Aus der Abteilung Allgemeine Hygiene und Umweltmedizin (Prof. Dr. med. H. Dunkelberg) im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umwelt- und Rechtsmedizin und Dermatologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchungen zu Mechanismen

der Arsen-Resistenz in kultivierten V79-Zellen und daraus selektierten Klonen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Claudia Bässler aus Niebüll

> Göttingen 2012

Dekan:

Prof. Dr. rer.nat. H.K. Kroemer

I.	Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Gebel
II.	Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dressel
III.	Berichterstatter:	PrivDoz. Dr. rer. nat. Westphal
Tag der mi	indlichen Prüfung:	05.08.2013

	Inhalt	sverzeichnis	
	Abkür	zungsverzeichnis	_ 7
	Tabell	enverzeichnis	_ 10
	Abbild	lungsverzeichnis	_ 11
1	Einl	eitung	_ 15
	1.1	Der Metabolismus von Arsen	_ 18
	1.2	Chronisch toxische Wirkungen von Arsen und mögliche zugrunde liegende	
		Wirkprinzipien	_ 23
	1.3	Resistenzmechanismen gegen Arsen	_ 29
	1.4	Membranständige Transporter der ATP-binding-cassette-Proteinfamilie als	
		Determinanten einer Arsen-Resistenz	_ 33
	1.5	Aufgabenstellung	_ 42
2	Mat	erial	_ 43
	2.1	Vorbehandlung und Sterilisation	_ 43
	2.2	Chemikalien und Enzyme	_ 43
	2.3	Verbrauchsmaterialien	_ 45
	2.4	Geräte	_ 46
	2.5	Gase	_ 48
	2.6	Zell-Linien	_ 48
	2.7	Kits	_ 48
	2.8	Bakterien	_ 49
	2.9	Vektoren	_ 49
	2.10	Molekulargewichtstandards	_ 49
3	Met	hoden	_ 50
	3.1	Zellkultur	_ 50
	3.1.1	Puffer und Lösungen	_ 50
	3.1.2	2 Stammhaltung und Kultur von V79-Zellen	_ 52
	3.1.3	Klonierung von Arsen-resistenten V79-Zellen	_ 52
	3.1.4	Kultivierung von DMA ^V -resistenten V79-Zellen	_ 54
	3.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten V79-Zellen und daraus selektierten	
		Klonen	_ 54
	3.2.1	Puffer und Lösungen	_ 54
	3.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen durch Phenol/Chloroform-Extraktion	_ 55
	3.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	_ 56
	3.3	Analytische Agarosegelelektrophorese von RNA	_ 56
	3.3.1	Puffer und Lösungen	_ 57

3.3	Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Analyse von RNA	59
3.4	Transfer von RNA auf Nylonmembranen	59
3.5	solierung genomischer DNA aus kultivierten V79-Zellen	60
3.5	Puffer und Lösungen	60
3.5	Isolierung von genomischer DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion	61
3.6	Analytische Agarosegelelektrophorese von DNA	62
3.6	Puffer und Lösungen	62
3.6	Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA	63
3.7	Amplifikation von Hamster Mrp1- und Mrp2- cDNA bzw. Gen Fragmente	en mittels
	Polymerase-Kettenreaktion	63
3.7	Puffer und Lösungen	64
3.7	PCR-Techniken	64
3.7	PCR-Primer-Auswahl für Mrp1 (Hamster)	66
3.7	PCR-Primer-Auswahl für Mrp2 (Hamster)	66
3.7	One-step RT-PCR	66
3.7	PCR auf genomischer DNA für Mrp1 und Mrp2 Gene	68
3.8	Nachweis und Aufreinigung von DNA- und cDNA-Produkten durch	
	Agarosegelelektrophorese	69
3.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	69
3.8	Low-Melting-Methode	69
3.8	DNA-Präzipitation	69
3.9	Klonierung der Mrp1-PCR-Produkte	70
3.9	Ligation von PCR-Produkten in den pCR®-XL-TOPO®-Vektor	70
3.9	Herstellung elektrokompetenter E.coli-Zellen	70
3.9	Transformation von E.coli durch Elektroporation	71
3.9	Mini-Präparation von Plasmid-DNA und Analyse der Produkte	72
3.9	Herstellung von Glycerinkryokulturen	73
3.10	equenzierung	73
3.1	Sequenzieren von Mrp1- und Mrp2-PCR-Produkten bzw. von klonierten	Mrp1-
cD	-Fragmenten	74
3.11	Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot	74
3.1	Puffer und Lösungen	74
3.1	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	75
3.1	Hybridisierungs-Oligonukleotid-Sonden für Mrp1	76
3.1	Hybridisierungs-Oligonukleotid-Sonden für Mrp2	77
3.1	Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot durch Hybridisierung mi	t ³² Phosphor-
ma	erten Sonden	77

	3.12	Durchführung des Neutralrot-Assays mit V79-Zellen	78
	3.12	.1 Puffer und Lösungen	80
	3.12	.2 Aufbereitung von V79-Zellkulturen für den Neutralrot-Assay	81
	3.13	Durchführung des Mikrokerntests mit V79-Zellen	81
	3.13	.1 Puffer und Lösungen	84
	3.13	.2 Herstellung von Mikrokernpräparaten aus V79-Zellenkulturen	85
4	Erg	ebnisse	87
	4.1	Untersuchung der Arsenit-Resistenz in V79-Zellen und daraus selektierten Klonen	
		mittels Neutralrot-Assay	88
	4.2	Untersuchung der Cisplatin-Resistenz in V79-Klonen mittels Neutralrot-Assay	91
	4.3	Untersuchung der Arsenit-Genotoxizität in V79-Klonen mittels Mikrokerntest	95
	4.4	Sequenzgegenüberstellung für MRP1/Mrp1-Teilsequenzen in Mensch (hu), Maus (m)
		und Ratte (r)	99
	4.5	Sequenzgegenüberstellung für MRP2/Mrp2-Teilsequenzen in Mensch (hu), Maus (m)
		und Ratte (r)	100
	4.6	Isolierung von Mrp1- und Mrp2-cDNA-Teilsequenzen des Hamsters	101
	4.7	Auswahl der Hybridisierungs-Oligonukleotid-Sonden aus kloniertem Mrp1-cDNA-	
		Fragment des Hamsters	102
	4.8	Auswahl der Hybridisierungs-Oligonukleotid-Sonden aus kloniertem Mrp2-cDNA-	
		Fragment des Hamsters	104
	4.9	Untersuchung der relativen Mrp1-mRNA-Expression in kultivierten V79-Zellen um	ıd
		daraus selektierten Klonen in Anwesenheit von Arsenit (As ^{III}) oder	
		Dimethylarsonsäure (DMA ^V)	106
	4.9.	Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev4-Sonde: V79-Zellen und na	ich
	As ^{III}	-Inkubation selektierte Klone mit 4-tägiger As ^{III} -Kultivierung vor der RNA-Isolierung _	107
	4.9.2	2 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev4-Sonde: V79-Zellen und na	ich
	As ^{III}	-Inkubation selektierte Klone ohne As ^{III} -Kultivierung bis zur RNA-Isolierung	110
	4.9.	3 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev5-Sonde: V79-Zellen und na	ıch
	As ^{III}	-Inkubation selektierte Klone ohne As ^{III} -Kultivierung bis zur RNA-Isolierung	112
	4.9.4	Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev5-Sonde: V79-Zellen (K) un	ıd
	sele	xtierte Klone nach 4-wöchiger DMA^{V} -Inkubation und anschließender 4-tägiger Kultivieru	ng
	ohne	e DMA ^V vor RNA-Isolierung	115
	4.9.	5 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev4-Sonde: V79-Zellen (K) un	ıd
	sele	ttierte Klone nach 4-wöchiger Kultur mit DMA^{V} und anschließender 24-stündiger	
	Kult	ivierung mit DMA ^v vor RNA-Isolierung	118

	4.9.6 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev5-Sonde: V79-Zellen (K)) und
	selektierte Klone nach 4-wöchiger Kultur mit DMA^{V} und anschließender 24-stündiger	
	Kultivierung mit DMA ^V vor RNA-Isolierung	_ 121
5	Ergebnisüberblick	_ 123
6	Diskussion	126
	6.1 Genotoxische Wirkungen von Arsenit in V79-Zellen	127
	5.2 Zytotoxische Wirkungen von Arsenit und Cisplatin (CPDD) in V79-Zellen	_ 127
	6.3 Arsen-Resistenz in V79-Zellen	_ 130
	6.3.1 Mechanistische Grundlagen der Arsen-Resistenz	130
	6.3.2 Die Rolle der MRP/Mrp-Transporter bei der Ausprägung einer Arsen-Resistenz	_ 131
	6.4 Ausblick	144
7	Zusammenfassung	145
8	Literaturverzeichnis	147

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding-cassette
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AIF	apoptosis-inducing-factor
APL	Akute Promyeloische Leukämie
AQP	Aquaglyceroporine
As ^{III}	Arsenit
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATRA	Tretionin
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	fibrosis transmembrane conductance regulator
cMOAT1	canicular multispecific organic anion transporter
CPDD	Cisplatin
d-	Desoxy-
dd-	Didesoxy
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DJS	Dubin-Johnson-Syndrom
DMA	Dimethylarsonsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease

dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ECL	enhanced chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxyfluorescin
FKS	Fötales Kälberserum
x g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
γ-GCS	Gamma-Glutamylcystein-Synthetase
GSH	Glutathion
GSSG	Gutathiondisulfid
GTC	Guanidiniumthiocyanat
hNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
I.E.	Internationale Einheit
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium
LSB	Lämmli sample buffer
Μ	Molarität
MD	Membrandomäne
MDR	Multidrug Resistenz
MEM	modified eagle medium
MIP	major intrinic protein
MMA	Monomethylarsonsäure
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRP	multidrug-resistance-associated protein
MS	Membransegment
MTX	Methotrexat
NBR	Nukleotidbindungsregion
NBT	Nitrotetrazoliumblau
nt	Nukleotide

NTK	Non-Rezeptor-Tyrosin Kinase
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	polyvinyl difluorid
RE	Restriktionsendonukleasen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate buffer (Standard Natrium Citrat Puffer)
SUR	Sulfonylharnstoff-Rezeptor
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TES	Tris-EDTA-Saccharose-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	World Health Organisation
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- beta-D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
Code der Nukleinsäuren:	
А	Adenin
C	Cytosin

С	Cytosin
G	Guanin
Т	Thymin
U	Uracil

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Homologien der MRP1/Mrp1-cDNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Spezies	_ 65
Tab. 2:	Homologien der MRP2/Mrp2-cDNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Spezies	65
Tab. 3:	Verwendete PCR-Primer für Mrp1-mRNA des Hamsters	66
Tab. 4:	Verwendete PCR-Primer für Mrp2-mRNA des Hamsters	66
Tab. 5:	Reaktionsansatz der one-step RT-PCR	67
Tab. 6:	Temperaturprogramm der one-step RT-PCR	68
Tab. 7:	PCR-Ansatz zur Amplifikation von genomischen DNA-Sequenzen	69
Tab. 8:	Verwendete cDNA-Sonden für Mrp1-mRNA des Hamsters	76
Tab. 9:	Verwendete cDNA-Sonden für Mrp2-mRNA des Hamsters	77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Arsenbelastete Gebiete weltweit	17
Abb. 2:	Hypothetisches Schema der Biotransformation von anorganischem Arsen	19
Abb. 3:	Vergleich der Zytotoxizitäts-Potenz der verschiedenen Arsenmetaboliten	25
Abb. 4:	Vergleich der Genotoxizitäts-Potenz der verschiedenen Arsenmetaboliten	28
Abb. 5:	Mechanismen der Arsen-Resistenzen in Prokaryoten (E.coli), Eukaryotischen	
	Hefezellen (S.cerevisiae) und Säugerzellen	32
Abb. 6:	Membrantopologie von ABC-Transportern	34
Abb. 7:	Schematische Darstellung der humanen ATP-binding-cassette (ABC)	
	Superfamilie	35
Abb. 8:	96-Multi-Well Platte zur Durchführung des In-vitro-Zytotoxizitätstestes	79
Abb. 9:	Möglichkeiten der Mikrokernentstehung	82
Abb. 10	: Lichtmikroskopische Fotographie einer Zelle mit typischen Mikorkern	83
Abb.11:	Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
	resistenten V79-Zellen (V79) und Arsenit vorbehandelten nicht klonierten	
	V79-Zellen (K)	88
Abb. 12	: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
	resistenten V79-Zellen (V79) und dem Arsenit-resistenten	
	V79-Klon K4 (K4)	88
Abb. 13	: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
	resistenten V79-Zellen (V79) und dem Arsenit-resistenten	
	V79-Klon K6 (K6)	89
Abb. 14	: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
	resistenten V79-Zellen (V79) und demArsenit-resistenten	
	V79-Klon K7 (K7)	89
Abb. 15	: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
	resistenten V79-Zellen (V79) und dem Arsenit-resistenten	
	V79-Klon K8 (K8)	90
Abb. 16	: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
	resistenten V79-Zellen (V79) und dem Arsenit-resistenten	
	V79-Klon K9 (K9)	90

Abb. 17: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu nicht klonierten mit Arsenit	
vorinkubierten V79-Zellen (K)	92
Abb. 18: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K4 (K4)	92
Abb. 19: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K6 (K6)	93
Abb. 20: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K7 (K7)	93
Abb. 21: Neutralrot-Aufnahme als nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K8 (K8)	94
Abb. 22: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-	
resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K9 (K9)	94
Abb. 23: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten	
unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu nicht klonierten V79-Zelle	en
mit einer 6-wöchigen 10 µM Arsenit-Vorbehandlung (K)	95
Abb. 24: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten	
unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K4 (K4)	95
Abb. 25: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten	
unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K6 (K6)	96
Abb. 26: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten	
unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K7 (K7)	97
Abb. 27: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten	
unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K8 (K8)	98

Abb. 28: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten	
unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten	
V79-Klon K9 (K9)	_ 98
Abb. 29: Sequenzgegenüberstellung für MRP1/Mrp1-Teilsequenzen in Mensch (hu),	
Maus (m) und Ratte (r)	_100
Abb. 30: Sequenzgegenüberstellung für MRP2/Mrp2-Teilsequenzen in Mensch (hu),	
Maus (m) und Ratte (r)	_101
Abb. 31: Vergleich der ermittelten Hamster-Mrp1-cDNA-Sequenz (ch) mit	
Sequenzgegen-überstellung für MRP1/Mrp1-Teilsequenzen in Mensch (hu),	
Maus (m), Ratte (r)	_103
Abb. 32: Vergleich der ermittelten Hamster-Mrp2-cDNA-Sequenzen (ch) mit	
Sequenzgegenüberstellung für MRP2/Mrp2-Teilsequenzen in Mensch (hu),	
Maus (m), Ratte (r)	_105
Abb. 33: Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach	
einer 4-tägigen Zellkultur mit As ^{III} (V79) im Vergleich zu V79-Zellen (K)	
und daraus selektierten Klonen (K4, K6, K7, K8, K9)	_108
Abb. 34:Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach	
einer 4-tägigen Zellkultur ohne Substanzkontakt (V79) im Vergleich zu den	
vorinkubierten V79-Zellen(K) und daraus selektierten Klonen	
(K4, K6, K7, K8, K9)	_ 111
Abb. 35:Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach	
einer 4-tägigen Zellkultur ohne Substanzkontakt (V79) im Vergleich zu den	
vorinkubierten V79-Zellen (K) und daraus selektierten Klonen	
(K4, K6, K7, K8, K9)	_ 113
Abb. 36: Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach	
einer 4-tägigen Zellkultur ohne Substanz (V79) im Vergleich zu V79-Zellen	
nach 4-wöchiger DMA ^V -Inkubation (K, K4, K6, K7, K8, K9) vor	
RNA-Isolierung	_115
Abb. 37:Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach	
einer 24h-Inkubation mit DMA ^V (V79) im Vergleich zu V79-Zellen	
(K, K4, K6, K7, K8, K9) nach 4-wöchiger DMA ^V -Inkubation und 24h DMA ^V	
Inkubation vor RNA-Isolierung	_118

Abb. 38:Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach einer 24h- Inkubation mit DMA^V (V79) im Vergleich zu V79-Zellen (K, K4, K6, K7, K8, K9) nach 4-wöchiger DMA^V-Inkubation und 24h Inkubation vor RNA-Isolierung______122

1 Einleitung

Arsen ist eines der in der Umwelt häufig vorkommenden toxischen Halbmetalle und ist von hoher globaler Bedeutung in der Umwelttoxikologie. Das Hauptproblem heute stellt die chronische Arsen-Exposition durch kontaminiertes Trinkwasser dar (Lerda 1994, Hopenhayn-Rich et al. 1996, Dulout et al. 1996, Nordstrom 2002, Ratnaike 2003).

