors.“ *Am J Pathol* 148 (1996) 877-887
42. **Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Flens M.J., Schroeijers A.B., van der Valk P., Scheper R.J.:** „Major vault protein LRP-related multidrug-resistance.“ *Europ. J. of Cancer* Vol.32A, No.6 (1996) 979-984
43. **Izquierdo M.A., Shoemaker R.H., Flens M.J., Scheffer G.L., WU L., Prather T.R., Scheper R.J.:** „Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panles of human cancer-cell lines.“ *Int J Cancer* 65(2) (1996) 230-237
44. **Jantsch B.:** „Aufbau einer gekoppelten Reversen Transkription / Polymerase Kettenreaktion für den Nachweis der Boten-Ribonukleinsäure des „Multidrug-Resistance-Gens“ mdr1.“ Universität Leipzig Dissertation (1997) 1998.-81
45. **Jedlitschky G., Leier I., Buchholz U., Center M., Keppler D.:**„ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein.“ *Cancer Res* 54 (1994) 48333-6
46. **Jehn U., Berghof H.:** „Supportive Massnahmen in der Onkologie“ Thieme, Stuttgart, 1995
47. **Juranka P.F., Zastawny R.L., Ling V.:** „P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins.“ *FASEB J.* 3 (1989) 2583-92
48. **Kamijo K., Taketani S., Yokota S, Osumi T., Hashimoto T.:** „The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the MDR (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily.“ *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 4534-4540
49. **Kellen J. A.:** „Alternative Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer.“ Birkhäuser Boston, Cambridge, 1995
50. **Keppler D., Leier I., Jedlithscky G., Konig J.:** „ATP-dependent transport of glutathione-S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP-2.“ *Chem Biol Interact* 111-112 (1998) 153-61
51. **Kitayama T., Ogita K., Nomoto M., Yoneda Y.:** „Sensitization by prolonged glutathione depletion von kainic acid to potentiate DNA binding of the nuclear transcription factor activator protein-1 in murine hippocampus.“ *Neurosci Lett* 269(3) (1999) 157-60
52. **Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., van Eijk M.J., Juijn J.A., Baas F., Borst P.:** „Analysis of expression of cMOAT (MRP-2), MRP-3, MRP-4, and MRP-5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP-1), in human cancer cell lines.“ *Cancer Res* 57 (16) (1997) 3537-47
53. **Kool M., van der Linden M., de Haas M., Baas F., Borst P.:** „Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells.“ *Cancer Res* 59 (1999) 175-82
54. **Kool M., van der Linden M., de Haas M., Scheffer G.L., de Vree J.M., Smith A.J., Jansen G., Peters G.J., Ponne N., Scheper R.J., Oude Elferink R.P.J., Baas F., Borst P.:** „MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 6914-9
55. **Kuo M.T., Bao J., Furuichi M., Yamane Y., Gomi A. Savaraj N., Masuzawa T., Ishikawa T.:**„Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcystein synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues.“ *Biochem Pharmacol* 55(5) (1998) 605-15

