

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Gewinnung und Kultivierung von primären Lungenzellkulturen

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

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

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

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

3. Methoden

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

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

Kultivierung der Lungentumorzelllinie A549

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

3.2. Vitalitätstest: MTT- Assay

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

3. Methoden

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

3.3. Apoptose-Messung

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

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

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

3. Methoden

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

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

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

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

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

3. Methoden

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

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

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

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

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

3.5. Proteinisolation und Western Blot

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

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

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

3. Methoden

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

3. Methoden

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

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

3.6. Immunzytochemischer Nachweis von Prostaglandin E2-Rezeptoren in Lungenzellkulturen

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

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

3. Methoden

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

3.7. Transport-Aktivität von MRP1

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

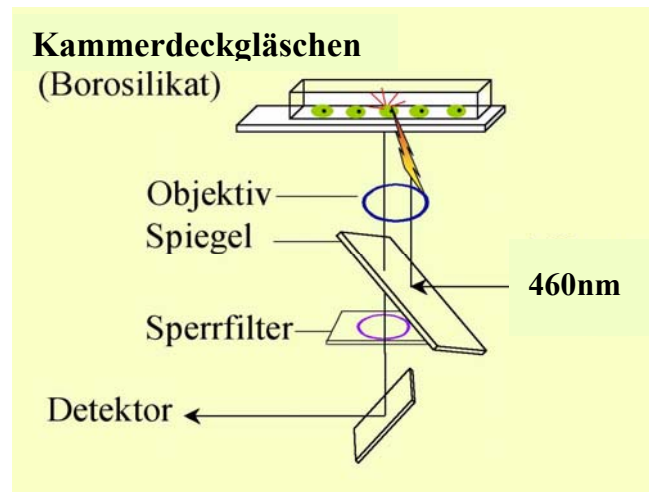


Abb. 8: Versuchsaufbau zur Messung der Einzelzellfluoreszenz

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

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

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

3.8. Immunzytochemische Charakterisierung von Primärkulturen der Lunge

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

3.9. Statistische Auswerteverfahren

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