Über die Jahrhunderte hinweg fand Arsen in sehr verschiedenen Bereichen Anwendung. Nachdem griechische Ärzte wie Hippokrates und Galen seine Wirkung entdeckten, war es ein bewährtes Zusatzmittel in Kosmetik und Heilmitteln.

In der Zeit von 1922 bis 1970 wurde Arsen in Afrika zur Therapie der tropischen Schlafkrankheit eingesetzt. Das in den 1950er Jahren entwickelte Melarsoprol war über mehrere Jahrzehnte das Mittel der ersten Wahl zur Behandlung der Schlafkrankheit und wird heute noch eingesetzt (Lüllmann 1999, Kennedy 2012).

Ein schon im 18. Jahrhundert weit verbreitetes Präparat aus einer Mischung aus Kaliumarsenit war die "Fowler'sche Lösung", die bis in die 60er Jahre in Deutschland zur Behandlung der Psoriasis und allergischen Hautkrankheiten eingesetzt wurde.

Arsen war während des Zweiten Weltkrieges erstes Mittel der Wahl bei Syphilis und 1965 wurde es offiziell als Therapeutikum bei Asthma, Gingivitis, Vincent's Plaut Angina, Perniziöser Anämie und Morbus Hodgkin eingesetzt (Evens et al. 2004, Barbery et al. 2003). Heute wird Arsen weiterhin als ein essentieller Bestandteil in der Chinesischen Medizin sowie in homöopathischen Präparaten in Form von Arsenicum album verwendet. Im Jahr 2000 wurde ein arsenithaltiges Präparat unter dem Namen Trisenox in den USA zur Behandlung der promyelozytären Leukämie (APL) zugelassen. Seit 2002 besteht für Trisenox auch in Europa eine Zulassung, um unter der Behandlung eine Remission der Leukämischen Zellen zu induzieren (Anderson et al. 2002, Bachleitner-Hofmann et al. 2002, Miller et al. 2002).

Aufgrund der gesundheitlich schädigenden Wirkung von Arsen wurde der therapeutische Einsatz jedoch im Laufe der Jahre in den verschiedenen Anwendungsgebieten immer weiter eingestellt (Jackson und Grainge 1975). So ist bekannt, dass Arsen eine kanzerogene Wirkung besitzt, die sich in verschiedenen Organen des menschlichen Körpers manifestieren kann (Hughes 2002, Kitchin 2001, Rossman 2003, WHO 2002).

Ein zentrales Thema im Zusammenhang mit Arsen ist die Grundwasserbelastung. Die Kontamination des Grundwassers entsteht zum einen durch natürlich geologisch vorkommende Arsenressourcen und wird stark durch die geologischen und örtlichen Gegebenheiten beeinflusst. Arsen ist ein natürlicher Bestandteil der Erdkruste und wird als Oxyanion durch biogeochemische Prozesse aus Erzverbindungen von Eisen, Aluminium und Mangan in unterirdisch liegenden Wasserspeichern in das Grundwasser freigesetzt. Je nach geologischem Untergrund hat das Trinkwasser in einigen Gebieten der Erde einen hohen Arsengehalt (Ratnaike 2003, Nordstrom 2002).

Die geogene Kontamination von Trinkwasserressourcen wurde in Ländern wie Indien, Bangladesh, Taiwan, Mexiko, Chile, Pakistan, China, Thailand, Argentinien und USA dokumentiert (Dulout et al. 1996, Hopenhayn-Rich et al. 1996, Lerda 1994, Vega et al. 1995, Haque et al. 2003, Tondel et al. 1999, Hall 2002). Zu den zwei am stärksten betroffenen Regionen der Welt gehören Bangladesh und das westliche Bengal in Indien. Im südlichen Bangladesh und in angrenzenden Bezirken des westlichen Bengals sind 79,9 Millionen bzw. 42,7 Millionen Menschen durch die Grundwasserbelastung Arsen-Konzentrationen über den seit 1993 von der Welt-Gesundheits-Organisation empfohlenen Maximalwert von 10 μ g/l ausgesetzt. In beiden genannten Regionen kommt Arsen als eine natürliche Ressource vor. In den Jahren 1960 bis 2000 wurden in Bangladesh und Chile für die Verbesserung einer hygienischen Trinkwasserversorgung etwa 10 Millionen Wasserbrunnen gegraben. Die Folge war eine drastische Erhöhung der Arsen-Konzentration im Trinkwasser bis zu 860 μ g/l infolge von Auswaschungen aus arsenhaltigen Erzen (Joshi et al. 2003, Jones et al. 2008). Weltweit sind Millionen von Menschen arsenkontaminiertem Trinkwasser mit Werten über 100 μ g/l ausgesetzt (Chatterjee et al 1995, Smith et al. 2000).

Zum anderen entsteht eine Arsenkontamination des Trinkwassers durch industrielle Verschmutzung sowie durch Verwendung von arsenhaltigen Pestiziden in der Holzwirtschaft. Der Einsatz von arsenhaltigen Insektiziden ist mittlerweile nicht mehr erlaubt (WHO 2002).

Der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlene Grenzwert seit 1993 für Arsen im Trinkwasser liegt bei 10 μ g/l und ist seit 1996 in Deutschland einzuhalten sowie seit 1998 in der EU gesetzlich vorgeschrieben. 2001 reduzierten die USA den Grenzwert für Arsen im Trinkwasser von 50 μ g/l auf 10 μ g/l.



Abb. 1: Arsenbelastete Gebiete weltweit (mit freundlicher Genehmigung von ©BWT)

Akute Intoxikationserscheinungen treten bei Arsendosen über 65 mg Einnahme per os auf (Lüllmann 1999). Dabei stehen initial gastrointestinale Beschwerden mit Durchfall und Koliken im Vordergrund, im späteren Verlauf können Nieren- und Kreislaufversagen, bis hin zum Schock und Multiorganversagen die Folge sein.

Hinsichtlich der Umwelttoxikologie von Arsen ergibt sich eine Vielzahl offener Fragen. So ist der Mechanismus der Arsen-bedingten Genotoxizität und Kanzerogenität nicht hinreichend geklärt, es ist jedoch bekannt, dass in Folge chronisch hoher Exposition vermehrt Neoplasien in der Bevölkerung auftreten (Vahter et al. 1995). Dabei können Tumore an der Haut, Lunge Harnblase, Leber, Magen und Kolon auftreten (Abernathy et al. 1999, Dopp et al 2009, Chen et al. 1992, Kitchin 2001). Die Frage einer gesundheitlich sicheren Grenzwertfestlegung ist jedoch nur unzureichend beantwortet und bisher konnte keine Schwellenkonzentration, bzw. verantwortliche Expositionsdauer und -dosis für die karzinogene Wirkung von Arsen abgeleitet werden. In zahlreichen Studien konnten bereits ab einer Trinkwasserkonzentration von 8 μ g/l eine Arsen-bedingte Mortalitätserhöhung der Bevölkerung durch Krebserkrankungen dokumentiert werden (Chen et al 1992, Morales et al. 2000, Haque et al. 2003, Peplow und Edmonds 2004). Die Wirkungsmechanismen von Arsen werden in Kapitel 1.2 dargestellt.

In Bezug auf eine umwelttoxikologische Bewertung von Arsen und seinen anorganischen Verbindungen stehen die chronisch toxischen Wirkungen im Vordergrund. Die zu Grunde liegenden Wirkprinzipien haben eine hohe Relevanz in Bezug auf den Verlauf der DosisWirkungs-Beziehungen der chronischen Toxizität. Der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehungen hat eine direkte Konsequenz in Bezug auf die Risikobewertung von anorganischen Arsenverbindungen. Der Metabolismus von Arsen ist komplex und relevant, da intermediär reaktive Metabolite entstehen, die bei der Bewertung der Wirkprinzipien zu berücksichtigen sind. Wissenschaftllich interessant ist die Frage einer unterschiedlichen Empfindlichkeit des Menschen in Bezug auf die Toxizität von anorganischen Arsenverbindungen, darunter insbesondere die Hinweise auf die Ausbildung einer erhöhten Arsentoleranz. Diese Einleitung konzentriert sich daher im folgendem auf die Themenfelder Metabolismus von anorganischen Arsenverbindungen, mögliche Wirkprinzipien, chronisch toxische Wirkungen und spezifische Toleranz-/Resistenzmechanismen.

1.1 Der Metabolismus von Arsen

Arsen kommt in zwei Oxidationszuständen vor: In dreiwertiger Form als Arsenit (As^{III}) und in fünfwertiger Form als Arsenat (As^V). Organische Arsenverbindungen, wie sie in Fischen und Meeresfrüchten zu finden sind (Arsenocholin und Arsenobetain) (Gebel TW 2001a), werden vom Menschen und den meisten Tieren nur in geringem Ausmaß (ca. 10%) metabolisiert und fast unverändert innerhalb von zwei bis drei Tagen über die Nieren ausgeschieden (Crecelius 1977, Cohen et al. 2006).

Da organische Arsenverbindungen damit weitgehend ohne Wirkung den Körper passieren und anorganisches Arsenit (As^{III}) und Arsenat (As^V) auf Säugerzellen ein stärkeres toxisches Potential besitzen, fokussiert sich die Forschung hauptsächlich auf anorganische Arsenverbindungen (Vather 1988, Ochi et al. 1994, Oya-Ohta et al. 1996, Eguchi et al. 1997). Eine Belastung des Menschen mit anorganischem Arsen erfolgt hauptsächlich über kontaminiertes Trinkwasser (Lerda 1994, Peplow und Edmonds 2004, Jones et al. 2008).

Bezüglich des Arsenmetabolismus ist bekannt, dass Arsenmetabolite durch Methylierung in der Leber verstoffwechselt werden (Li et al 2005, Vahter 2000, Mitchell et al. 2000). Das anorganische fünfwertige Arsenat As^V wird zunächst zu dreiwertigem Arsenit (As^{III}) reduziert, welches in die Zelle aufgenommen und dann weiter metabolisiert wird (Abb.2). Yu et al. identifizierten (2003) die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) im menschlichen Organismus für diese Reaktion der Arsenat-Reduktase (Reduktion von Arsenat (As^V) zu Arsenit (As^{III}). Als Quelle fur Reduktionsäquivalente dient Glutathion.



Abb. 2: Hypothetisches Schema der Biotransformation von anorganischem Arsen

As (Arsen), MMA (Monomethylarsonsäure), DMA (Dimethylarsonsäure), TMA (Trimethylarsinoxid), SAM (S-Adenosylmethionin), SAHC (S-Adenosylhomocystein), AS3MT (As^{III}-S-Adenosylmethionin-Methyltransferase), GSH, Gs (reduziertes Glutathion), GSSG (oxidiertes Glutathion, Glutathiondisulfid), PNP (Purin-Nukleosid-Phosphorylase), GSTO (Glutathion-S-Transferase), GSX (Glutathion-S-Konjugat) (modifizert nach Suzuki et al. 2001, Hayakawa et al. 2005).

Der weitere Metabolismus (Abb.2) stellt eine Reihe von Reduktionen und oxidativen Methylierungen dar, wobei Arsenit (As^{III}) zunächst in der Leber durch sequentiellen Transfer von Methylgruppen von S-Adenosylmethionin (SAM) zu Monomethylarsonsäure (MMA^V) verstoffwechselt wird (Li et al. 2005). Diese oxidative Methylierung erfolgt über die detektierte AS3MT (frühere Nomenklatur: Cyt19) As^{III}-S-Adenosylmethionin-Methyltransferase, welche in der Leber exprimiert wird (Zakharyan et al. 1999). Ihre Funktion besteht darin, die Methylgruppen von S-Adenosylmethionin (SAM) auf dreiwertige Arsenitmetaboliten zu übertragen und ist in den einzelnen Individuen unterschiedlich ausgeprägt (De Chaudhuri et al. 2008, Drobná et al. 2006, Kitchin 2001, Mitchell et al. 2000, Vahter 2000, Aposhian 1997).

Die anschließende Verstoffwechselung erfolgt in einer Reduktion von fünfwertiger MMA^V zu dreiwertiger Monomethylarsonsäure (MMA^{III}). Die hierbei involvierte Reduktase ist das

geschwindigkeitslimitierende Enzym des anorganischen Arsen-Metabolismus und gehört zur Superfamilie der Glutathion-S-Transferasen (Thompson 1993, Zakharyan et al. 2001). MMA^{III} wird dann in einer weiteren Methyltransferase-abhängigen Reaktion zu der weniger toxischen Dimethylarsonsäure DMA^V methyliert (Bode und Dong 2002, Kitchin 2001, Sordo et al 2001). Beim Menschen werden vor allem MMA^{III} und DMA^{III} gebildet, bei der Ratte wurde auch Trimethylarsinoxid (TMA^{III}) gefunden (Cohen et al. 2006). Waters et al. (2004) konnten in Rattenzellen eine Methylierung von DMA^{III} feststellen und postulierten, dass DMA^{III} zu TMA^V methyliert und schließlich zu TMA^{III} reduziert wird.

Ein Vorteil der Methylierung liegt darin, dass MMA^V und DMA^V im Gegensatz zu Arsenat und Arsenit rascher mit dem Urin über die Nieren ausgeschieden werden können (Hayakawa et al. 2005, Marafante et al. 1985, Vahter et al. 1995).

 DMA^V konnte im Rattenversuchsmodell als einer der dominantesten vorkommenden Arsenmetaboliten im Urin nachgewiesen werden und wurde lange Zeit als Endabbauprodukt des anorganischen Arsen in Mäusen, Ratten und Hamstern angesehen (Fischer et al. 1985, Vahter et al. 1984, Kitchin 2001). Cui et al. (2004) stellten nach intravenöser Applikation von As^{III} am Rattenmodell eine erheblich höhere Konzentration an unmethyliertem freiem As^{III} im Urin fest.

Des Weiteren wurde bisher angenommen, dass die Methylierung von anorganischen Arsenkomponenten einer Detoxifikation gleichgesetzt werden konnte (Fischer et al. 1985, Vahter und Concha 2001). Die neuesten Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die Arsenabbauprodukte DMA^{III} und MMA^{III} ein höheres zyto-und genotoxisches Potential im Vergleich zu As^{III} und As^V aufweisen und signifikant zur Kanzerogenität des Arsenits beitragen. Dabei entstehen die dreiwertigen Arsenmetabolite (MMA^{III}, DMA^{III}) möglicherweise aus Vorstufen der fünfwertigen Arsenverbindungen (MMA^V, DMA^V) (Schwerdtle et al. 2003, Basu et al. 2001, Petrick et al. 2000, Styblo et al. 2000, Cohen et al. 2006).

Weiterhin ist bekannt, dass Arsenit (As^{III}) in der Leber einen Komplex mit Glutathion bildet (As(GS)₃) und durch biliäre Exkretion in den enterohepatischen Kreislauf eintritt (Gyurasics et al. 1991, Delnomdedieu et al. 1994, Kala et al. 2000). Die Konjugation von Glutathion an Arsenmetabolite wird durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert. Im Menschen sind drei Glutathion-S-Transferasen (GSTM1, GSTT1 und GSTP1) bekannt (De Chaudhuri et al 2008, Yin et al. 2001, Aposhian et al 2004). Glutathion-S-Transferasen besitzen eine differenzierte Substratspezifität, können dabei aber jeweils ein breites Spektrum an toxischen Substanzen konjugieren, um die Substanz transportfähig und bereit zur Elimination aus der Zelle zu

machen. Desweiteren sind die Glutathion-S-Transferasen an der Reduktion von MMA^V zu MMA^{III} beteiligt, wobei Glutathion als Quelle für die Reduktionsäquivalente dient (Kuo et al. 1998, Liu et al. 2001).