56. **Krishnamachary N., Center M.S.:** „The MRP gene associated with a non-p-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190 kDa membrane-bound glykoprotein.“ *Cancer Res* 53(16) (1993) 3658-61
57. **Laemmli U.K.:** „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature* 227 (1970) 680-685
58. **Lai S.L., Goldstein L.J., Gottesman M.M.:** „MDR-1 gene expression in lung cancer.“ *J Natl Cancer Inst* 81 (1989) 1144-1150
59. **Lampidis T.J., Munck J.N., Krishan A., Tapiero H.:** „Reversal of resistance to rhodamin 123 in Adriamycin-resistant Friend leukemia cells.“ *Cancer Res.* 45( 6) (1985) 2626-2631
60. **Lange C., Walther W., Schwabe H., Stein U.:** „Cloning and initial analysis of the human multidrug resistance-related MVP/LRP gene promoter.“ *Biochem Biophys Res Commun* 278(1) (2000) 125-33
61. **Lecureur V., Thottassery J.V., Sun D., Schuetz E.G., Lahti J., Zambetti G.P., Schuetz J.D.:** „Mdr1b facilitates p53-mediated cell death and p53 is required for mdr1b upregulation in vivo.“ *Oncogene* 20(3) (2001) 303-313
62. **Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U., Cole S.P., Deeley R.G., Keppler D.:** „The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C<sub>4</sub> and structurally related conjugates.“ *J Biol Chem* 269 (1994) 27807-10
63. **Li X., Sun A.Y.:** „Paraquat induced activation of transcription factor AP-1 and apoptosis in PC12 cells.“ *J Neural Transm* 106 (1999) 1-21
64. **Loe D.W., Almquist K.C., Deeley R.G., Cole S.P.:** „Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C<sub>4</sub> and chemotherapeutic agents in membrane vesicles.“ *J Biol Chem* 271 (1996) 9675-82
65. **Loe D.W., Deeley R.G., Cole S.P.:** „Charakterization of vincristine transport by Mr 190'000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione.“ *Cancer Res* 58 (1998) 5130-6
66. **Loo T.W., Clarke D.M.:** „Functional consequences of phenylalanine mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein.“ *J Biol Chem* 268(27) (1993) 19965-72
67. **Loo T. W., Clarke D.M.:** „Drug stimulated ATPase activity of human p-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6+12“ *J Biological Chemistry* 272 (34) (1997) 20986-89
68. **Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.:** „Protein measurement with the folin phenol reagent.“ *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275
69. **Masaki H., Okano Y., Sakurai H.:** „Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ultraviolet-B light“ *Arch Dermatol Res* 290 (1998) 113-118
70. **Mattern J., Efferth T., Volm M.:** „Overexpression of p-glycoprotein in human lung carcinoma xenografts after fractionated irradiation in vivo.“ *Radiat Res* 127 (1991) 335-338
71. **Monaco J.J.:** „A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing.“ *Immunol. Today* 13 (1992) 173-178
72. **Moosman T.:** „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.“ *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63
73. **Muller M., Meijer C., Zaman G.J., Borst P., Scheper R.J., Mulder N.H., de Vries E.G., Jansen P.L.:** „Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport.“ *Proc. Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 13033-7
74. **Muller C., Laurent G., Ling V.:** „P-glycoprotein stability is affected by serum deprivation and high cell density in multidrug-resistant cells.“ *J Cellular Physiol* 163 (1995) 538-544

75. **Nagao N., Etoh T., Yamaoka S., Okamoto T., Miwa N.:** „Enhanced invasion of tax-expressing fibroblasts into the basement membrane is repressed by phosphorylated ascorbate with simultaneous decrease in intracellular oxidative stress and NF-kappa B activation.“ *Antioxid Redox Signal* 2(4) (2000) 727-738
76. **Nakagawa I., Suzuki M., Imura N., Naganuma A.:** „Involvement of oxidative stress in PQ induced metallothionein synthesis under glutathionedepletion“ *Free Radic Biol Med* 9(12) (1998) 1739-45
77. **Nakatsukasa H., Silverman J.A., Gant T.W., Evarts R.P., Thorgeisson S.S.:** „Expression of multidrug resistance genes in rat liver during regeneration and after carbon tetrachloride intoxication.“ *Hepatology* 18 (1993) 1202-1207
78. **Nare B., Prichard R. K., Georges E.:** „Characterization of Rhodamine 123 binding to P-glycoprotein in human multidrug-resistant cells.“ *Mol. Pharm.* 45 (1994) 1145-1152
79. **Neyfakh A.A.:** „Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance.“ *Exp. Cell Res.* 174 (1988 a) 168-176
80. **Neyfakh A. A., Fmitrevskaya T. V., Sarpinskaya A. S.:** „The membrane system responsible for multidrug resistance is operating in nonresistant cells.“ *Exp. Cell. Res.* 148 (1988 b) 513-517
81. **Noonan K.E., Beck C., Holzmayer T.A., Chin J.E., Wunder J.S., Andrulis I.L., Gazdar A.F., Willman C.L., Griffith B., von Hoff D.D., Roninson I.B.:** „Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction.“ *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87 (1990) 160-164
82. **Ogretmen B., Safa A.R.:** „Negative regulation of MDR1 promoter activity in MCF-7, but not in multidrug resistant MCF-7/Adr, cells by cross-coupled NF-kB/p65 and c-Fos transcription factors and their interaction with the CAAT region.“ *Biochemistry* 38 (1999) 2189-2199
83. **Paulusma C.C., Kool M., Bosma P.J., Scheffer G.L., Ter Borg F., Scheper R.J., Tytgat G.N., Borst P., Baas F., Oude Elferink R.P.:** „A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome.“ *Hepatology* 25 (1997) 1539-42
84. **Peto R., Lopez A.D., Boreham J., Thun M., Heath C. Jr.:** „Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics.“ *Lancet.* 1992 May 23;339(8804):1268-78
85. **Putnam C.D., Arvai A.S., Bourne Y., Tainer J.A.:** „Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism.“ *J Mol Biol* 296(1) (2000 Feb 11) 295-309
86. **Rappa G., Lorico A., Flavell R.A., Sartorelli A.C.:** „Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res* 57 (1997) 5232-7
87. **Renes J., de Vries E.G., Nienhuis E.F., Jansen P.L., Muller M.:** „ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP-1.“ *Br J Pharmacol* 126 (1999) 681-8
88. **Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielinski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L., Drumm M.L., Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L.C.:** „Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.“ *Science* 245 (1989) 1066-1073
89. **Rose R.C., Bode A.M.:** „Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate.“ *Faseb J.* 7 (1993) 1135-1142
90. **Rosenberg M.F., Callaghan R., Ford R.C., Higgins C.F.:** „Structure of the Multidrug Resistance P-glycoprotein to 2,5 nm Resolution Determined by Electron Microscopy and Image Analysis.“ *J Biological Chemistry* 272(16) (1997) 10685-10694

