

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

1.1. Zielsetzung

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

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

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

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

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

1.2. Grundlagen der Genese und Therapie von Lungenkrebs

1.2.1. Anatomie und *Clearance* Mechanismen der Lunge

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

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

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

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

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

1.2.2. Lungenkrebs

1.2.2.1. Statistische Daten zu malignen Lungentumoren

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

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

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

1.2.2.2. Risikofaktoren

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

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

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

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

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

1.2.2.3. Klassifikation und Behandlungsmethoden

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

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

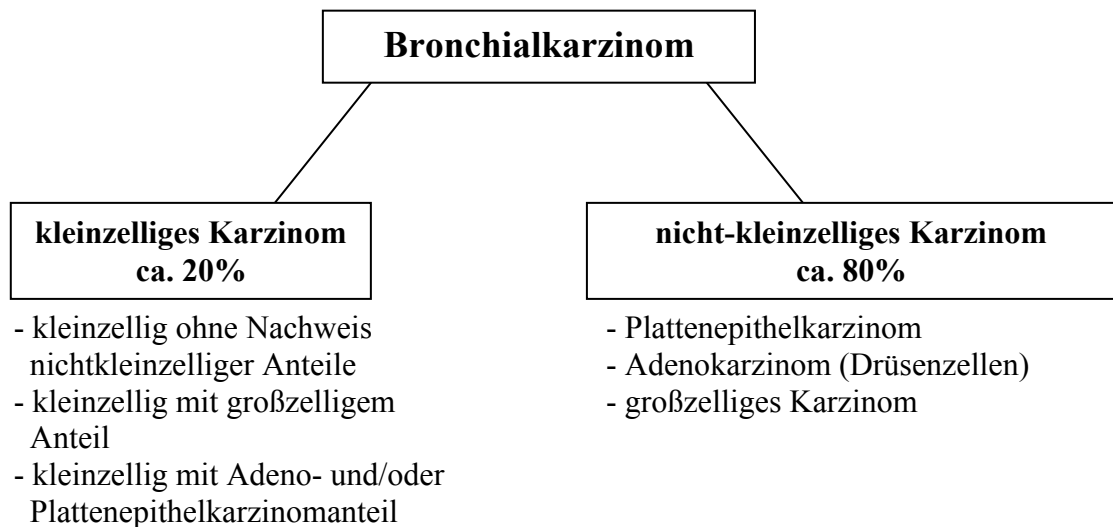


Abbildung 1: morphologische Klassifikation des Bronchialkarzinoms

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

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

1.3.1. Charakterisierung und Struktur der ABC-Transporter

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

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



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

1.3.2. Klassifizierung der MRP

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

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

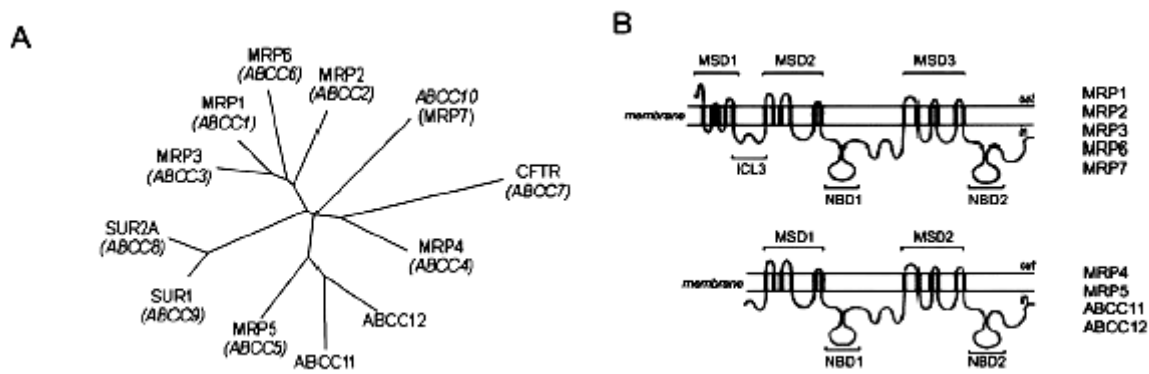


Abbildung 3: A) Sequenzhomologien der ABCC-Familie untereinander; B) strukturelle Unterschiede der verschiedenen MRP- Isoformen [Haimeur et al 2005]