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Prozess der Biomethylierung in humanen Hepatozytenkulturen von der jeweiligen Arsen-Konzentration abhängig ist. Nach Exposition mit niedrigen Arsenit-Konzentrationen waren gehäuft DMA-Metabolite im Urin nachweisbar gewesen, nach höheren Arsenit-Konzentrationen gehäuft MMA als methylierter Arsenmetabolit (Drobná et al. 2004). Hayakawa et al. (2005) postulierten, dass die Bildung von MMA^V und DMA^V möglicherweise nicht die Folge von Reduktionen und oxidativen Methylierungen seien, sondern diese methylierten Arsenmetabolite aus Arsen-Glutathion-Komplexen entstehen, somit ursprünglich aus dreiwertigen MMA^{III} und DMA^{III} stammen und in der fünfwertigen Form über den Urin ausgeschieden werden können.

Möglich ist weiterhin, dass die Konjugation von As^{III} an Gluthation als ein Stoffwechselweg vor allem nach Aplikation von freiem anorganischen Arsen (As^{III}) höherer Konzentrationen anzusehen ist und bei akuten Intoxikationen zur raschen Elimination aus dem Blutkreislauf dient (Suzuki et al. 2001, Drobná et al. 2010).

Weiterhin wird die Glutathion-Konjugation vom Glutathionspiegel in der Leber bestimmt. Die an Glutathion konjugierten Arsenmetabolite As^{III}(GS)₃, MAA^{III}(GS)₂ und DMA^{III}(GS) werden mittels Transmembrantransport in die Gallenkanälchen ausgeschieden (Suzuki et al. 2001). Bezüglich des verantwortlichen Transporters für Arsenmetabolite werden zur Zeit verschiedene in der Leber vorkommende Adenosin-Triphosphat (ATP)-binding cassette (ABC)-Transporter diskutiert. Dabei wurde die vermehrte Expression von den MRP-Transportern (multidrug resistance-associated proteins) MRP1 (neue Nomenklatur: ABCC1; ältere Namen: MRP, ABCC, GS-X, ABC29), MRP2 (neue Nomenklatur ABCC2; ältere Nomenklatur: cMOAT1 oder cMRP) und MRP3 (neue Nomenklatur ABBC3; ältere Namen: MOAT-D, cMOAT-2) sowie von dem ABC-Transporter P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1, MDR1; ältere Namen: P-gp) festgestellt und mit einem Efflux der Arsenmetabolite bzw. mit der Ausbildung einer Arsen-Resistenz der Säugerzelle in Verbindung gebracht (Kala et al. 2000, Bolt und Stewart 2010, Sodani et al. 2012, Leslie et al. 2004, Liu et al. 2001, Lee et al. 1989, Wang und Rossman 1996). Sicher ist, dass MRP1 gemeinsam mit MRP2 den Kotransport von unkonjugierten hydrophoben Komponenten in Anwesenheit von freiem Glutathion (GSH) vermittelt und bei der Kontrolle des intrazellulären Glutathiondisulfid-Spiegels (GSSG) mitwirkt (Kruh und Belinsky 2003). Der MRP2-Transporter (neue Nomenklatur: ABCC2), auch als canicular multispecific organic anion transporter (cMOAT1 oder cMRP) bezeichnet, ist für den Transport organischer Anionen, sowie an Glucuronsäure oder Sulfat konjugierter Substrate zuständig und nimmt damit eine bedeutende Rolle in dem Arzneimittel- bzw. Fremdstofftransport der Zelle ein. Zudem ist er für die biliäre Exkretion des glucuronidierten Bilirubin verantwortlich (Nies und Keppler 2007). Auf membranständige Transporter als Determinanten einer Arsen-Resistenz wird in dieser Arbeit in dem Kapitel 1.4 ausführlich eingegangen.

Die an Glutathion konjugierten Arsenmetabolite werden im Verlauf des enterohepatischen Kreislaufs erneut von der Leber aufgenommen. Dort erfolgt die Methylierung zu MMA^{III} und DMA^V, wobei dreiwertige MMA^{III} als CH₃-As(GS)₂-Komplex an Glutathion konjugiert und fünfwertige MMA^V in unkonjugierter Form in die Galle sezerniert werden (Suzuki et al 2001). Hayakawa et al. (2005) machten in diesem Zusammenhang erneut die S-Adenosylmethionin-Methyltransferase in der Leber für die Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf die GSH-konjugierten Arsenitmetabolite verantwortlich.

Dies konnten Cui et al. (2004) mit einem Nachweis von MMA^{III} als CH₃-As(GS)₂-Komplex und As(GS)₃ in der Gallenflüssigkeit bestätigen und in Abhängigkeit des GSH-Spiegels eine Veränderung des As(GS)₃-Komplexes zu As^{III} und MMA^{III} in der Gallenflüssigkeit von Ratten beobachten. MMA^{III} wird anschließend zu MMA^V methyliert und kann in dieser Form über die Nieren ausgeschieden werden. Im Allgemeinen scheiden Menschen Arsen im Urin zu 10-30 % als Arsenit oder Arsenat, zu 10-20 % als MMA^V und zu 60-80 % als DMA^V aus (Hopenhayn-Rich et al. 1993, Vahter et al. 1984, Fischer et al. 1985).

Der Abbau und Transport von Arsen ist jedoch stark von der in vitro untersuchten Spezies abhängig (Vahter et al. 1984). Einige Affenarten (Marafante et al. 1985, Vahter et al. 1995) sowie das Meerschweinchen (Healy et al. 1997) sind unfähig, Arsen zu methylieren. Die Untersuchung des humanen Metabolismus wird zusätzlich dadurch erschwert, dass beim Menschen genetische Polymorphismen für unterschiedliche Enzyme des Arsenmetabolismus existieren, etwa für die Purin-Nukleosid-Phoshorylase (PNP), die Arsen-Methyltransferase (AS3MT; frühere Nomenklatur: Cyt19) und den Glutathion-S-Transferase-Genotyp (GSTM1, GSTT1, GSTP1). Diese Polymorphismen stellen eine Grundlage einer unterschiedlichen Metabolisierung sowie eines unterschiedlichen individuellen Risikos gegenüber Arsen dar (Vather et al. 1995, Drobná et al. 2004, Hopenhayn-Rich et al. 1996, De Chaudhuri et al. 2008). Weiterhin ist bekannt, dass die Reduktion der Arsenmetabolite von der Aktivität dieser vielfältig vorkommenden Methyltransferasen abhängig ist, die von multiplen Faktoren abhängig zu sein scheint. Selbst innerhalb einer Familie können mehrere Varianten

vorkommen, wie Biomonitoringstudien zeigten (Vahter 2000, Mitchell et al. 2000, Aposhian 1997, Vahter et al 1995 Yu et al. 2003).

Des Weiteren ist unzureichend geklärt, ob relevante Einflussgrößen wie beispielsweise die Koexposition mit anderen Halbmetallen oder Salzen (Selenit, Quecksilber oder Antimon) einen Einfluss auf den als Detoxifikation angesehenen Metabolismus von Arsen haben könnte (Bailly et al. 1991, Styblo et al. 2000). Studien berichten in den letzten Jahren über einen Zusammenhang mit Alter, Geschlecht, dem aktuellen Enährungsstatus sowie der damit verbundenen protektiven Rolle der Vitamine, Mineralien und Antioxidanzien. Dabei könnten Mineralstoffe und Vitamine die für die Detoxifikation notwendigen Prozesse begünstigen (Heck et al. 2007, Vather 2001, Chen et al. 2003, Vather und Marafante 1987, Gamble et al 2005).

1.2 Chronisch toxische Wirkungen von Arsen und mögliche zugrunde liegende Wirkprinzipien

Trotz intensiver Studien, ist es bisher nur unzureichend gelungen, die Wirkung von anorganischem Arsen am Menschen in einem Tiermodell zu reproduzieren.

Arsenit^{III} wurde international als humankanzerogen eingestuft und kann in Folge chronisch hoher Exposition vermehrt Neoplasie in der Bevölkerung induzieren (Vather et al. 1995). Dabei können Tumore an der Haut, Lunge Harnblase, Leber, Magen und Darm auftreten (Abernathy et al. 1999, Dopp et al 2009, Kitchin 2001). Besonders die Exposition nach DMA^{III} wurde mit Neoplasien der Lunge, Blase, Niere, Leber und Schilddrüse in Zusammenhang gebracht (Kenyon und Hughes 2001).

In West Bengalen, Indien, zeigte die chronische Arsenbelastung am gastrointestinalen System das Bild einer Hepatomegalie mit periportaler Fibrose oder septaler Zirrhose sowie das vermehrte Aufkommen des Hämangiosarkoms der Leber (Bates et al. 1992, Chen et al. 1992). Studien im Norden Chiles berichten zudem über das gehäufte Vorkommen von restriktiven und obstruktiven Lungenerkrankungen (Smith et al. 1998).

Weiterhin wurden in Taiwan peripher vaskuläre Phänomene wie die Akrozyanose (Raynaud-Syndrom) mit Folge der sog. 'Blackfoot-disease' beobachtet (Chen et al 1985). In den USA konnten kardiovaskuläre Manifestationen wie Myokarditis mit Herzrhythmusstörungen, sowie in Bangladesh hypertensive und ischämische Herzerkrankungen dokumentiert werden (Rahman et al. 1999, Chen et al. 1985, Peplow und Edmonds 2004). In diesem Zusammenhang stellten Tsai et al. 2001 nach Arsen-Exposition eine Erhöhung der Entzündungsmediatoren (z.B. Leukotriene, Prostazykline, Tumor-Nekrose-Faktor) in vaskulären Endothelzellen fest, die einen wesentlichen Beitrag zur Pathogenese der Arteriosklerose leisten.

Das häufigste Erscheinungsbild der chronischen Arsenvergiftung ist eine periphere Neuropathie, die dem Guillain-Barré-Syndrom mit exakt identischer elektromyographischer Darstellung gleicht. Weiterhin wird im Zusammenhang mit einer hohen Arsen-Exposition über ein erhöhtes Risiko von Erkrankungen des endokrinen Systems wie zu Beispiel des Diabetes mellitus diskutiert (Tseng 2004).

In Bezug auf das hämatologische System konnten vermehrt Neutropenien und die Entwicklung von Lymphomen beobachtet werden. Im Rahmen der chronischen Arsen-Exposition führten Arsenbindungen an Sulfhydryl-Gruppen von Enzymen der Blutbildung zu einer Störung des Hämoglobins im Blut mit einer reaktiven Polyglobulie im Blutbild. Klinisch finden sich hier nach Jahren der Arsen-Exposition Trommelschlägelfinger, Uhrglasnägel und Mees-Nagelbänder (Hernández-Zavala et al. 1999).

Studien und mechanistische Befunde zur Beschreibung möglicher Wirkprinzipien der Toxizität von Arsenverbindungen sind zahlreich und von den Ergebnissen her mannigfaltig.

Bezüglich der Zytotoxizität von Arsen wurde gezeigt, dass Arsenit (As^{III}) und Arsenat (As^V) das Zellwachstum in relativ kleinen Konzentrationen inhibierten (Eguchi et al. 1997).

Zunächst wurde postuliert, dass methylierte Arsenverbindungen weniger zytotoxisch sind als Arsenit (As^{III}) und Arsenat (As^V) (Ochi et al. 1994, Eguchi et al. 1997, Vahter und Concha 2001). Jedoch konnten in neueren Untersuchungen ein höheres zyto-und genotoxisches Potential von DMA^{III} und MMA^{III} im Vergleich zu As^{III} und As^V nachgewiesen werden (Schwerdtle et al. 2003, Basu et al. 2001, Petrick et al. 2000, Styblo et al. 2000). Ochi et al. bemerkten bereits 1998, dass DMA^{III} in V79-Zellen effektiver eine Mitosehemmung induzieren konnte als As^{III}. Thomas et al. (2001) stellten eine im Vergleich zu Arsenit (As^{III}) stärkere zytotoxische Wirkung von dreiwertigen methylierten Arsenen (DMA^{III}, MMA^{III}) fest. In diesem Zusammenhang konnte ein deutlich höheres Membranpotential bei den dreiwertigen methylierten Arsenmetaboliten DMA^{III} und MMA^{III} detektiert werden, welches eine Erklärung für die höhere zyto- und genotoxische Wirkung liefern könnte (Dopp et al. 2004).

MMA^V, DMA^V und TMA^V dagegen besitzen ein geringeres zytotoxisches Potential als Arsenit, jedoch ist ihre Wirkung nicht vollständig unschädlich (Ratnaike 2003, Schwerdtle et al. 2003, Petrick et al. 2000, Styblo et al. 2000).



Abb. 3: Vergleich der Zytotoxizitäts-Potenz der verschiedenen Arsenmetaboliten (modifiziert nach Vega et al. 2001)

Es ist bekannt, dass Arsenit eine besondere Affinität zu Thiol- bzw. Sulfhydryl-Gruppen besitzt, welche sich in Zellenzymen und Gewebeproteinen befinden (Raitnake, 2003). Arsenit bindet an Thiolgruppen in Aminosäuren und kann die Proteinstruktur zerstören, sodass eine chronische Arsen-Exposition über die Bindung an regulativen Zellenzymen zu einer Inhibition von essentiellen Zellfunktionen führen kann.

Weiter inhibiert Arsenat (As^V) die Energieversorgung der Zelle, da es eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem chemisch anorganischen Phosphat besitzt und dadurch in den ATPbildenden Reaktionen der Atmungsketten- und Substratkettenphosphorylierung mit ADP instabile Arsen-Säureester bildet (Wang und Rossman 1996). Eine chronische Arsen-Exposition führt aufgrund der Bindung an Sulfhydryl-Gruppen von Enzymen der Blutbildung zu einer Störung des Hämoglobins im Blut und einer reaktiven Polyglobulie im Blutbild.

Dreiwertige Metabolite des Arsens besitzen nachweislich ein höheres toxisches Potential und können biochemische Prozesse und intrazelluläre Enzyme beeinflussen. Dabei können Funktionen für die Proliferation (z. B. Mitose- und Replikationsvörgange), die Zelldifferenzierung (z.B. Signalübertragungen von Wachstumfaktoren), den programmierten Zelltod (z.B. rezeptorvermittelte Signaltransduktion) oder die Entwicklung von Krebs beeinflusst werden (Qian et al. 2003, Yang und Frenkel 2002, Hayes 1997). Bei geringer Konzentration zeigt sich gewöhnlich verändertes Zellwachstum und reduzierte Proliferation; bei hoher Konzentration folgt die Induktion von Apoptose oder Nekrose. Arsen besitzt ebenfalls die Fähigkeit, den Mechanismus des programmierten Zelltodes (Apoptose) direkt durch Auslösen eines ´´apoptosis-inducing-factor`` (AIF) zu induzieren.

Die Aktivierung des AIF kann über verschiedene extern einwirkende Noxen und mutagene Substanzen ausgelöst werden. Dazu gehören neben bestimmten chemischen Agenzien wie z. B. anorganischem Arsen UV-Strahlung, ionisierende Strahlung und extreme Wärme. Die Einwirkung von mutagenen Substanzen kann eine fehlerhafte Replikation mit Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen und letztendlich eine Mitosehemmung bewirken (Mass et al. 2001). Infolge der durch Arsen induzierten intrazellulären Stressstimulatoren können Tyrosin-Kinase-Rezeptoren die apoptotische Signaltransduktionskette durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren initiieren und eine erhöhte Expression von apoptotischen Proenzymen wie Kaspasen auslösen. Über die Kaspasenkaskade werden degradierende Enzyme wie Endonukleasen oder Proteasen aktiviert, die DNA und andere Zellproteine abbauen und somit den Untergang der Zelle herbeiführen (Qian et al. 2003, Miller et al. 2002, Walter et al. 2007). Ein weiterer Aspekt in Bezug auf die Zytotoxizität zeigt sich in der Fähigkeit von frei vorliegendem Arsenit, die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in der Atmungskette zu beeinflussen und somit DNA-Schäden und Lipid-Peroxidationen herbeizuführen (Raitnake 2003, Hei et al. 1998). In diesem Zusammenhang wird über eine direkte Enzyminhibierung sowie über Bildung inhibierend wirkender Sauerstoff- und Stickstoffspezies diskutiert (Snyder 1990, Shi et al. 2000).

Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS) entstehen als Nebenprodukt bei Stoffwechselvorgängen der mitochondrialen Atmungskette und Cytochrom- P_{450} -Oxidasen. ROS schädigen eine Vielzahl von zellulären Makromolekülen, wie DNA, Lipide und Proteine. Sie können eine Proteinoxidation bzw. Lipidperoxidation der Membranproteine bewirken und somit das Membranpotenzial einer Zelle destabilisieren oder durch indirekte Reaktion mit der DNA eine Schädigung erzeugen (Qian et al. 2003).

Höherer oxidativer Stress führt letztendlich zu einer relevanten Erhöhung der DNA-Schädigung und die finale zelluläre Antwort kann Apoptose oder Nekrose sein. Antioxidantien können Radikale abfangen und eine unerwünschte Oxidation gezielt verhindern. Glutathion dient beispielsweise als Radikalabfänger, indem die reduzierte Form (GSH) durch eine freie Thiolgruppe Elektronen auf ROS (reactive oxygen species) überträgt und diese dadurch inaktiviert. Arsen wurde damit in Verbindung gebracht, den Glutathionspiegel zu senken, bzw. eine Affinität zu Thiolgruppen zu besitzen und durch Bindung an Glutathion die antioxidative Funktion der Zelle zu reduzieren. Die Depletion von intrazellulärem Glutathion, erhöht die arseninduzierte Mutationsrate um das Fünffache (Lynn et al. 2000, Dai et al. 1999, Del Razo et al. 2001). So besitzt Arsen auf Zellfunktionen eine indirekte zytotoxische Wirkung. Dabei kommt es mutmaßlich nicht zu einer direkten Einwirkung auf die DNA (Qian et al. 2003).

Im Rahmen dieser vielfältigen Prozesse kann es zu Veränderungen in der Genexpression kommen und Wijeweera et al. (2001) stellten in diesem Zusammenhang fest, dass bereits nicht-zytotoxische Konzentrationen von Arsenit nach vierstündiger Behandlung von Ratten in der Lage sind, die Signaltransduktionswege und die Genexpression in der Lunge zu beeinflussen.

Die Folge sind veränderte biochemische Kernprozesse, Chromatin-Kondensationen, DNA-Fragmentationen und schließlich der Zelltod (Qian et al. 2003, Huang et al. 1999).

26

Bezüglich der genotoxischen Wirkungen des Arsenits können zunächst zwei Formen der Schädigung unterschieden werden: genotoxische Effekte, die durch die unter Arsen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert werden und DNA-Schäden, die als Folge einer Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen persistieren. Arsen selber ist nicht zu Punktmutationen fähig, verstärkt aber die Induktion genotoxischer Effekte durch komutagene Wirkung bei Anwesenheit anderer Substanzen (Gebel TW 2001b, Lee et al. 1985, Kuroda et al. 1991). Diese genotoxischen Mechanismen spielen eine Rolle in der bis heute nicht vollständig verstandenen arseninduzierten Kanzerogenese.

Klastogene Schädigung der DNA, die zu einer strukturellen Veränderung der DNA und zu Bruchstücken von Chromosomen oder Chromatiden führt, wurde besonders bei Behandlung von Zellen mit hohen Dosen an Arsenit beobachtet. Dabei entstehen Kinetochor negative Mikrokerne, die Chromosomenfragmente ohne Zentromer enthalten (Dopp et al. 2004). Ebenso sind aneugene, also numerische chromosomale Aberrationen durch Arsenit dokumentiert (Gurr et al. 1993).

Aneugene DNA-Schädigungen sind durch Schäden am Spindelapparat oder Kinetochor hervorgerufene numerische Veränderungen der Chromosomen mit Verlust ganzer Chromosomen/Chromosomensätze (Aneuplodie) oder Gewinn ganzer Chromosomensätze (Polyploidie). Bei DMA^{III} inkubierten Zellkulturen traten klastogene Effekte, also strukturelle chromosomale Aberration, wie der Schwesterchromatidaustausch, die DNA-Protein-Vernetzung, Effekte wie Einzelstrangbrüche aber auch aneugene Schädigungen wie Aneuploidie auf (Dopp et al 2004, Schwerdtle et al. 2003, Sordo et al. 2001, Lerda 1994, Dong und Luo 1993).

Die Untersuchung von genotoxischen Effekten der dreiwertigen Arsenmetabolite MMA^{III} und DMA^{III} umfasste oxidative DNA-Schäden wie Einzel- und/-oder Doppelstrangbrüche (Hei et al. 1998), Modifizierung der zellulären Funktionen durch veränderte Phosphorylierungsmuster der Zellenzyme und Proteine (Huang et al. 1999) sowie die Hemmung von Enzymen der DNA-Reparaturmechanismen (Hartwig et al. 2003). DMA^{III} zeigte dabei ausgeprägtere genotoxische Wirkungen in Form von DNA-Schäden als MMA^{III}. In humanen Lymphozyten konnte bei den dreiwertigen methylierten Arsenmetaboliten (MMA^{III}, DMA^{III}) eine stärkere Inhibition von zellulären Enzymen sowie eine höhere Induktion von DNA-Strangbrüchen als bei Arsenit (As^{III}) nachgewiesen werden (Thomas et al. 2001, Mass et al. 2001). Dabei traten bei den dreiwertigen methylierten Arsenmetaboliten (MMA^{III}, DMA^{III}) DNA-Strangbrüche (klastogener Effekt) sowohl in Zellkulturen als auch

27

bei Versuchen an isolierter DNA, bei den fünfwertigen Arsenmetaboliten (MMA^V, DMA^V) hingegen nur in Zellkulturen auf.

Somit ist es möglich, dass die Methylierung die klastogene Wirkung von dreiwertigen Arsenmetaboliten steigert und von fünfwertigen abschwächt (Schwerdtle et al. 2003).



Abb. 4: Vergleich der Genotoxizitäts-Potenz der verschiedenen Arsenmetaboliten (modifiziert nach Dopp et al. 2004)

Weiterhin konnte für Arsenit die Hemmung von verschiedenen DNA-Reparatursystemen, wie die Hemmung der Reparatur oxidativer, UV-induzierter DNA-Schäden, gezeigt werden (Hartwig et al. 1997, Gebel TW 2001b, Schwerdtle et al. 2003).

Im Zusammenhang mit der molekularen DNA-Reparatur konnte von Walter et al. (2007) eine mögliche Relevanz der sog. Zinkfingerstruktur identifiziert werden. Wie bereits erwähnt, besitzt Arsen eine hohe Affinität zu Thiolgruppen, welche in der Zinkfingerdomäne vorkommen und somit eine potentielle Bindungskapazität für Arsen bieten (Delnomdedieu et al. 1993, Gebel T 1997). Die Zinkfingerdomäne ist eine Polypeptidkette, die durch den Einbau eines Zinkatoms eine schleifenartige Struktur, den sog. Zinkfinger einnimmt. Diese Region kommt in vielen DNA-Reparaturproteinen und Transkriptionsfaktoren vor und ist an der Regulation von Prozessen wie Transkription, DNA-Reparatur, Zellproliferation oder Apoptose beteiligt (Laity et al. 2001, Hartwig et al. 2003, Walter et al. 2007).

Es ist bisher nicht bekannt, ob Arsenit zu der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) führen kann. Der EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) gehört gemeinsam mit dem PDGF (Platelet-derived growth factor) und dem VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) zu der Gruppe der Rezeptor-Tyrosin Kinasen (RTK). Die Aktivierung des EGFR erfolgt normalerweise durch extrazelluläre Bindung und das Signal wird über Autophosphorylierung und Signaltransduktion weitergeleitet. In dem Zusammenhang der genotoxischen und kanzerogenen Wirkungen von Arsen wird über eine Modulation der zellulären Methyl-Spiegel (z.B. SAM, S-Adenosylmethionin und Vorläufer) und eine dadurch bedingte Veränderung der Methylierungsmuster der DNA diskutiert, welche wichtige Funktionen für die Regulation der Genexpression besitzen (Goering et al. 1999). S-Adenosyl-Methionin (SAM) wird für die physiologische DNA-Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin benötigt. Diese DNA- Methylierung trägt zur Genregulation sowie zur Steuerung der Transkription bei und ist von entscheidener Bedeutung bei der Embryogenese.

Die Dysregulation der Tyrosinkinase-Phosphorylierung hängt unmittelbar mit der abweichenden Signalinduktion, dem unkontrollierten Zellwachstum in Zellkuturen und der Entwicklung von Krebs in vivo zusammen. Es wurde berichtet, dass eine vermehrte Phoshorylierung von Tyrosin in direktem Zusammenhang mit malignen Erkrankungen wie Leukämie, Lymphom, Multiple Neoplasie Typ 2, Kleinzelligem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom und Kolonkarzinom stehen (Hunter 1998, Biscardi et al. 1999, Tapio und Grosche 2006).

Unter den intrazellulären Signalwegen, die vermutlich durch freie ROS aktiviert werden, ist der NFkappaB-Signalweg einer der wichtigsten. Dieser Signalweg führt bei sehr hohem oxidativen Stress letztendlich zu einer DNA-Schädigung und die finale zelluläre Antwort ist Apoptose oder Nekrose. Antioxidantien können Radikale abfangen und eine unerwünschte Oxidation gezielt verhindern. Fausto konnte bereits im Jahre 2000 nach Arsenit-Exposition eine erhöhte Bindungsaffinität zu dem Transkriptionsfaktor NFkappaB feststellen. Dieser initiiert die Transkription von Interleukinen, welche beispielsweise bei Entzündungsreaktionen freigesetzt werden und in Form von Phosphorylierungskaskaden die MAPK (Mitogen aktivierten Proteinkinasen) aktivieren (Bode und Dong 2002, Yang und Frenkel 2002).

1.3 Resistenzmechanismen gegen Arsen

Es gibt Hinweise auf Prozesse der humanen Gewöhnung bzw. Anpassung an hohe Arsen-Expositionen (Vahter et al. 1984, Drobná et al. 2006, Kitchin 2001, Suzuki et al. 2001, Cui et al. 2004). Sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Zellen können bei Kontakt mit Arsen Resistenzen entwickeln (Silver und Phung 1996, Rosen 2002, Chen und Rosen 1997, Liu et al. 2002, Mukhopadhyay et al. 2002, Ji und Silver 1992).

Amphiphile Lipide (Phospholipide, Glykolipide, Cholesterin) bilden die Grundmatrix biologischer Membranen, die somit einen stark hydrophoben Charakter besitzen. Die Membranen bilden damit eine Barriere insbesondere für hydrophile polare oder geladene Moleküle. Zusätzlich Substanzen ist es möglich, dass mit Hilfe ihres Konzentrationsgradienten die Membran über einfache Diffusion passieren. Dabei wird die Geschwindigkeit durch Faktoren wie Lipophilie und die Molekülgröße der Substanz beeinflusst. In den Membranen sind Transportproteine integriert, die substratspezifisch Substanzen identifizieren und diese durch hydrophobe Membranstrukturen schleusen können.

29

Zu den eingehend untersuchten Resistenzmechanismen bei Mikroorganismen gehört das sogenannte ars-Operon in Escherichia coli. Diese Gene codieren verschiedene für den Resistenzmechanismus verantwortliche Proteine, die zum Beispiel die Arsenitreduktion von Arsenat zu Arsenit, die Aktivierung und Bildung einer ATP-abhängigen Arsenitpumpe sowie die darauf folgende Ausscheidung von Arsenit vermitteln (Silver und Phung 1996). Die Anzahl der Gene kann variieren und die Details ihrer Funktion sind unterschiedlich. Dabei umfasst ein Operon mehrere Gene, die gemeinsam wie ein Schaltersystem reguliert werden können (Chen und Rosen 1997).

Es ist bekannt, dass Arsenit (As^{III}) in Prokaryoten und Eukaryoten durch Kanäle in der Zellmembran, sog. Aquaglyceroporine (AQP), in die Zelle geschleust werden können. Aquaglyceroporine gehören zur Gruppe der MIP (major intrinic protein), der intrinsischen Membranproteine. In Escherichia coli erfolgt die Arsenit-Aufnahme durch den Glycerotransporter GlpF, in Saccharomyces cerevisae durch den Fps1p-Transporter sowie den Hexose-Transporter (Hxt) (Rosen 2002, Rosen und Liu 2009).

Bezüglich der Aufnahme von Arsenat (As^V) konnte in Studien von Escherichia coli und Saccharomyces cerevisae ein Phosphattransportweg unter ATP-Verbrauch als Energiequelle festgestellt werden (Yompakdee et al 1996). Mittlerweile konnten drei verschiedene Arsenatreduktasen detektiert werden. ArsC in Escherichia coli und Staphylococcus aureus, wobei E.coli Glutathion (GSH) und Glutaredoxin, Staph aur. Thioredoxin als Elektronendonator verwendet. In der Hefe reduziert das Enzym Acr2p Arsenat (As^V) zu Arsenit (As^{III}) und ist die bisher einzig identifizierte Arsenreduktase in Hefezellen. Bei ihr dient Glutathion erneut als Reduktionsäquivalent (Mukhopadhyay et al. 2002, Ji und Silver 1992). In Prokaryoten wird Arsenit durch zwei unterschiedliche Transporter aus der Zelle eliminiert. Der in der Cytoplasmamembran lokalisierte Acr3p-Transporter der eukaryotischen Hefezelle transportiert Arsenit aktiv aus der Zelle, wobei dieser die Energie des elektrochemischen Potentialgradienten nutzt (Dey und Rosen 1995). Der Ycf1p (Yeast Cadmium Resistance Faktor) ist ein Protein aus der MDR-Familie (Multidrug Resistenz), welches GSH-Komplexe in Vakuolen und intrazellulären Kompartimenten transportiert und As^{III} als ein Glutathion-Konjugat aus dem Cytoplasmaraum eliminiert (Ghosh et al. 1999, Rosen 1999). In E. coli übernimmt die ATP-abhängige Ars-AB-Effluxpumpe die Ausschleusung von Arsenit.

Es ist bekannt, dass Säugerzellen ein breites Spektrum an toxischen Stoffen mittels Konjugation an Glutathion (GSH) aus der Zelle eliminieren können (Ishikawa 1992, Li et al. 1995, Ishikawa et al. 1996, Kruh und Belinsky 2003). Dieser Transport wird durch eine ATP- abhängige Glutathion-S-Konjugat-Pumpe vermittelt. Sie wurde 1992 von Ishikawa beschrieben und GS-X-Pumpe genannt und ist eine organische Anionen-Pumpe mit ATPase-Aktivität. Der Begriff GS-X-Pumpe ist durch ihre hohe Substrataffinität zu Glutathion-S-Konjugaten (GSH-Konjugate), Glutathion (GSH) und Cysteinylleukotriene entstanden (Ishikawa 1992). Wang Z et al. (1996) zeigten in diesem Zusammenhang, dass der Arsen-Efflux bei Arsen-resistenten V79-Zellen durch Inhibitoren der Glutathion-S-Transferase gehemmt wurde und das Aktivitätsniveau der Glutathion-S-Transferase die Toleranz der Zellen gegenüber Arsen mitbestimmt (Leslie et al. 2004). Neuere Studien deuten darauf hin, dass GS-X-Pumpen eine umfassende, bisher unterschätzte Substratspezifität für organische Anionen besitzen (Toyoda et al. 2008). Sie spielen eine erhebliche Rolle im Rahmen entzündlicher Reaktionen, bei oxidativem Stress sowie Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus und sind an der Ausbildung der Chemotherapeutika- bzw. Arzneimittel-Resistenz beteiligt (Ishikawa 1992, Ishikawa et al. 1996, Toyoda et al. 2008, Tiwari et al. 2011).

Arsenat (As^V) und Arsenit (As^{III}) gelangen auf unterschiedlichen Wegen in die Zelle von Mikroorganismen. Den dreiwertigen methylierten Arsenmetaboliten DMA^{III} und MMA^{III} konnte eine deutlich höhere Membranpermeabilität zugesprochen werden (Dopp et al. 2004).