91. **Runge D., Köhler C., Kostrubsky V. E., Jäger D., Lehmann T., Runge D.M., May U., Stolz D.B., Strom S.C., Fleig W.E., Michalopoulos G.K.:** „Induction of Cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, 2C19, Multidrug Resistance (MDR-1) and Multidrug Resistance Associated Protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes.“ *Biochem. and Biophysical Research Communications* 273 (2000) 333-341
92. **Runge D.M., Runge D., Dorko K., Pisarov L.A., Leckel K., Kostrubsky V.E., Thomas D., Strom S.C., Michalopoulos G.K.:** „Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes.“ *Journal of Hepatology* 30(2) (1999) 265-274
93. **Runge D.M., Stock T.W., Lehmann T., Taege C., Bernauer U., Stolz D.B., Hofmann, Foth, H.:** „Expression of Cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture“ *Toxicology*, (Mai 2001)
94. **Sachs C.W., Safa A.R., Harrison S.D., Fine R.L.:** „Partial inhibition of multidrug resistance by safingol is independent of modulation of p-glycoprotein substrate activities and correlated with inhibition of protein kinase C.“ *Journal of Biological Chemistry* Vol.270, No. 44 (1995) pp. 26639-26648
95. **Savaraj N., Chun Jing Wu M.D., Xu Rong, Lampidis T. Ph.D., Lai S. Ph.D., Donelly E.P.A., Solomon J. R.N., M.Ed., Feun L.G., M.D.:** „Multidrug-resistant gene expression in small-cell lung cancer.“ *Am J Clin Oncol (CCT)* 20(4) (1997) 398-403
96. **Scagliotti G.V., Michelotto F., Kalikatzaros G., Leonardo E., Cappia S., Gubetta L., Borasio P., Pozzi E.:** „Detection of multidrug resistance associated p-170 glycoprotein in previously untreated non small cell lung cancer.“ *Anticancer Res* 11(6) (1991) 2207-10
97. **Schadendorf D., Makki A., Stahr C., van Dyck A., Wanner R., Scheffer G.L., Flens M.J., Scheper R., Henz B.M.:** „Membran transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma.“ *AM J Pathol* 147(6) (1995) 1545-1552
98. **Scheffer G.L., Wijngaard P.L.J., Flens M.J., Izquierdo M.A., Slovak M.L., Pinedo H.M., Meijer C.J., Clever H.C., Scheper R.J.:** „The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein.“ *Nature Med* 1(6) (1995) 578-582
99. **Schmidt K.N., Amstad P., Cerutti P., Baeuerle P.A.:** „The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B.“ *Chem Biol* 2(1) (1995) 13-22
100. **Schrenk D., Gant T.W., Preisegger K.H., Silverman J.A., Marino P.A., Thorgeirsson S.S.:** „Induction of multidrug resistance gene expression during cholestasis in rats and nonhuman primates.“ *Hepatology* 17 (1993) 854-860
101. **Shiba D., Shimamoto N.:** „Attention of endogenous oxidative stress-induced cell death by cytochrome P450 inhibitors in primary cultures of rat hepatocytes.“ *Free Radic Biol Med* 27(9-10) (1999 Nov.) 1019-26
102. **Simonato L., Agudo A., Ahrens W., Benhamou E., Benhamou S., Bofetta P., Brennan P., Darby S.C., Forastiere F., Fortes C., Gaborieau V., Gerken M., Gonzales C.A., Jöckel K.H., Kreuzer M., Merletti F., Nyberg F., Pershagen G., Pohlabein H., Rösch F., Whitley E., Wicjmann H.E., Zambon P.:** „Lung cancer and cigarette smoking in europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity.“ *Int. J. Cancer* 91 (2001) 876-887
103. **Simpson J.A., Yver D.R., Hissin, P.J., Wardzala L.J., Karnieli E., Salens L.B., Cushman S.W. :** „Insulin-stimulated translocation of glucose transporters in the isolated rat adipose cells: characterization of subcellular fractions.“ *Biochim. Biophys. Acta* 763 (1983) 393-407
104. **Smith, J.D., Freeman, G., Vogt, M., Dulbecco, R.:** „The nucleic acid of polyoma virus.“ *J. Biol. Chem.* 264 (1960) 12053-12062.
105. **Southern E.M.:** „Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.“ *J.Mol.Biol.* 98 (1975) 503-517



