

5. Diskussion

5.1. Belastung der Lunge durch umweltbedingte Schadstoffe

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

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

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

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

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

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

5.2. Chemotherapieresistenzen bei Lungentumoren

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

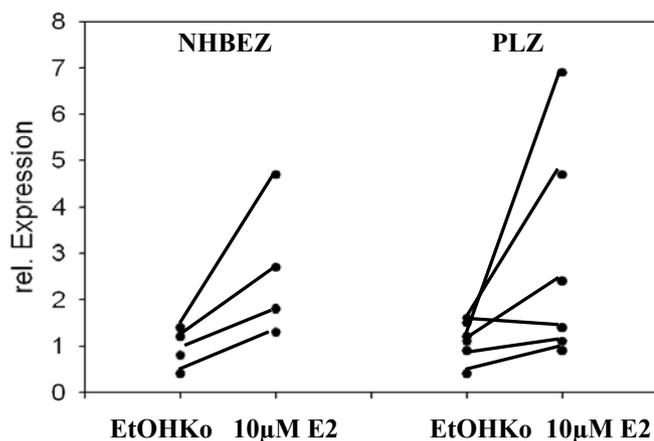


Abbildung 38: Dotblotanalyse der Einzelversuche zur MRP3-Expression nach Exposition gegenüber Prostaglandin E2 im Vergleich zur Ethanolkontrolle

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

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

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

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

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

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

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

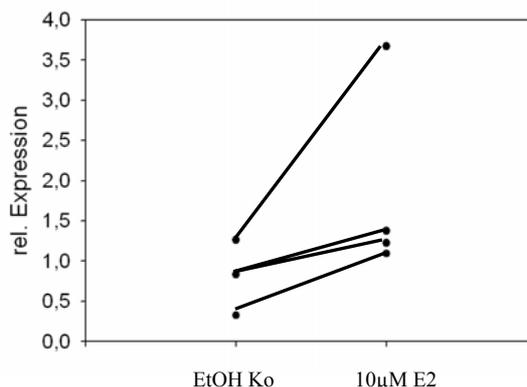


Abbildung 39: Dotblotanalyse der Einzelversuche zur MRP5-Expression in NHBEZ nach Exposition gegenüber Prostaglandin E2 im Vergleich zur Ethanolkontrolle

Die peripheren Lungenzellen und die Tumorzelle zeigten keine Reaktion. Ein Effekt von Prostaglandin F_{2α} war nicht nachzuweisen. Über die Induzierbarkeit von MRP5 ist bisher nur wenig bekannt. Donner et al. (2004) zeigten in der Rattenleber die Erhöhung der mRNA-Expression von MRP5 durch Lipopolysaccharide. Aufgrund der Erhöhung der cGMP-Produktion durch LPS vermuteten sie die Beteiligung von MRP5 an der cGMP-Homöostase als *Overflow*-Pumpe. Im Gegensatz zu MRP4 zeigt MRP5 in dermalen Fibroblasten keinen Effekt auf das proinflammatorische Zytokin Onkostatin M ebenso wie auf die Behandlung mit Interleukin 6 [Dreuw et al., 2004]. Der Kontakt mit HIV als infektiösem Erreger zeigt eine Erhöhung der Expression von MRP5 in Makrophagen. Diese Erhöhung wurde in einem unterschiedlichen Zeitfenster beobachtet im Vergleich zu MRP4, was möglicherweise auf einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus hinweist. Da die MRP4 Transkription sich gleichermaßen mit der TNF- α Produktion nach HIV-Infektion überschneidet, ist die Beteiligung proinflammatorischer Zytokine möglicherweise für die Hochregulation von MRP4 verantwortlich. Diese Korrelation war für MRP1 und 5 nicht zu beobachten. [Jurajuria et al., 2004]. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse und der wissenschaftlichen Literatur [Donner et al., 2004] ist eine Beteiligung inflammatorischer Reaktionen auf die Regulation von MRP5 nicht auszuschließen.

5.4. Prostaglandin E2 und Cadmiumtoxizität

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

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

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

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

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

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

5.5. Grundexpression der Prostaglandin E2 Rezeptoren in den humanen Lungenzellkulturen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.6. Vorteile im Umgang mit Primärkulturen zur permanenten Zellkultur

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

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

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

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