Der Zusammenhang zwischen der Membranpermeabilität und der Aufnahme der Metabolite sowie die damit verbundene Auswirkung auf den Resistenzmechanismus ist bis heute noch unklar (Dopp et al. 2004). Weiterhin ist ungeklärt, inwieweit der Metabolismus von Arsen einen Einfluss auf das Toleranzniveau gegenüber Arsen haben könnte. Studien konnten jedoch belegen, dass die Konjugation an Glutathion in der Phase II des Arsenmetabolismus sowie der dadurch veränderte intrazelluläre Glutathionspiegel, der das Redoxpotential der Zelle beeinflusst, eine entscheidene Rolle spielen (Leslie et al. 2004, Toyoda et al. 2008, Sodani et al. 2012). Es ist bekannt, dass Arsenit (As^{III}) in der Leber einen Komplex mit Glutathion bildet (As(GS)₃) und als GSH-Komplex durch biliäre Exkretion in den enterohepatischen Kreislauf eintritt (Gyurasics et al. 1991, Dopp et al. 2004, Kala et al. 2000). Dabei dient die Glutathion-S-Transferase (GSTO) als Enzym, welches die Konjugation von Glutathion an Arsenmetabolite katalysiert und ein Schlüsselenzym der Biotransformation darstellt. (De Chaudhuri et al. 2008, Yin et al. 2001, Aposhian et al 2004).

In Säugerzellen wurde die Aufnahme und Ausscheidung von As^{III} und dem Arsenmetaboliten MMA^{III} über die Aquaglyceroporine AQP7 und AQP9 sowie den Glucosetransportern GLUT 1, GLUT 2 und GLUT 4 vermutet (Rosen 2002, Liu et al. 2002, Rosen und Liu 2009, Drobná et al. 2010) (s. Abb. 5) Lu et al. konnten 2006 den OATP-C (Organic Anion Transporter

Polypeptid) (OATP-2, SLCO1B1, LST-1) aus der Familie der SLC-Transporter als einen an der Aufnahme von Arsenat (As^V) und Arsenit (As^{III}) beteiligten Transporter in humanen embryonalen Nierenzellen (HK293) ermitteln.



Abb. 5:Mechanismen der Arsen-Resistenzen in Prokaryoten (*E.coli*), Eukaryotischen
Hefezellen (*S.cerevisiae*) und Säugerzellen. As^{III}: Arsenit, As^V: Arsenat. Weitere
Begriffe werden im Text erläutert. Modifiziert nach Rosen und Liu (2009), Drobná et al.
(2010).

Es werden verschiedene in der Leber vorkommende Adenosin-Triphosphat (ATP)-binding Cassette (ABC)-Transporter für die Ausscheidung und Einschleusung von Arsen und seinen Metaboliten in Säugerzellen diskutiert.

Mittlerweile ist bekannt, dass Arsenit (As^{III}) in Säugerzellen vorwiegend an Glutathion konjugiert wird. Verschiedene Studien konnten nach Arsen-Expositionen eine vermehrte Expression von MRP-Transportern (multidrug resistance-associated proteins) feststellen.

Dazu gehören insbesondere MRP1 (neue Nomenklatur: ABCC1; ältere Namen: MRP, ABCC, GS-X, ABC29), MRP2 (neue Nomenklatur ABCC2; ältere Nomenklatur: cMOAT1, cMRP) und MRP3 (neue Nomenklatur ABBC3; ältere Namen: MOAT-D, cMOAT-2) sowie der ABC-Transporter P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1, MDR1; ältere Namen: P-gp) (Liu et al. 2001, Kala et al. 2000, Takeshita et al. 2003, Drobna et al. 2010). MRP1, MRP2 und MRP3 sind überwiegend in der Cytoplasmamembran lokalisiert. MRP2 wurde mit

höherer Dichte auch in intrazellulären Membranen von Vesikeln gefunden (Sodani et al. 2012). Drobna et al. (2010) konnten eine vermehrte Expression des MRP2- Transporters sowie des P-Glykoproteins feststellen und diese Transporter in humanen Hepatozyten mit Ausbildung einer Arsen-Resistenz in Verbindung bringen. Infolgedessen wird davon ausgegangen, dass MRP2 und P-Glykoprotein den Transmembrantransport der an Glutathion konjugierten Arsenmetaboliten As^{III}(GS)₃, MAA^{III}(GS)₂ und DMA^{III}(GS) in die Gallenkanälchen vermitteln. Des Weiteren wird vermutet, dass MRP1 und MRP3 an dem Efflux von GSH-konjugierten Arsenmetaboliten As^{III}(GS)₃, MAA^{III}(GS)₂ und DMA^{III}(GS) in die sinusoidale Blutbahn beteiligt sind (Sodani et al. 2012, Drobna et al. 2010).

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass das humane *MRP1*-Gen (multidrug resistanceassociated protein) eine humane Glutathion-S-Konjugat- (GS-X-) Pumpe kodiert und die MRP-mRNA-Expression in Cisplatin-resistenten HL-60-Zellen durch Cisplatin ebenfalls induziert werden konnte. Interessanterweise waren die Cisplatin-resistenten Zellen kreuzresistent gegen Arsenit (Ishikawa et al. 1996). Auch Cole et al. (1994) konnten zeigen, dass MRP1-transfizierte Zellen neben Resistenzen gegen Chemotherapeutika auch Resistenzen gegen Arsenit und Arsenat aufwiesen.

1.4 Membranständige Transporter der ATP-binding-cassette-Proteinfamilie als Determinanten einer Arsen-Resistenz

Die humanen MRP-Transporter (ABCC-Proteine) gehören zu der ATP-binding-cassette (ABC)-Superfamilie (Suzuki und Sugiyama 1998). Die meisten Vertreter dieser Familie erfüllen die Funktion von Membranpumpen, die eine Vielzahl von Substraten (z.B. Ionen, Kohlenhydrate, Steroide, Antibiotika, Peptide) spezifisch und aktiv unter ATP-Verbrauch durch Membranen transportieren. Andere ABC-Proteine wirken als Ionenkanäle, Kanalregulatoren, Untereinheiten von Rezeptorsystemen oder ATP-Sensoren (Dean et al. 2001, Hollenstein et al. 2007).

Den ABC-Transportern gemeinsam ist als strukturelles Charakteristikum das Vorhandensein von ein oder zwei ATP-Bindungskassetten, die meist etwa 150-250 Aminosäuren umfassen und die an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt sind. Diese hydrophilen Regionen werden auch als nucleotide binding domains (NBD) bezeichnet. Sie enthalten Proteinmotive, die in allen bekannten ABC-Proteinen hoch konserviert sind. Eukaryontische ABC-Transporter besitzen über die Nukleotid-Bindungsdomänen hinaus Transmembrandomänen (TMDs), in denen jeweils mindestens sechs α -helikale Elemente eine relativ hydrophobe Proteinregion bilden.



Abb. 6: Membrantopologie von ABC-Transportern

Dargestellt sind verschiedene Typen von ABC-Transportern in der Plasmamembran (PM). a) mit zwei Transmembrandomänen (TM₁ und TM₂) und zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD), z. B. P-Glykoprotein (MDR1); b) mit drei Transmembrandomänen (TM₀, TM₁ und TM₂) und zwei NBDs, z. B. MRP1 und MRP2; c) mit je einer NBD und Transmembrandomäne (TM), z. B. BCRP. Jede der Transmembranendomänen besteht aus 6 membrandurchspannenden Helizes. Modifiziert nach Gottesman et al. (2002).

ABC-Transporter können als Volltransporter vorliegen, bestehend aus einem einzigen Protein in der TMD-NBD-TMD-NBD primären Domänenstruktur, oder sich als Dimer aus zwei Halbtransporterproteinen bilden (je nach Halbtransporter als vorwärts gerichtete Dimerstruktur (TMD-NBD)₂ oder als rückwärts gerichtete Dimerstruktur (NBD-TMD)₂). Die zur MRP-Gruppe gehörenden Volltransporter weisen ein strukturelles Charakteristikum auf: sie besitzen eine dritte N-terminale Transmembrandomäne TMD0, deren Funktion bisher unbekannt ist (Cole et al. 1992, Deeley et al. 2006, Hollenstein et al. 2007). Zu der humanen Subfamilie ABCC der ABC-Transporter (von insgesamt 7 Subfamilien ABCA-G) gehören 13 Transportsysteme der multidrug resistance-associated proteins (MRP):



Abb. 7: Schematische Darstellung der humanen ATP-binding-cassette (ABC) Superfamilie
C: MRP-Transporter (*multidrug resistance-associated proteins*): MRP 1-6 (neue Nomenklatur: ABCC 1-6), MRP 7-9 (neue Nomenklatur: ABCC10 bis ABCC12), ABCC13 (Pseudogene, PRED6), CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; neue Nomenklatur: ABCC7), SUR 1 und 2 (Sulfonylharnstoff-Rezeptoren 1 und 2; neue Nomenklatur: ABCC8 und 9), modifiziert nach Toyoda et al. 2008.

Neben einer traditionellen Nomenklatur, die für viele humane ABC Transporter noch gebräuchlich und akzeptiert ist (z. B. für Proteine der MRP Gruppe oder für CFTR), existiert seit 1999 ein neues systematisches Nomenklatursystem, welches im Rahmen der Human Genome Organization (HUGO) für menschliche ABC Proteine etabliert wurde (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK31/). So entspricht die Bezeichnung für das MRP1 Protein nach neuer Nomenklatur ABCC1. In der vorliegenden Dissertationsschrift wird vornehmlich die traditionelle MRP Nomenklatur verwendet. Ihre Einteilung in sieben Subgruppen (ABCA-G) erfolgte analog zur ABC-Klassifizierung für Hefen, wobei die Übereinstimmung struktureller und funktioneller Homologien einen Einblick in die lange evolutionäre Entwicklung dieser Proteinsuperfamilie gibt. Eine Vielzahl der ABC-Transporter konnte in den vergangenen Jahren mittels neuer Klonierungs-Techniken identifiziert werden und vollständige Sequenzen von mittlerweile 49 humanen ABC-Genen sind in Datenbanken zugänglich.

Einleitung

Bei anderen Säugetieren (z.B. Nagetieren) finden sich ABC-Transporter, die den menschlichen MRPs von der Primärstruktur her nahe verwandt sind und entsprechende Funktionen zu erfüllen scheinen. Sofern sich Angaben auf Nagetiersysteme beziehen, werden die Kurzbezeichnungen für die Transporter in der Arbeit nur am Anfang mit einem Großbuchstaben versehen (Mrp). Der Name der MRP-Transporter (multidrug resistanceassociated proteins) resultiert aus der Eigenschaft mehrerer Vertreter dieser Gruppe, eine zelluläre Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von potentiell toxischen Verbindung zu vermitteln. Eine mögliche Rolle während der Evolutionsgeschichte besteht darin, durch den Transport diverser Substrate eine zelluläre Schutzfunktion erfüllt zu haben, und somit Organismen zur Überlebensfähigkeit verholfen zu haben. Die Bedeutung von ABC-Transportern lässt sich jedoch keineswegs nur auf induzierbare Resistenzen gegenüber Zellgiften reduzieren. In der heutigen Klinik spielen die ABC-Transporter eine erhebliche Rolle in der multiplen Arzneimittelresistenz und stehen im Zusammenhang mit der Ausbildung einer Multidrug Resistenz (MDR) während der Tumortherapie (Gottesman et al. 2002, Jemal et al. 2009). So vermitteln beispielsweise mehrere Vertreter dieser Gruppe den ATP-abhängigen Efflux von Zytostatika, Antibiotika sowie Antimalariamittel (Cole et al. 1992, Zaman et al. 1994, Jedlitschky et al. 1996, Loe et al. 1996, Homolya et al. 2003).

Einige der humanen ABC-Transporter weisen eine sehr breitgefächerte und teilweise auch gemeinsame Spezifität für strukturell verschiedene Moleküle auf. So kann es bei der gleichzeitigen Einnahme mehrerer Wirkstoffe zu klinisch relevanten Interaktionen kommen, wenn diese mit dem gleichen ABC-Protein interagieren. Konkurrieren zwei Arzneistoffe zum Beispiel um die Aufnahme bzw. die Ausscheidung über den gleichen ABC-Transporter mit limitierter Transport-Kapazität, so kann die Plasmakonzentration beider Stoffe stark verändert sein. Es kann entweder bei Erniedrigung der Konzentration im Blut zu einem Wirkverlust, oder durch Erhöhung der Plasmakonzentration zu einer Intoxikation kommen (Higgins 2007, Schinkel und Jonker 2003, Henry et al. 2008).

Weiterhin ist möglich, dass die Expression von einigen ABC-Transportern durch Arzneistoffe induziert und so die Pharmakokinetik anderer Wirkstoffe verändert wird, welche ebenfalls mit diesen Transportern interagieren. Ebenso ist bekannt, dass bestimmte Arzneistoffe ihr Zielgewebe, wie zum Beispiel das zentrale Nervensystem, nicht erreichen, da dieses von ABC-Transportern geschützt wird. Dies betrifft unter anderem Zytostatika, die bei Hirntumoren eingesetzt werden (Deeken und Löscher 2007).

Pharmakokinetische Parameter wie die Bioverfügbarkeit und die Gewebeverteilung sind nicht
Einleitung

nur für die Arzneimittelsicherheit von Bedeutung, sondern stellen auch wichtige Charakteristika bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe dar. Diese werden unter anderem auch von ABC-Transportern beeinflusst. Daneben spielen die variablen Ausprägungen in der Expression bzw. Mutation bestimmter Transporter eine Rolle bei verschiedenen genetisch bedingten Erkrankungen. Der CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; neue Nomenklatur: ABCC7) ist beispielsweise für die Regulation von Chloridkanälen zuständig, führt aber bei genetischen Defekten zur Ausbildung der zystischen Fibrose (Dean et al. 2001, Reddy et al. 1999). MRP8 (ältere Namen: SUR1; neue Nomenklatur: ABCC8) und SUR2 (neue Nomenklatur: ABCC9) sind beispielsweise intrazelluläre ATP-Sensoren und regulieren die Aktivität des ATP-sensitiven spezifischen Kalium-Kanals (Keppler 2011).

Einige der multispezifischen ABC-Transporter sind am Phänomen der klassischen Multidrug Resistenz (MDR) von Tumoren während der Behandlung mit einem Chemotherapeutikum beteiligt, sodass die Ausbildung einer erworbenen Resistenz die Folge sein kann (Gottesman et al. 2002, Jemal et al. 2009). Ein bedeutender Mechanismus der MDR ist die vermehrte Expression der Adenosin-Triphosphat (ATP)-binding Cassette (ABC)-Transporter in der Zellmembran von Tumorzellen, welche einen Efflux der Zytostatika bewirken. Infolgedessen sinkt die intrazelluläre Konzentration der Wirkstoffe, die Wirkung ist vermindert oder wird nicht ausgelöst, was das Versagen der Chemotherapie zur Folge haben kann. Aufgrund der breiten Substraterkennung der involvierten ABC-Transporter kann sich eine Kreuzresistenz entwickeln, bei der die Tumorzellen unempfindlich gegenüber mehreren strukturell und vom Wirkungsmechanismus her verschiedenen Zytostatika sind.

Die Gewebeverteilung und die funktionalen Eigenschaften dieser Transportproteine lassen auf eine wichtige Rolle beim Schutz des Körpers vor potentiell toxischen Fremdstoffen schließen, da durch diese sowohl die Absorption der Stoffe im Darm verringert als auch die Ausscheidung über die Leber oder die Niere beschleunigt wird (Higgins 2007, Szakács et al. 2006). Bei vielen Transportproteinen sind sowohl die Substrate als auch die physiologischen Funktionen jedoch noch unbekannt.

Zu den am intensivsten untersuchten MDR-Transportern der ABC-Transporter gehören: P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1; ältere Namen: P-gp), Breast cancer resistance protein (BCRP) (neue Nomenklatur: ABCG2) sowie Multidrug resistance-related protein1 (neue Nomenklatur: ABCC1; ältere Namen: MRP1, ABCC, GS-X, ABC29), die für die Regelung des Efflux vieler verschiedener Zytostatika verantwortlich gemacht werden konnten (Dean et al. 2001, Jemal et al. 2009).

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den ABC-Transportern MRP1 (neue Nomenklatur: ABCC1; ältere Namen: MRP, ABCC, GS-X, ABC29) und MRP2 (neue Nomenklatur ABCC2; ältere Nomenklatur: cMOAT1 oder cMRP). Diese werden zusammen mit ihrer individuellen klinischen Relevanz in den folgenden Abschnitten näher vorgestellt.