106. **Spencer J.P.E., Jenner A., Chimel K., Aruoma OI., Cross C.E., Wu R., Halliwell B.:** „DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals.“ *FEBS Lett* 375 (1995) 179-82
107. **Starke P.E., Farber J.L.:** „Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes.“ *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 86-92.
108. **Steeg P.S., Alley M.C., Grever M.R.:** „An added dimension: will three-dimensional cultures improve our understanding of drug resistance?“ *J. Nat. Cancer Inst.* 86 (1994) 953-955
109. **Stein U., Jurchott K., Walther W., Bergmann S., Schlag P.M., Royer H.D.:** „Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters.“ *J Biol Chem* 2001
110. **Stein U., Walther W., Laurencot C.M., Scheffer G.L., Scheper R.J., Shoemaker R.H.:** „Tumor necrosis factor-alpha and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP.“ *J.Natl. Cancer Inst.* 11 (1997) 807-813
111. **Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, Itoyama S.:** „Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP.“ *Cancer Lett.* 112(1) (1997) 23-31.
112. **Sullivan G.F., Yang J.M., Vassil A., Yang J., Bash-Babula J., Hait W.N.:** „Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells.“ *J Clin Invest* 105(9) (2000) 1261-7
113. **Trowsdale J., Hanson I., Mockridge I., Beck S., Townsend A., Kelly A.:** „Sequence encoded in the class II region of the MHC related to „ABC“ superfamily of transporters.“ *Nature* 348 (1990) 741-743
114. **Twentyman P.R., Rhodes T., Rayner S.:** „A comparison of Rhodamin 123 accumulation and efflux in cells with P-glycoprotein-mediated and MRP-associated multidrug resistance phenotypes.“ *Eur. J. Cancer* 30A, No. 9 (1994) 1360-1369
115. **van Klaveren R.J., Hoet P.H., Pype J.L., Demedts M., Nemery B.:** „Increase in gamma-glytamytransferase by glutathione depletion in rat type II pneumocytes“ *Free Radic Biol Med* 22(3) (1997) 465-71
116. **Wang Q., Beck W.T.:** „Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53.“ *Cancer Res* 58(24) (1998) 5762-9
117. **Wiebel F.J., Kiefer F., Krupski G., Schuller H.M.:** „Expression of glutathione S-transferase and phenol sulfotransferase, but not of UDP-glucuronosyltransferase, in the human lung tumor cell lines NCI-H322 and NCI-H358.“ *Biochem Pharmacol* 35 (8) (1986 Apr 15) 1337-43
118. **Witschi H.P., Kacew S., Hirai K.I., Cote M.G.:** „In vivo oxidation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate by paraquat and diquat in rat lung.“ *Chem. Biol. Interact.* 19 (1977) 143-160
119. **Zhu Q., Center M.S.:** „Evidence that SP1 modulates transcriptional activity of the multidrug resistance-associated protein gene.“ *DNA Cell Biol* 15(2) (1996) 105-11
120. **Ziemann C., Bürkle A., Kahl G.F., Hirsch-Ernst K.I.:** Reactive oxygen species participate in *mdr1b* mRNA and p-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures.“ *Carcinogenesis* 20 (3) (1999) 407-414