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

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

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

1.3.3. Substratspektren und Verteilung verschiedener MRP-Isoformen

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

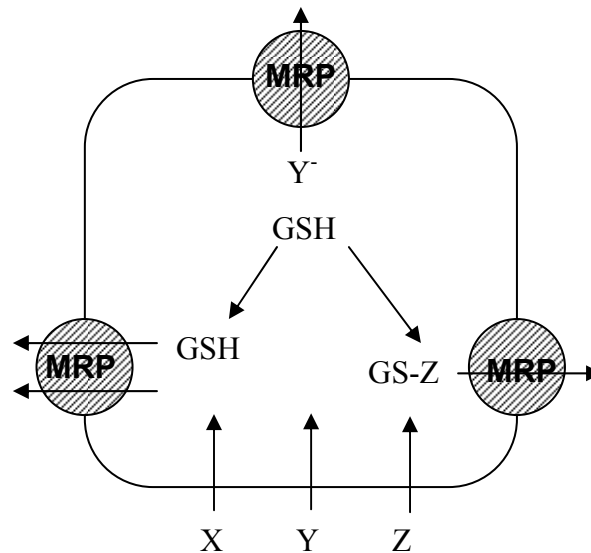


Abbildung 4: Transportmöglichkeiten für MRP-Substrate mit Hilfe von Glutathion (modifiziert nach Borst et al., 2000)

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

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

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

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

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

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

1.4. Prostaglandine

1.4.1. Prostaglandine und ihre Biosynthese

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

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

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

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

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

Aus Prostaglandin H₂ werden durch Isomerisierung Prostaglandin D₂, Prostaglandin E₂, Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) und Thromboxan A₂ gebildet. Die hierfür verantwortlichen Isomerasen sind: PGH₂-PGD₂-Isomerase, PGH₂-PGE₂-Isomerase, Thromboxansynthase, Prostacyclinsynthase. Aus Prostaglandin D₂ und E₂ wird mittels Reduktasen Prostaglandin F₂ α synthetisiert. Während die COX-Enzyme in fast allen Geweben vorkommen, sind die Prostaglandin- und Thromboxansynthasen gewebspezifisch. Die Thromboxansynthase befindet sich in Blutplättchen und Makrophagen. Die Prostaglandin I-Synthase ist in Endothelzellen exprimiert. Die PGF-Synthase befindet sich hauptsächlich im Uterus, während die PGD-Synthasen im Gehirn und in Mastzelle zu finden sind. Die Prostaglandin E-Synthese findet in Mikrosomen fast aller Gewebe statt [Funk et al., 2001]. Daraus folgt, dass vor allem Prostaglandin I, Thromboxan und die Prostaglandine der E-Serie für die Lunge eine Rolle spielen.

1.4.2. Wirkung von Prostaglandinen

Prostaglandine erfüllen in verschiedenen Organen eine Vielzahl an physiologischen Funktionen, so dass der therapeutische Einsatz mit Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Auslösen von Fieber verbunden ist [Forth et al., 1996]. Ein Beispiel für medizinische Anwendung liegt im Auslösen von Wehentätigkeit durch Prostaglandin F₂ α . Die verschiedenen Wirkungen der Prostaglandine soll kurz an den unterschiedlichen Angriffspunkten des Organismus erläutert werden.

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

In Thrombozyten haben Prostaglandin E₁, I₂ und D₂ eine hemmende Wirkung auf die Blutplättchenaggregation durch Formveränderung, Adhäsion und Degranulierung. Prostaglandin E₂ wirkt in physiologischen Konzentrationen aktivierend auf die Thrombozytenaggregation, in hohen Dosen jedoch hemmend. Prostaglandin F₂ α zeigt keinen Effekt. Der entscheidende Faktor zur Stimulierung der Blutplättchenaggregation ist Thromboxan A₂ [Forth et al., 1996].