Der MRP1-Transporter (neue Nomenklatur: ABCC1; ältere Namen: MRP, ABCC, GS-X, ABC29) wird in einer Reihe von Geweben exprimiert. 1992 konnten Cole et al. die cDNA des humanen MRP1-Transporters aus der Brochialkarzinom- Zellinie H69AR isolieren. Mit Hilfe des Northern Blots konnte die Expression der MRP1-Transporter mittlerweile in Placenta, Uterus, Testes, Prostata, Gehirn, Niere, Speicheldrüsen, Kolon, Leber, Milz, im Skelett- und Herzmuskel sowie in der Lunge nachgewiesen werden. Dabei wurden insbesondere Transporte an Blut-Gewebe-Schranken wie beispielsweise in den Zellen des Plexus choroideus der Blut-Liquor-Schranke, in dem apikalen Chorionepithel der Plazentaschranke sowie in dem Alveolarepithel der Bronchiolen dokumentiert (Cole 1999, Flens et al. 1996, Bréchot et al. 1998, St-Pierre et al. 2000).

Der MRP1-Transporter funktioniert als ein multispezifischer organischer Transporter für lipophile Anionen und zu seinen Substraten gehören an Glutathion (GSH) konjugierte Substrate wie Leukotrien C4 sowie Prostaglandin A2 (Liu et al. 2001). Des Weiteren transportiert er an Glucuronsäure oder Sulfat konjugierte Steroidhormone und Gallensalze und nimmt eine bedeutende Rolle im Arzneimitteltransport der Zelle ein (Jedlitschky et al. 1996, Loe et al. 1996, Homolya et al. 2003). Gemeinsam mit MRP2 vermittelt der MRP1-Transporter den Kotransport von unkonjugierten hydrophoben Komponenten in Anwesenheit von freiem Glutathion (GSH) und wirkt bei der Kontrolle des intrazellulären Glutathiondisulfid-Spiegels (GSSG) mit (Kruh und Belinsky 2003).

Der Transport von Glutathion und Glucuronsäure-Konjugaten ist besonders von Interesse, da er beim Arsemmetabolismus eine wichtige Phase der Detoxifikation darstellen (s. Abb. 2). Eine ATP-abhängige Glutathion-S-Konjugat-Pumpe wurde 1992 von Ishikawa beschrieben und als GS-X-Pumpe benannt. Diese Funktion von MRP1 als GS-X-Pumpe erklärt die Transportkapazität für anorganisches Arsenit, welches Komplexe mit GSH-Molekülen bilden kann (Zaman et al. 1994, Kruh und Belinsky 2003, Dean et al. 2001). Wang Z et al. (1996) zeigten in diesem Zusammenhang, dass der Arsen-Efflux aus Arsen-resistenten V79-Zellen durch Inhibitoren der Glutathion-S-Transferase gehemmt wurde. Von weiterem Interesse ist die Expression des MRP1-Transporters in einer Vielzahl menschlicher Krebszelllinien, da er in zahlreichen Tumorarten, wie z.B. kleinzelligem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom und verschiedenen hämatologischen Krebsarten detektiert werden konnte (Kool et al. 1997).

Wie bereits beschrieben, stehen MRP1-Transporter unter anderem in Zusammenhang mit der Resistenzentwicklung gegenüber einem Chemotherapeutikum und werden für den damit verbundenen progredienten Verlauf der Erkrankung, dem Auftreten eines Rezidives im Rahmen einer Tumortherapie bzw. für das Versagen der Therapie verantwortlich gemacht (Wright et al. 1998, Tiwari et al. 2011).

Mittels MRP1-transfizierter Zellkultur konnte ein Resistenzspektrum bestimmt werden, welches die Ausbildung einer Reihe von Chemotherapeutika-Resistenzen, wie z.B. gegenüber Etoposid, Epirubicin, Doxorubicin, Vinblastin, Vincristin, Methotrexat (MTX) sowie weiteren neueren Zytostatika wie Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Imatinib, Gefitinib) bestätigt (Cole et al. 1994, Zaman et al. 1994, Homolya et al. 2003, Toyoda et al. 2008, Tiwari et al. 2011).

Der MRP2-Transporter (neue Nomenklatur: ABCC2), auch als canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT1 oder cMRP) bezeichnet, wird hauptsächlich in der kanalikulären Membran von Hepatozyten, Dünndarm und in den proximalen Nierentubuli exprimiert (Mottino et al. 2001, Schaub et al. 1997). Des Weiteren konnte ein Nachweis in peripheren Nerven, Gallenblase, Plazenta und Lymphozyten gelingen (Kool et al. 1997, Rost et al. 2001). Die Substratspezifität des MRP2-Transportes ähnelt dem des MRP1 und ist für den Kotransport von unkonjugierten hydrophoben Komponenten in Anwesenheit von freiem Glutathion (GSH) verantwortlich (Oude et al. 1995, Yamazaki et al. 1996). MRP2 komplementiert als Transporter organischer Anionen durch die kanalikuläre Membran der Leber den Substratexport in das biliäre System, wobei das große Spektrum lipophiler Stoffe endogenen oder exogenen Ursprungs durch Konjugationsreaktionen modifiziert wird. Außerdem ist er für den Transport organischer Anionen sowie an Glucuronsäure oder Sulfat konjugierter Substrate zuständig und nimmt ebenfalls eine bedeutende Rolle in dem Arzneimitteltransport der Zelle ein (Nies und Keppler 2007, König et al. 1999a, Gottesmann et al. 2002, Jemal et al. 2009).

Der MRP2-Transporter ist für die biliäre Exkretion des glucuronidierten Bilirubins verantwortlich, so dass sich bei einem Defekt an dem humanen *MRP2*-Gen die Ausprägung des familiären Hyperbilirubinämiesyndroms Dubin-Johnson-Syndrom (DJS) zeigt. Es zeichnet sich durch das Auftreten einer konjugierten Hyperbilirubinämie mit pigmentösen Ablagerungen in Hepatozyten aus (Oude et al. 1995, Yamazaki et al. 1996, Nies und Keppler 2007, König et al. 1999a). Eine weitere Besonderheit des MRP2-Transporters besteht in

seiner sich ähnelnden Substratratspezifität zu MRP1, da beide für den Kotransport von unkonjugierten hydrophoben Komponenten in Anwesenheit von freiem Glutathion (GSH) verantwortlich sind (Oude et al. 1995, Yamazaki et al. 1996, Leslie et al. 2004).

Der MRP3-Transporter (neue Nomenklatur ABBC3; ältere Namen: MOAT-D, cMOAT-2) wird hauptsächlich in der Nebenniere, Nieren, Dünndarm, Dickdarm, Pankreas, Gallenblase sowie in geringerer Ausprägung in der Lunge, Milz und Magen exprimiert (Kool et al. 1997, Ortiz et al. 1999, Borst et al. 2006, Scheffler et al. 2002).

Der MRP3-Transporter ist für den Transport von organischen Anionen in der basolateralen Membrandomäne verantwortlich und in humanen und Ratten-Hepatozyten für den Efflux in die sinusoidale Blutbahn zuständig. MRP3 teilt mit MRP1 die höchste strukturelle Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz, differenziert sich jedoch stark in seiner Substratspezifität zu MRP2 (König et al. 1999b, Kool et al. 1999). So besitzt MRP3 eine geringe Substrataffinität für unkonjugierte hydrophobe Komponenten in Anwesenheit von freiem Glutathion (GSH). Eine erhöhte MRP3-Expression wurde in cholestatischen Leberzellen sowie bei Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom (DJS) berichtet, denen der für die biliäre Exkretion des glucuronidierten Bilirubins verantwortliche MRP2-Transporter in den kanalikulären Membranen der Leberzellen fehlt (Kubo et al. 2009, Ortiz et al. 1999, Hirohashi et al. 1998). Es wird vermutet, dass die Substratspezifität des MRP3-Transporters bei Störung der Gallensekretion oder Funktionsausfall des MRP2-Transporters den Efflux von organischen Anionen aus der Leber in das Blut sichert. Weiterhin wird MRP3 als eine alternative Möglichkeit angesehen, den Efflux von Gallensäuren und Glucuronide von cholestatischen Hepatozyten zu gewährleisten, ist aber kein Transporter, der sich am enterohepatischen Kreislauf von Gallensäuren beteiligt (Belinsky et al. 2005, Zeng et al. 2000).

Bezogen auf die verschiedenen Resistenzspektren erworbener Chemotherapie-Resistenzen konnte eine Korrelation zwischen MRP1, MRP2 und MRP3 festgestellt werden. Der MRP3-Transporter konnte für Etoposid und Methotrexat (MTX)-Resistenzen verantwortlich gemacht werden und es konnten erhöhte Expressionen in hepatozellulären Karzinomen, primären Ovarialkarzinomen und im Rahmen der Akuten lymphatischen Leukämie (ALL) bestimmt werden (Nies et al. 2001, Kool et al. 1999, Plasschaert et al. 2005). In MRP2-transfizierten Zellen konnten Resistenzen gegenüber Methotrexat, Etoposid, Doxorubicin, Epirubicin, Vincristin, Vinblastin sowie Mitoxantron und Cisplatin detektiert werden (Sodani et al. 2012, Hooijberg et al. 1999, Cui et al. 1999). Es ist bekannt, dass Cisplatin die Neigung besitzt, GSH-Komplexe in den Zellen zu bilden und als Konjugatsubstrat durch eine ATP-abhängige Glutathion-S-Konjugat-Pumpe aus der Zelle eliminiert zu werden (Sodani et al. 2012, et al.1994, Cui et al. 1999). Aufgrund der Kenntnis, dass Mrp den Transport von Glutathion-konjugiertem Cisplatin vermittelt, kann vermutet werden, dass Mrp des Hamsters in Arsen-resistenten V79-Zellklonen eine Rolle in dem Efflux von Arsen-Glutathion Komplexen und somit in der Ausprägung einer Arsen-Resistenz zukommen könnte.

1.5 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde in erster Linie der Resistenzmechanismus Arsen-resistenter V79-Zellen untersucht, wobei resistente Zellklone auf das Vorhandensein bzw. auf die Induktion einer Mrp1- bzw. Mrp2-mRNA-Expression geprüft wurden. Begleitend dazu wurde das genotoxische Potential von Arsenit mittels Mikrokern-Test sowie die Zytotoxizität mittels Neutralrot-Assay an den V79-Zellen und daraus selektierten Arsen-resistenten Klonen quantifiziert. Die V79-Zellen des Chinesischen Hamsters bieten sich als ein gutes Versuchsmodell bezüglich der Arsen-Resistenz da dieser entdifferenzierten, an, fibroblastoiden Zelllinie viele fremdstoffmetabolisierende Enzymsysteme fehlen (Fischer et al. 1985). Dies ist von besonderer Relevanz, da in diesem Fall der Einfluss des Aresnmetabolismus durch Methylierung als Einflussfaktor nicht zum Tragen kommen kann. Sie stellt somit eine Möglichkeit dar, einen Transporter gebundenen an Resistenzmechanismus zu untersuchen.

2 Material

2.1 Vorbehandlung und Sterilisation

Alle im Folgenden nicht gesondert aufgeführten Reagenzien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad bzw. als für die Zellkultur und Molekularbiologie geeignet von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen.

Alle Geräte zur RNA-Isolierung und Northern-Blot-Analyse wurden für 20 min in 50 mM NaOH-Lösung inkubiert, um eine eventuelle RNAse Kontamination zu eliminieren.

Hitzebeständige Lösungen, sowie hitzebeständige Glas- und Kunststoffmaterialien wurden durch einen 25-minütigen Autoklaviervorgang bei 121 °C sterilisiert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Die Porenweite (0,2 µm bzw. 0,45 µm) der Sterilfilter richtete sich dabei nach der Konsistenz der Lösungen.

Reagenzien für Puffer und Lösungen wurden den Erfordernissen entsprechend in bidestilliertem oder deionisiertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Zusammensetzung der erforderlichen Puffer wird im Zusammenhang mit der jeweils beschriebenen Methode erläutert.

2.2 Chemikalien und Enzyme

Agar Agarose Agarose LM Ampicillin β-Agarase Bromphenolblau BSA. Fraktion V **IPTG Complete Protease Inhibitor** Chloroform Cis-Platinum(II)diamine-Dichlorid (Cisplatin) Depex-Einschlussmittel Dextransulfat Dimethylarsonsäure (DMA^V) DNAse I **dNTPs**

Applichem (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Genaxis (Spechbach) Applichem (Darmstadt) Fermentas (St. Leon-Rot) Serva (Heidelberg) Paesel und Lorei (Frankfurt) Applichem (Darmstadt) Roche (Mannheim) Merck (Darmstadt) Sigma (Steinheim) Gurr (BDH, (England) Sigma (Steinheim) Sigma (Steinheim) Fermentas (St. Leon-Rot) Fermentas (St. Leon-Rot)

Dulbeccos MEM (1x)-Medium Entwickler G153 Essigsäure Ethanol Ethidiumbromid Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Expand Long Template System Foetales Kälberserum (FKS) Formaldehydlösung 37 % ig Formamidlösung Giemsalösung 5 % ig Guanidiniumthiocyanat Glycerin Hepes-Puffer Heringssperma-DNA 8-Hydroxychinolin 0,1 % Ionenaustauschharz Serdolit MB-1 Isoamylalkohol Isopropanol Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphoshat Kanamycin Methanol Mercaptoethanol 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) Natriumarsenitlösung 0,05 mol/l Natriumdodecylsulfat (SDS) Natriumchlorid Natriumhydroxid Natriumdihydrogenphosphat Natriumacetat Natriumcitratdihydrat N-Laurosylsarcosin Neutralrotstocklösung

Biochrom KG (Berlin) Agfa-Gevaert AG (Wiesbaden) Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Roche (Mannheim) **Biochrom KG (Berlin)** Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Gurr (BDH, (England) Merck (Darmstadt) Sigma (Steinheim) Sigma (Steinheim) Roche (Mannheim) Aldrich (Steinheim) Serva (Heidelberg) Applichem (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Applichem (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Sigma (Steinheim) Merck (Darmstadt) Sigma (Steinheim) Invitrogen (Karlsruhe)

Penicillin/Streptomycin, A2213	Biochrom KG (Berlin)
Phenol wassergesättigt	Roth GmbH (Karlsruhe)
Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (PBS)	Biochrom KG (Berlin)
[γ- ³² P]-dATP (Aktivität in 222 TBq/mmol)	PerkinElmer (Wellesley, (USA)
Polyvinylpyrrolidon	Sigma (Steinheim)
Rinderinsulin	Sigma (Steinheim)
Schnellfixierer G354	Agfa-Gevaert (Wiesbaden)
SDS	Sigma (Steinheim)
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Trinatriumcitrat	Merck (Darmstadt)
Tris-Base	Merck (Darmstadt)
Trypton	Applichem (Darmstadt)
Trypsin-EDTA	Biochrom KG (Berlin)
X-Gal	Applichem (Darmstadt)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Verbrauchsmaterialien, wurden von den Firmen Krannich und Schütt (Göttingen), Nunc (Kamstrup, Dänemark), Greiner (Nürtingen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Elektroporationsküvetten, 2 mm Eppendorf UVetten 50–1000 µl Falcon-Röhrchen 15 ml Filterpapier: fein (2043) und grob (2668) Filterkatuschen Sartolab-P-plus (0,2 µm) Glasobjektträger Glassammelkolben Halb-Mikro-Küvette (1,6 ml) Hybridisierungs-Glasröhrchen 15 x 3,5 cm Hyperfilm-ECL Hyperfilm-MP Imaging Plates 2040 (³²P-sensitiv) Kanülen Kryoröhrchen 1.8 ml Kulturschalen. 56.7 cm^2 , 21.9 cm^2 , 8.8 cm^2 Kunststoffpipetten 1 ml, 2 ml, 10 ml

Peqlab (Erlangen) Eppendorf (Hamburg) **BD** Biosciences (Heidelberg) Schleicher & Schüll (Dassel) Sartorius AG (Göttingen) Knittel-Gläser (Braunschweig) Schott (Mainz-Hofheim) Sarstedt (Nümbrecht) Biometra (Göttingen) Amersham (Braunschweig) Amersham (Braunschweig) Raytest (Straubenhardt) Braun (Heidelberg) Nunc (Wiesbaden) Nunc (Wiesbaden) Greiner (Nürtingen)