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	„ATP-binding-cassette“
AOE	antioxidatives Enzym
ARE	“antioxidant responsive element“
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATZ	3-Amino-1,2,4-triazol
BECG	<u>B</u> ronchial <u>E</u> pithelial <u>C</u> ell <u>G</u> rowth Medium
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	Buthionin Sulfoximin
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDF	Carboxy-2,7-dichlorofluorescein
cDNA	komplementäre DNA
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter
CPM	„counts per minute“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle's medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
IP-Puffer	Immunpräzipitationspuffer
i.v.	intravenös
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
LRP	Lung Resistance-related Protein
MDR	„multidrug resistance“
MK-571	(3-[3-[2-(7-chloro-2-chinolinyl) ethenyl]-phenyl] 3-(dimethylamino-3-oxopropyl) thio-methyl-thio-propionsäure)
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRP	„multidrug resistance-associated protein“
MW	Mittelwert

---

NHBEC	normale humane Bronchialepithelzellen
NSCLC	Nichtkleinzellige Lungentumor
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
Pat.	Patient
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
P-gp	P-Glykoprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PQ	Paraquat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rho-123	Rhodamin 123
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SCLC	kleinzellige Lungentumor
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Natrium-Citrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-EDTA-Saccharose-Puffer N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethan-sulfonsäure
TM	transmembranäres Segment
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
u.a.	unter anderem
U	Unit
u/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
Vera	Verapamil
v.i.	vorinkubiert
Vit.C	Ascorbinsäure
v/v	Volumenprozent ml / 100ml
w/v	Gewichtszent mg / 100ml
z.B.	zum Beispiel

## 8. Thesen

- In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Expression der Multidrug-Resistance Proteine in humanen Lungentumorzelllinien und Kulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen untersucht.
- Die Expression von MDR-1, MRP-1 und LRP lässt sich in diesen Zellen mittels Northern Blot, RT-PCR, Western Blot nachweisen. Die Transportaktivität lässt sich für MDR-1 durch Rhodamin 123 und für MRP-1 durch Carboxy-2,7-dichlorofluorescein bestimmen.
- Humane Lungentumorzellen (H322 und H358) exprimieren stark MRP-1 und LRP Proteine und nur gering MDR-1 Protein.
- Die Erhöhung intrazellulärer Sauerstoffradikale führt zu einer Steigerung des membranständigen MRP-1 und MDR-1 Proteins, nicht aber von LRP. Antioxidative Behandlung der Lungentumorzellen zeigte eine Suppression von MRP-1 und MDR-1.
- Die MDR-1 Expression variiert stark zwischen verschiedenen Kulturen normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBE). Der Gehalt an MRP-1- und LRP-Protein ist relativ stabil.
- Die MDR-1- und LRP- Synthese in den NHBE ist abhängig von dem intrazellulären Gehalt reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die NHBE sind viel sensibler gegenüber der Einwirkung von ROS.
- Das MDR-1 Protein ist funktionell aktiv und lässt sich durch Verapamil hemmen.
- Auch das MRP-1 Protein vermittelt einen aktiven Transport, welches sich durch MK-571 hemmen lässt. MRP-1 scheint durch die starke Überexpression für die Ausschleusung von Xenobiotika aus der Zelle die grössere Bedeutung zu haben.
- Durch externe Faktoren (Zytostatika, Rauchen, Strahlentherapie) können in Lungenzellen durch ROS die MDR-assozierten Proteine (MDR-1, MRP-1 und LRP) induziert werden und zur Entstehung von Resistenzen beitragen. Aus diesem Grund können diese Proteine therapeutische Bedeutung in der Behandlung von Lungentumoren erlangen.