1. Zielsetzung und theoretische Hintergründe

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

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

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

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

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

IP (Prostaglandin I₂) und DP (Prostaglandin D₂)

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

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

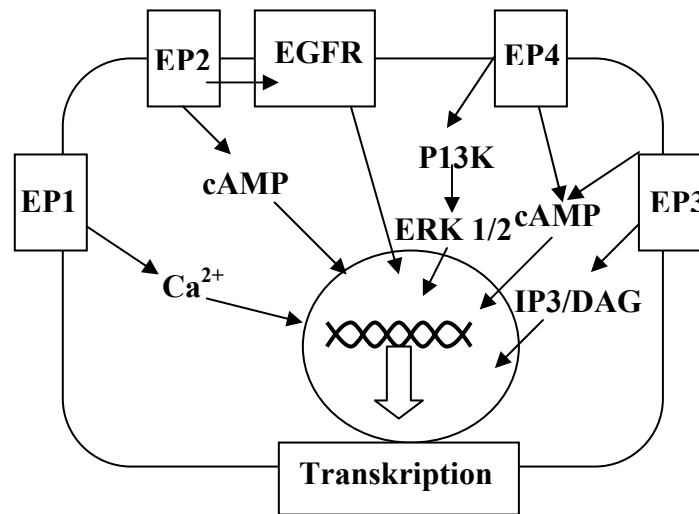


Abbildung 5: bisher bekannte Wege für die Vermittlung von Prostaglandin E2-Signalen

Während man bei Prostaglandin F₂ α eine nahezu einheitliche kontraktile Wirkung beschrieben hat, sind gerade bei Prostaglandin E₂ eine Vielzahl von Wirkungen bekannt. Wie kann jedoch ein einziges Molekül so viele unterschiedliche Funktionen ausüben? Während Prostaglandin F₂ α Reaktionen über einen Rezeptor, den sogenannten FP- Rezeptor, vermittelt, sind für die Vermittlung der E₂- abhängigen Signalkaskaden 4 verschiedene Rezeptoren verantwortlich (EP1-EP4) [Funk et al., 2001]. Bei EP3 sind noch 8 weitere Isoformen bekannt. [Bilson et al 2004]. Für EP2 und EP4 ist bekannt, dass die Signalvermittlung über Gs-Typ G-Proteine, das heißt Adenylatzyklase aktivierend, verlaufen. EP3 vermittelte Signalkaskaden können durch unterschiedliche G-Proteine aktiviert werden Für EP1 ist das G-Protein noch nicht identifiziert worden. [Narumiya S et al., 1999, Hata et al., 2004]. Die Signalvermittlung (Abb. 5) erfolgt über cAMP, Kalzium, Inositol-3-Phosphat oder auch EGFR-Transaktivierung [Hata et al., 2004]. Die Rezeptorausstattung auf der Oberfläche der Membran entscheidet über die Reaktion der Zelle auf die Prostaglandin E₂-vermittelte Reaktion.

1.5. EGF und EGFR: Aufbau, Funktion und Signalkaskade

1.5.1. EGF Aufbau und Funktion

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

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

1.5.2. Die Familie der EGF-Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege

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

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

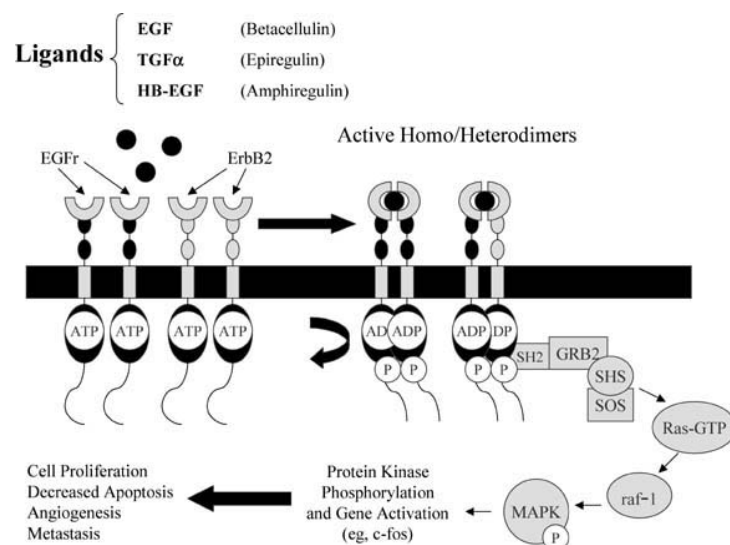


Abbildung 7: Funktionsweise des EGF-Rezeptors und dessen Signalkaskade [Franklin et al., 2002]

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

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