Labortücher Kimwipes Lite 200 (20×21 cm)
Nylomemran Hybond-N TM (0,45 μ m)
Multiwellplatte Nunclon TM Surface
Papierfaltenfilter (240mm)
Pasteurglaspipetten (230 mm)
PCR tubes 0,2 ml
Plexiglasschale
Pipettierhilfen Typ Varipette 4810
Pipettenspitzen
Polaroid DS-34 mit Orangefilter
Polaroid-667-Filme
PP-Rörchen: 13 ml, 50 ml
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 13 ml
Polystyrol-Gewebekulturflaschen (75 cm ² , 25 cm ²)
Polystyrol-Gewebekulturschalen (78,54 cm ² , 28,27 cm ²)
PVDF-Membran Immobilon-P (0,45 µm)
Quarz-Küvetten (1 ml)
Schwarzweiss-Filme Agfapan 100 ASA
Sephadex Micro Spin Säulen G-25
Silicon-Hochvakuumfett
Spitzen Gel Saver II
Spritzenvorsatzfilter 0.2 μ m und 0.45 μ m
Spritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml
Vakuumfilter 125 ml, 0.2 μ m und 0.45 μ m
Zentrifugenröhrchen 10 ml
Zentrifugenröhrchen 50 ml Dicke Röhrchen Zellkuktur

2.4 Geräte

Autoklav-Dampfsterilisator, Modell 3850 ML Auswertesoftware Bas-Reader2.9, TINA 2.0 Begasungsbrutschrank "Function Line" Typ BB16 Bio-Imazing-Analyzer BAS 1500 Biophotometer 6313 CCD-Kamera Modell DXC-930 P Tuttnauer (Wettenberg) Fujix (Tokio) Heraeus (Hanau) Raytest (Straubenhardt) Eppendorf (Hamburg) Sony (Japan)

Kimberly-Clark (Germany)

Amersham (Braunschweig)

Nunc Products (Wiesbaden)

Schleicher & Schüll (Dassel)

Rudolph Brand (Wertheim)

Abigene (Epsom, (GB)

Schott (Mainz-Hofheim)

Eppendorf (Hamburg)

Eppendorf (Hamburg)

Sigma (Deisenhofen)

Sigma (Deisenhofen)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sarstedt (Nümbrecht)

Millipore (Eschborn)

Agfa (Leverkusen)

Braun (Heidelberg)

Hellma, Krannich (Göttingen)

Pharmacia Biotech (Freiburg)

Gerlinde Kisker (Mühlhausen)

Schleicher und Schüll (Dassel)

Schleicher und Schüll (Dassel)

NuncGmbH (Wiesbaden)

Sarstedt (Nümbrecht)

Kranich GmbH (Göttingen)

C200-Inkubator
Elektrophoresekammer m. Zubehör
Elektroporator-Gene Pulser II
Eismaschine
Feinwaage
Flächendetektor (β/γ) LB122
Fluoreszenzmikroskop Typ HBO 50
Gelkammer Horizon 11-14
Heizplatte Typ HT 01
Hybridisierungsofen Hybaid
Imaging-Plates, 2040 (³² P-sensitiv), Fujix-Kassetten
Invertoskop ID 02
Kamera.Polaroid DS-34
Kühlschränke (-20°, 4° C)
Kühlschrank (-70° C) Typ 6485
Kühlzentrifuge-5810R mit Ausschwingrotor
Labofuge GL
Magnetrührer Typ KMO 2
Megafuge 1 OR mit Rotor 660 (Radius: 25,5 cm)
Mikroskop Typ Axioplan
Monitor LB 1210 D
Multiwellpattenschüttler Tetramax 100
Netzteil PHero-Stab 330
Perfusionspumpe-Masterflex 7013.21
pH-Meter Typ CG 822
Schlauchpumpe
Schüttler Vibramax 100
Schüttler GFL 1083 (Wasserbad)
Software-Staden Package
Software-Chromas
Software-ClustalW
Software-DNA Sequencing Analysis
Spannungsgerät Typ 3231
Spectralphotometer MR 700 Microplate Reader

Labotect (Göttingen) Kriegm.&Jansen (Grossenaspe) Bio-Rad Lab.GmbH (München) Ziegra (Isernhagen) Sartorius (Göttingen) Berthold (Pforzheim) Zeiss (Oberkochen) Biometra (Göttingen) Kranich GmbH (Göttingen) Biometra (Göttingen) Fujix (Tokio) Zeiss (Oberkochen) Sigma (Deisenhofen) SchüttLabortechnik (Göttingen) SchüttLabortechnik (Göttingen) Eppendorf (Hamburg) Heraeus (Hanau) Jahnke&Kunkel (Staufen i. Br.) Heraeus (Hanau) Zeiss (Oberkochen) Berthold (Wildbad) Heidolph (Kehlheim) Biotech-Fischer (Reiskirchen) Cole-Parmer (Chicago, (USA) Schott (Mainz-Hofheim) SchüttLabortechnik (Göttingen) Heidolph (Kehlheim) SchüttLabortechnik (Göttingen) ABI (Darmstadt) ABI (Darmstadt) ABI (Darmstadt) ABI (Darmstadt) Statron GmbH (Fürstenwalde) Dynat.Laboratories (England)

Sterilbank "Lamin-Air" LFM 2448 S	Heraeus (Hanau)
Sicherheitsbrenner Gasi	SchüttLabortechnik (Göttingen)
Sterilbank-SterilGard III Advance	Labotect (Göttingen)
Sterilfiltrations-Schlauchpumpe PML 1305-ND100	Sartorius (Göttingen)
Thermocycler-Gradient Mastercycler	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler-Thermoblock UNO	Biometra (Göttingen)
Trockeninkubator MIR-153	Sanyo (Krannich)
UV-Durchlichttisch TI2	Biometra (Göttingen)
UV-Crosslinker Bio-Link	Biometra (Göttingen)
UV-Tisch Modell 302 NM-906: 302 nm	Intas (Göttingen)
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Vakuumzentrifuge mit Membranvakuumpumpe	Vaccubrand (Wertheim)
Verikal-Autoklav: FV	Technorama (Fernwald)
Vortex Mixer Typ G-560 E	Scientific industries (USA)
Wasserstrahl-Vakuumpumpe	SchüttLabortechnik (Göttingen)
Wasserbad Type 1004	Ges.f.Labortechn. (Burgwedel)
Zentrifuge Typ 2K 15	Sigma GmbH (Osterode)
Zählkammer nach Neubauer	Rudolph Brand (Wertheim)

2.5 Gase

Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂)

2.6 Zell-Linien

Die V79 Zell-Linie wurde der Abteilung Allgemeine Hygiene und Umweltmedizin der Universität Göttingen freundlicherweise von Herrn Dr. J. Hengstler aus der Abteilung Toxikologie der Universität zu Mainz bereitgestellt.

Messer-Griesheim (Düsseldorf)

2.7 Kits

One-Step RT-PCR Kit	Invitrogen/Gibco	BRL	Life
	Technologies (Karl	sruhe)	
TOPO-XL Cloning Kit	Invitrogen/Gibco	BRL	Life
	Technologies (Kar	lsruhe)	
TOP 10 Electrocompetent cells	Invitrogen/Gibco	BRL	Life
	Technologies (Karlsruhe)		

2.8 Bakterien

Es wurde mit folgenden Escherichia-coli-Stämmen gearbeitet: TOP10 Invitrogen/Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe) 2.9 Vektoren Es wurde folgender Vektor verwendet: pCR®-XL-TOPO Invitrogen/Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe) 2.10 Molekulargewichtstandards DNA-Längenstandard 1kb leiter 1µg/µl (0,12-12,2 kb) Invitrogen/Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurde mit V79-Zellen sowie mit Arsen-resistenten Klonen dieser Zell-Linie gearbeitet. Sie entstammt der Lunge des Chinesischen Hamsters. Dieser entdifferenzierten, fibroblastoiden Zell-Linie fehlen viele fremdstoffmetabolisierende Enzymsysteme, wie die Monooxygenasen des Zytochrom-P-450-Systems, UDP-Glucuronyltransferasen und Phenolsulfotransferasen (Fischer et al. 1985). Sie besitzt ein schnelles Wachstum und die Teilungszeit beträgt 12 h.

3.1.1 Puffer und Lösungen

Antibiotika-Stammlösung (Biochrom KG):

10.000 U Penicillin

10.000 μ g / ml Streptomycin

Fetales Kälberserum (FKS Biochrom KG):

Die Lösung wurde 30 min auf 56° C erhitzt und anschließend aliquotiert.

Kulturmedium: DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium 1×):

Flüssiges Grundmedium:

+ D-Glucose	1 g / l
+ NaHCO ₃	3,7 g/l
+ N-Acetyl-L-Alanyl-L- Glutamin	1,0289 g / l
komplettiert mit:	
FKS	10 %
Penicillin	100 IE / ml
Streptomycin	100 µg / ml

Das fertig hergestellte flüssige Grundmedium wurde von der Firma Boehringer bezogen.

PBS (Phosphatgepuffe	erte Salzlösung nach Dulb	ecco (w/o):
	-	
N ₂ C1	127.0	0 -

NaCl	137,0 mM	8 g
NaH ₂ PO ₄	6,5 mM	1,44 g
KCl	2,7 mM	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,2 g
Aqua bidest.		ad 1 l
		pH-Wert 7,0

Trypsin / EDTA 0,05 % (w / v) / 0,02 % (w / v):

NaCl	137,0 mM	8 g/l
NaH ₂ PO ₄	6,5 mM	1,44 g/l
KCl	6,5 mM	2,35 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,2 g/l
Na ₂ -EDTA	0,02 %	0,43 g/l
Trypsin	0,05 %	0,86 g/l

4 mM Arsenit-Stammlösung:

Dauerexposition der V79-Zellen während der Kulturhaltung: 10 μ M NaAsO₂

50 mM Stammlösung	1 ml
Aqua bidest.	11,5 ml

Die 4 mM Lösung wurde in der Zellkultur für eine konstante Arsen-Exposition von 10 μ M verwendet.

JO IIIM DIMENIYIAISOIISaule-Stammosulig (DMA)	50 mM Dimeth	ylarsonsäure-	Stammlösung	(DMA ^V	′):
---	--------------	---------------	-------------	-------------------	-----

Dauerexposition der V79-Zellen während der Kulturhaltung: 10 µM C₂H₆AsO₂Na

$C_2H_6AsO_2Na$	50 mM	40 mg
Aqua bidest.		5 ml

3.1.2 Stammhaltung und Kultur von V79-Zellen

Die V79-Zellklone wurden in flüssigem Stickstoff in 2 ml Gefrierröhrchen in 1,5 ml Portionen mit 20 % FKS und 10 % DMSO gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Kulturmedium vereinigt und 5 min bei 4° C und $200 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml Kulturmedium mit 10 % FKS und 1 % Antibiotika-Stammlösung (s. 3.1.1.) resuspendiert.

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen (75 cm²) mit 20 ml Kulturmedium ausplattiert. Alle 4 Tage wurde ein Medienwechsel vorgenommen, bei dem jeweils 50 μ l der 4 mM NaAsO₂-Lösung zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte in Begasungsbrutschränken bei 5 % CO₂ und 37° C.

Sobald der Flaschenboden zu 75 % konfluent bewachsen war, wurde das Medium abgesaugt und die Kultur mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml 0,05 % (w/v) Trypsin / 0,02 % (w/v) EDTA (s. 3.1.1.) und 5-minütiger Inkubation im Brutschrank liessen die Zellen sich durch seitliches Klopfen an der Kulturflasche lösen. Die Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium mit 10 % FKS und 1 % Antibiotika-Stammlösung aufgenommen und entweder in 1-2 Kulturflaschen weiterkultiviert oder für die RNA-Isolierung, den Mikrokerntest, bzw. den Neutralrot-Assay ausplattiert. Für die RNA-Isolierung (s. 3.2.2.) wurden 100 µl der Zellsuspension in Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm (78,54 cm^2 Grundfläche) mit 10 ml Kulturmedium ausplattiert. Für den Mikrokerntest wurden die Zellen 2×10^{6} quantifiziert und jeweils Zellen in Neubauer-Zählkammer in einer Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm (28,27 cm² Grundfläche) mit 5 ml Kulturmedium ausplattiert. Für die Vorbereitung des Neutralrot-Assays (s. 3.13.2.) wurde die Zellzahl ebenfalls quantifiziert. Anschließend wurden die 96-Multi-Well-Platten mit 10^4 Zellen und 100 µl Kulturmedium beschickt.

3.1.3 Klonierung von Arsen-resistenten V79-Zellen

Unter Klonierung versteht man eine Methode, die es erlaubt, eine Zellpopulation aus einer einzigen Ursprungszelle zu erhalten. Es wurden 5 Arsen-resistente Klone von der etablierten Fibroblasten-Zell-Linie V79, die durch eine 8-wöchige Langzeitinkubation mit 10 μ M NaAsO₂ wie in Wang Z et al. (1996) beschrieben vorbehandelt worden war, herangezüchtet, wobei die Klonierung mit Hilfe von Raschik-Klonierringen vorgenommen wurde. Die Klonierung wurde freundlicherweise von den Mitarbeiterinnen Frau Susanne Luthin und Frau Petra Birkenkamp aus der Abteilung Allgemeine Hygiene und Umweltmedizin des Zentrums Umwelt und Arbeitsmedizin durchgeführt. Die erhaltenen Klone wurden mittels Neutralrot-Assay (s. 3.13.2.) auf eine erhöhte Toleranz gegenüber Arsen geprüft.

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen (75 cm²) mit 20 ml Kulturmedium ausplattiert. Alle 4 Tage wurde ein Medienwechsel vorgenommen, bei dem jeweils 50 µl der 4 mM NaAsO₂-Lösung (s. 3.1.1.) zugeführt wurde; somit lag eine konstante Arsen-Exposition von 10 µM vor. Diese Inkubation erfolgte über 8 Wochen vor der Klonierung in Begasungsbrutschränken bei 5 % CO₂ und 37° C. Anschließend wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:5 auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm (78,54 cm² Grundfläche) mit 10 ml Kulturmedium und 25 µl der 4 mM NaAsO₂-Lösung ausplattiert. Nach 24-stündiger Arsenit-Exposition mit 10 µM wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1 ml PBS-Puffer (s. 3.1.1.) gewaschen, und die resistenten Kolonien wurden mit einem Filzstift auf der Unterseite der Platte markiert. Dabei musste die zur Klonierung vorgesehende Kolonie klar abgegrenzt sein und einen Durchmesser von etwa 5 mm besitzen. Mit einer sterilen Pinzette wurde ein Klonierring in Siliconfett gedrückt, wobei das Fett durch seitliches Verschieben über die gesamte Auflagefläche des Ringes zu verteilen war. Die Ringe wurden aus Polyethylen-Röhrchen gefertigt, die einen Durchmesser von 5-10 mm besitzen. Die Röhrchen wurden in kleine Stücke von etwa 10 mm Länge geschnitten, wobei darauf zu achten war, dass die Schnittkanten so gerade wie möglich waren. Die Ringe wurde anschließend über die ausgewählten Kolonien gestülpt. Nach Zugabe von 400 µl 0,05 % (w/v) Trypsin / 0,02 % (w/v) EDTA (s. 3.1.1.) in das Ringvolumen wurde die Trypsin-Lösung nach einer Inkubation von 20 s wieder abpipettiert. Die Kulturschale wurde geschlossen und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach folgte eine Zugabe von 400 µl Kulturmedium in den Klonierring. Durch Auf- und Abpipettieren des Mediums wurden die Klone dispergiert und in 1 ml Kulturmedium in eine oberflächenbehandelte Gewebekulturflasche (25 cm² Grundfläche) ausplattiert. Die Zellklone wurden in aufrechtstehenden Gewebekulturflaschen in Begasungsbrutschränken inkubiert. Das Medium wurde alle 4 Tage gewechselt und mit 2,5 µl der Arsen-Stammlösung (s. 3.1.1.) supplementiert, so dass eine Arsen-Konzentration von 10 µM vorlag. Sobald die Gewebekulturflasche zu 75 % konfluent bewachsen war, erfolgte die weitere Kultivierung in 5 ml Kulturmedium mit 12,5-µl der Arsenstammlösung in liegender Kulturflaschenposition. Bei einer abermaligen Konfluenz von 75 % wurden die Zellen in oberflächenbehandelte Gewebekulturflaschen (75 cm²) mit 20 ml Kulturmedium ausplattiert. Alle 4 Tage wurde ein Medienwechsel vorgenommen, bei dem jeweils 50 µl der 4 mM Arsen-Stammlösung zugesetzt wurden. Die Zellen wurden in 1-2 Kulturflaschen weiterkultiviert und nach 6-wöchiger Kultivierung für die RNA-Isolierung (s. 3.2.2), den Mikrokerntest (s. 3.12.2) bzw. den Neutralrot-Assay (s. 3.13.2.) ausplattiert. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte wie unter 3.1.2. beschrieben.