## 9. Lebenslauf

10.04. 1973 Geboren in Köthen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Bildung

seit July 2001 Research Associate  
(Department of Pathology, University of Pittsburgh,  
Medical School (USA))

Okt. 1993 – Juni 2001 Medizinstudium an der MARTIN-LUTHER-  
UNIVERSITÄT , Halle

August 1995 Ärztliche Vorprüfung  
März 1997 1. Staatsexamen  
August 1998 2. Staatsexamen  
Mai 2001 3. Staatsexamen

seit September 1997 Doktorand bei Professor Dr. Heidi  
Foth am Institut für  
Umwelttoxikologie in Halle  
Untersuchung zum Thema:  
„Expression von P-Glykoprotein (MDR-1), MRP1- und  
LRP in humanen AII- und Clara-Zell-ähnlichen Tumorzell-  
linien sowie normalen humanen Bronchialepithelzellen.“

Aug. 1992 – Okt. 1993 Zivildienst in einem Altenpflegeheim in Köthen  
Sept. 1989 – Juni 1991 Gymnasium an der Goethe Oberschule Köthen  
Sept. 1979 – Juni 1989 Grundschule an der Polytechnischen Oberschule Köthen

### Praktische Ausbildung

April 2000 – März 2001 Praktisches Jahr , Teilgebiet Anästhesie im Bergmannstrost  
Halle. Teilgebiet Innere Medizin an der Universitätsklinik  
Halle. Teilgebiet Chirurgie im Bergmannstrost Halle.

Sept. 1997 – März 2000 Doktorarbeit am Institut für Umwelttoxikologie in Halle

Aug. 1997 – Sept. 1997 Famulatur am Institut für Umwelttoxikologie in Halle

Aug. 1995 – Sept. 1995 Famulatur Teilgebiet Chirurgie im Scarborough Hospital,  
England

Feb. 1995 – März 1995 Famulatur Teilgebiet Kardiologie und Endokrinologie an  
der Universitätsklinik Halle.

## 10 Selbständigkeitserklärung, Publikationen

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich, Christoph Köhler, die vorliegende Dissertation selbst verfasst habe. Ich habe mich dabei keiner als der ausführlich bezeichneten Quellen bedient.

### Publikationen

#### Artikel:

- I **Runge D., Köhler C., Kostrubsky V.E., Jäger D., Lehmann T., Runge D.M., May U., Stolz D.B., Strom S.C., Fleig W.E., Michalopoulos G.K.:** „Induction of Cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but Not of CYP2C9, CYP2C19, Multidrug Resistance (MDR-1) and Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP-1) by Prototypical Inducers in Human Hepatocytes“ Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 273, No.1, pp. 333-341, June 2000; ISSN 0006-291X
  
- II **Lehmann T, Köhler C, Weidauer E, Taege C, Foth H. :** „Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture.“ Toxicology 2001 Oct 5;167(1):59-72

#### Vorträge:

- I **Vortrag zur 41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 2000**  
„Oxidative stress alters expression of P-glycoprotein and Multidrug Resistance-associated Protein, but not antioxidant enzymes in lung tumor cell lines.“ Ch. Köhler, E. Weidauer, D.M. Runge, E.Röhrdanz, Q.H. Tran Thi, R.Kahl, H.Foth, Mainz 2000, Naunyn-Schmiedeberg „Archives of Pharmacology“ Supplement to Volume 361 (4), 2000 , R163

#### Poster:

- I **Köhler C., Lehmann T., Runge D.M., Foth H., Fleig W.E., Strom S.C. Michalopoulos G.K., Runge D.:** „Regulation of P-glycoprotein and MRP (multidrug resistance-associated protein) by cytochrome P450 inducers in serum-free cultures of human hepatocytes“ Falk Workshop: 27.-28. Januar 2000, Köln
  
- II **Köhler C., Lehmann T., Runge D.M., Foth H., Fleig W.E., Strom S.C., Michalopoulos G.K., Runge D.:** „P-Glykoprotein und MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) Expression in serumfreien Langzeitkulturen humaner Hepatocyten“ GASL,2000, Köln; Z Gastroenterologie 38: 104
  
- III **Runge D., Runge D.M., Köhler C., Lehmann T., Jäger D., May U., Foth H., Dorko K., Strom S.C., Michalopoulos G.K., Fleig W.E.:** „Expression of membrane transporter and cytochrome P450 Proteins in serum-free long-term

human hepatocyte cultures.“ FASEB J 4, Vol 14, A183: „Experimental Biology 2000“ in San Diego

- IV Köhler C., Lehmann T., Kostrubsky V.E., Stolz D.B., Strom S.C., Michalopoulos G.K., Runge D.M., Runge D.:** „Different induction pattern of cytochrome P450 and multidrug resistance proteins expression in serum-free human hepatocyte cultures.“ Toxicology Letters 116 (Suppl.1), 104 (382), EUROTOX 2000, London, England
- V Lehmann T., Köhler C., Runge D.M., Foth H.:** „Expression of multidrug resistance proteins and CYP2E1 in serum-free cultured human bronchial epithelial cells.“ EUROTOX 2000- Imperial College, London, England
- VI Lehmann T., Köhler C., Weidauer E., Foth H.:** „Expression of Multidrug-Resistance associated protein (MRP) in normal human lung“ Mainz, 2001, Naunyn-Schmiedebergs „Archives of Pharmacology“ , Supplement to Volume 361, Number 4, 2001 (Springer Verlag)
- VII Lehmann T., Köhler C., Stehfest E., Stock T., Foth H.:** „Expression of MRP-1 in human lung cells and effects of promoters of oxygen radicals.“ EUROTOX 2001, Istanbul, Türkei, Toxicology Letters 2001, 123 Suppl. 1:1-154
- VIII Köhler C., Walldorf J., Padiaditakis P., Bell A.W., Bowen W.C., Monga S.P.S., Strom S.C., Michalopoulos G.K.:** „Expression of Jagged1 and its receptor Notch in human and rat hepatocytes.“ FALK Workshop 2002, Leipzig
- IX Köhler C., Waldorf J., Padiaditakis P., Bell A.W., Bowen W.C., Monga S.P.S., Strom S.C., Michalopoulos G.K.:** „Expression von Jagged1 und dem Rezeptor Notch1 in humanen und Ratten-Hepatozyten.“ GASL 2002, Leipzig, Z Gastroenterologie

## **Erklärung über Promotionsversuche**

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

Christoph Köhler



## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas danke ich herzlich Frau Professor Dr. H. Foth, die mich durch diese Arbeit zum wissenschaftlichen Arbeiten begeistert hat.

Sie war stets bereit, mit Anregung und Kritik diese Arbeit zu begleiten und zu fördern.

Den Mitarbeitern der Gruppe von Frau Professor Dr. H. Foth gilt meinen Dank für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente.

Insbesondere danke ich Frau Sigrid Helle für ihre stete Hilfsbereitschaft, Frau Dr. Wolf für die vielen technischen Tips, Frau Regner für viele nette Worte, meinen Doktorandenkollegen und allen MTA's.

Herrn Prof. Dr. Pankow und Frau Dr. Müller danke ich für die kritische Begutachtung der Dissertation und für die vielen hilfreichen Anregungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Dieter Runge und Frau Dr. Dorothee M. Runge für das kritische Korrekturlesen des Manuskriptes, ihre stets aufmunternde Art und die fachliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen.

Meinen Dank gilt ebenfalls Herrn Michael Weigel, für die Durchsicht des Manuskriptes und den regen Gedankenaustausch zum Abfassen von Dissertationen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in den letzten Jahren in allen Belangen voll unterstützten und mir somit ein lohnendes und erfolgreiches Studium ermöglichten.

Nicht vergessen möchte ich meine Frau Susanne Köhler, die mich mit der richtigen Mischung aus Geduld und Liebe unterstützt hat.