3.1.4 Kultivierung von DMA^V-resistenten V79-Zellen

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, in Gewebekulturflaschen (75 cm²) mit 20 ml Kulturmedium ausplattiert. Alle 4 Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, bei dem jeweils 50 µl einer 4 mM Dimethylarsonsäure-Lösung (s. 3.1.1.) zugeführt wurde, somit lag eine konstante DMA-Exposition von 10 µM vor. Die Inkubation erfolgte für 4 Wochen in Begasungsbrutschränken bei 5 % CO₂ und 37° C. Im Rahmen der Vorbereitung auf Experimente zur Überprüfung der mRNA Expression wurden 100 µl der Zellsuspension in Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm (78,45 cm²) mit 10 ml Kulturmedium ausplattiert. Hier wurden jeweils 25 µl einer 4 mMDimethylarsonsäure-Lösung zugesetzt, um eine konstante DMA-Exposition von 10 µM zu erreichen. Bei einer Konfluenz von 75 % erfolgte die Isolierung von RNA in einer kombinierten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (s. 3.2.2.).

3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten V79-Zellen und daraus selektierten Klonen

3.2.1 Puffer und Lösungen

Aufschlusspuffer: GTC-Lösung:

Guanidiniumthiocyanat	4 M	48,2 g
1 M Trinatriumcitrat	25 mM	2,5 ml
N-Lauroylsarcosin	16,5 mM	0,5 g
(Sarcosyl bzw. N-Dodecanoyl-N- methylglycin, Na-Salz)		
ß-Mercaptoethanol	0,1 M	
Aqua bidest.		ad 100 ml
		pH-Wert 7,5

GTC, N-Lauroylsarcosin und Trinatriumcitrat wurden bei 50 °C gelöst und sterilfiltriert. Diese Lösung konnte bei 4 °C bis zu drei Monaten gelagert werden. Vor Gebrauch wurde der Lösung 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol zugesetzt.

98 % Mercaptoethanol 0,1 M 0,7 ml

2 M Natriumacetat-Losung, (pH-wert 4,0):			
Na-Acetat	2 M	82 g	
Aqua bidest.		ad 250 ml	

Das Salz wurde in 250 ml Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit ca. 200 ml 37 % Essigsäure eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt. Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform	49 Volumenanteile	49 ml
Isoamylalkohol	1 Volumenanteil	1 ml

Die Lösung wurde bei 4° C aufbewahrt.

Wassergesättigtes Phenol (pH-Wert 4,3):

Die Lösung wurde gebrauchsfertig von der Firma Biometra (Göttingen) erworben und bei 4°C gelagert.

70 % Ethanol:

Ethanol	70 ml
Aqua bidest.	30 ml

Der Ethanol wurde bei 4° C gelagert.

3.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Isolierung von RNA wurden pro Parameter 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen (ein bis zwei 10 cm-Kulturschalen) eingesetzt. Die kultivierten in flüssigem und Stickstoff schockgefrorenen Zellen wurden mit einem Gummiwischer in 3 x 1 ml Guanidiniumthiocyanat (GTC)-Lösung von den Kulturplatten geschabt und das erhaltene Zellysat in sterile 13 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden 0,3 ml Natriumacetat-Lösung (2 M; pH-Wert 4,0), 3 ml Phenol (wassergesättigt; pH-Wert 4,3) und 0,6 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und die Ansätze kräftig geschüttelt. Die Ansätze wurden bis zur Phasentrennung (etwa 10 min) auf Eis stehengelassen und anschließend für 20 min bei 7740 x g und 4 °C in einem JA 20 Festwinkelrotor zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde vorsichtig abgenommen, in ein weiteres steriles Röhrchen überführt und zur Fällung der RNA mit 3 ml Isopropanol versetzt. Die Ansätze wurden dann für mindestens 3 h bei –20 °C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 x g für 30 min wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Sediment in 1,5 ml GTC-Lösung resuspendiert. Die erhaltene Lösung wurde mit 2 ml Isopropanol versetzt und für mindestens 3 h bei –20 °C gefällt. Die Ansätze wurden erneut für 30 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Sedimente mit 2 x 1 ml 70 %-igem Ethanol gespült, um Salze herauszulösen. Schliesslich wurde die RNA in 20–40 µl autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurde in einem Biophotometer (Eppendorf) vorgenommen. Die Extinktionswerte wurden bei 230 nm, 260 nm 280 nm und 320 nm gemessen und die Quotienten $OD_{260/280}$ und $OD_{260/230}$ ermittelt. Eine Extinktion (OD) von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl bzw. einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Auf Grundlage dieser Definitionen wurden die Konzentrationen der jeweiligen Nukleinsäure errechnet. Die Quotienten $OD_{260/280}$ und $OD_{260/230}$ sind ein Maß für die Protein- bzw. Salzkontamination (ODMA (V)_x für Proteine bei 280 nm) und sollten >1,8 und ≤ 2,0 betragen.

Die mit dieser Methode isolierte RNA wurde für die Übertragung auf Nylon-Membranen ("Northern Blot") und für die RT-PCR eingesetzt (s. 3.7.5.).

3.3 Analytische Agarosegelelektrophorese von RNA

Entsprechend ihrer Größe können Nukleinsäuren in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist dabei dem Logarithmus ihrer relativen Molekülmasse umgekehrt proportional.

Die Auftrennung von rRNA und mRNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontalen Agarosegelen. Der Transfer auf eine Nylonmembran und die dortige Immobilisierung führt nur unter denaturierenden Bedingungen zu einem scharfen Bandenmuster. Die Denaturierung von RNA-Proben erfolgte im vorliegenden System aufgrund von Erhitzung in Anwesenheit von Formamid und durch deren Auftrennung in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel. Anschließend wurden die aufgetrennten RNA-Transkripte auf einer Nylonmembran immobilisiert und mittels Hybridisierung mit genspezifischen ³²P-markierten Sonden und anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.3.1 Puffer und Lösungen

MOPS (10-fach):

MOPS	200 mM	41,9 g
Natriumacetat	50 mM	4,1 g
EDTA	10 mM	3,7 g
Aqua bidest.		ad 1 1
		pH-Wert 7,4

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

SSC	(20-fach):	
		-

NaCl	3 M	175,32 g
Natriumcitratdihydrat	0,3 M	88,23 g
Aqua bidest.		ad 1 1

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Ethidiumbromid-Stammlösung:		
Ethidiumbromid	10 mg/ml	1 g
Aqua bidest.		ad 100 ml

Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Deionisiertes Formamid:

Zur Deionisierung von Formamid wurden 50 ml Formamid unter sterilen Bedingungen für 30 min mit 5 g Serdolit MB-1-Ionenaustauscherharz gerührt und anschließend das Austauscherharz durch einen Faltenfilter abfiltriert. Die Lösung wurde aliquotiert und wurde bei -20 °C gelagert. Der fertige Probenpuffer konnte etwa 2-3 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

Formamid-Mix:

deionisiertes Formamid	16,5 M	750 µl
MOPS (10-fach)	13,2 % (v/v)	150 µl
37 % Formaldehyd	2,7 M	240 µl

Das Formaldehyd war sterilfiltriert. Der Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Blaupuffer-Stocklösung:

Glycerin	50 %	5 ml
0,5 M EDTA	0,01 M	5 ml
Bromphenolblau	0,45 % (w/v)	40 mg
Aqua bidest.		ad 10 ml

Glycerin und EDTA wurden in Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Brom-Phenolblau wurde hinzugefügt, der Puffer aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

Probenpuffer:

Formamid-Mix	250 Teile	2 ml
Blaupuffer-Stocklöung	50 Teile	0,4 ml
Ethidiumbromid-Stammlösung	1 Teil	8 µl

Der angefertige Probenpuffer konnte 2-3 Wochen bei 4° C aufbewahrt werden.

3.3.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Analyse von RNA

Um die Elektrophoresekammer und den Gelträger mit den Taschenformern von RNasen zu reinigen, wurden diese für mindestens 30 min in 50 mM NaOH gestellt. Anschließend wurden sie mit sterilem Aqua bidest. abgespült.

1,0 g Agarose wurden in 90 ml 3-*N*-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Puffer (1×) aufgekocht (s. 3.3.1.) und gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50° C wurden 10 ml einer 37 %-igen Formaldehydlösung zugesetzt (Endkonzentration: 3,7 %) und das horizontale Gel (14 ×11 × 0,5 cm) nach dem Einsetzten der Kämme gegossen. Das Gel wurde möglichst blasenfrei in den vorbereiteten Gelträger gegossen und war nach 30 min fest. Es wurde in die Elektrophoresekammer überführt und mit Elektrophoresepuffer (MOPS)-Puffer (1×) überschichtet. Das Formaldehyd im Gel und im Auftragspuffer führt zur Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur, wodurch die Laufeigenschaften im Gel verbessert werden (Lehrbach et al. 1977, McMaster und Carmichael 1977). Nach Entfernung der Gelkämme wurden die Probentaschen mit 2 µl Probenpuffer (s. 3.3.1.) beladen, um die Dichtigkeit der Taschen zu prüfen.

Die RNA-haltigen Lösungen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Pro Bahn wurden 20 μ g Gesamt-RNA eingesetzt und mit Aqua bidest. auf ein einheitliches Volumen gebracht. Anschließend wurden jeder Probe 20 μ l Probenpuffer zugesetzt, die Ansätze bei 65 °C für 10 min denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Der verwendete Probenpuffer setzte sich aus Blaupuffer, Formamid-Mix und Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) in Volumenanteilen 50:250:1 zusammen (s. 3.3.1.).

Zum Einlaufen der RNA-Proben ins Gel wurde nach dem Auftragen für ca. 20-30 min eine konstante Stromstärke von 12 mA angelegt. Die weitere elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte für 3-4 h bei einer konstanten Stromstärke von 40-45 mA unter Umwälzung des Elektrophoresepuffers. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die gleichmässige Beladung der Gele mittels UV-Durchlicht geprüft und photographisch dokumentiert. Das im Probenpuffer enthaltene Ethidiumbromid ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, mit dem Nukleinsäuren im UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht werden können.

3.4 Transfer von RNA auf Nylonmembranen

Der Transfer der RNA aus dem Agarosegel auf Nylonmembranen erfolgte in Anlehnung an die von Southern (1975) beschriebene Kapillartransfer-Methode. Die durch die Elektrophorese aufgetrennten RNA-Fragmente (s. 3.3.2) wurden durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran übertragen ("Northern Blot").

Die verwendete Nylonmembran (Porengrösse 0,45 µm) wurde vor dem Transfer in sterilem Aqua bidest. benetzt und wie auch die Filterpapiere in 5x SSC (Standard-Natrium-Citrat-Puffer) (s. 3.3.1.) äquilibriert. Ein als Pufferbrücke dienendes dickes Filterpapier (Nr. 2668) wurde so auf einer erhöhten Glasplatte platziert, dass beide Enden gleichmässig in das darunterliegende mit 20x SSC gefüllte Pufferreservoir ragten. Auf der Pufferbrücke wurden von unten nach oben ein dickes Filterpapier, ein dünnes Filterpapier (Nr. 2043), das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten zeigend, die Nylonmembran, ein dünnes Filterpapier und wieder ein dickes Filterpapier luftblasenfrei platziert. Das Pufferreservoir und die Sandwichkanten wurden mit Parafilm abgedichtet. Der Aufbau wurde anschließend mit einer Lage von 15-20 cm saugfähigen Papiertüchern überschichtet und mit ca. 5 kg beschwert. Die Transferzeit betrug 16-24 h.

Im Anschluss an den Transfer wurde jede Seite der Nylonmembran für 3 min mit UV-Licht der Wellenlänge λ =254 nm bestrahlt, um die RNA stabil zu fixieren. Die Vollständigkeit des Transfers wurde durch Auflegen des Gels und der Nylonmembran auf den UV-Tisch überprüft und photographisch dokumentiert. Die Membran wurde vor dem Trocknen bzw. der direkten Prähybridisierung zweimal in 95°C heißer 0,05 % iger SDS-Lösung sowie 1-2 mal in heißem Aqua bidest. gewaschen, um Bromphenolblau, Ethidiumbromid und Salze zu entfernen.

3.5 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten V79-Zellen

3.5.1 Puffer und Lösungen

TRIzol®Reagent (Total RNA Isolation Reagent):

Die fertig hergestellte Lösung wurde von der Firma Gibco Life Technologies bezogen, wurde bei 4°C aufbewahrt und sollte innerhalb von 12 Monaten aufgebraucht werden.

0,1 M Na-Citrat-Lösung in 10 % Ethanol:

Trinatriumcitrat	0,1 M	0,2943 g
Ethanol 10 %ig		100 ml

Die Lösung sollte bei Raumtemperatur gelagert werden.

The pes I differ (beroffied) 0,1 ki, pit were 0,1.
--

HEPES	0,1 M	2,383 g
Aqua bidest.		100 ml

Der pH-Wert wurde auf 8,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

75 % Ethanol:Ethanol100 %Aqua bidest.25 ml

3.5.2 Isolierung von genomischer DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Die genomische DNA wurde mit Hilfe des TRIzol®-Reagenz (s. 3.5.1.) aus nicht Arsenresistenten Zellen (V79), den Klonen K6 und K9 isoliert. Die Kulturschalen (10 cm Durchmesser) wurden bei einer Konfluenz von 75 % dreimal mit je 1 ml PBS (s. 3.1.1.) gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die nicht mehr eingefrorenen kultivierten V79-Zellen wurden je mit 1 ml TRIzol®-Reagenz und Gummiwischern von den Kulturplatten geschabt. Die Zellen von einer Kulturschale wurden in ein 2 ml Eppendorfröhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. Anschließend wurde jeweils 1 ml Chloroform zugesetzt und die Proben für 15 s kräftig mit der Hand geschüttelt. Danach erfolgte abermals eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 4° C und $12.000 \times g$ zentrifugiert. Nach der Zentrifugation zeigte sich eine obere farblose wässrige Phase, in der sich die RNA befand, sowie eine Interphase und eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, in denen die DNA und Proteine enthalten waren. Die obere wässrige Phase wurde sorgfältig über der Interphase abgehoben und verworfen. Anschließend konnte mit der Isolation der DNA aus der Interphase begonnen werden. Den Proben wurden jeweils 0,3 ml 100 % igem Ethanol zugeführt und anschließend gemischt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und eine anschließende Zentrifugation von 5 min bei 4° C und 2.000 \times g. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und das Pellet mit 1 ml 0,1 M Natriumcitratdihydrat-Lösung (s. 3.5.1.) resuspendiert. und für 30 min bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Mischen inkubiert. Die Proben wurden 5 min bei 4° C und $2.000 \times g$ zentrifugiert und der Waschvorgang mit der 0.1 M Natriumcitratdihydrat-Lösung wiederholt. Das Sediment wurde in 1,5 ml 75 %igem Ethanol

(s. 3.5.1.) resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Mischen inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem Vakuum-Exsikkator getrocknet, anschließend folgte eine Resuspension des Pellets in100 μ l 8 mM NaOH-Lösung und 6,6 μ l 0,1 M Hepes-Lösung (s. 3.5.1.). Durch die Zentrifugation von 15 min bei 4° C und 12.000 × *g* wurde das unlösliche Material am Boden des Röhrchens sichtbar und konnte durch Überführung des Überstandes in ein neues Röhrchen entfernt werden. Die erhaltene Lösung wurde bei 4° C gelagert.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der Probe (Verdünnung 1:100 in Aqua bidest) bei 260 nm gemessen.

3.6 Analytische Agarosegelelektrophorese von DNA

3.6.1 Puffer und Lösungen

TBE-Puffer 10x (pH-Wert 8,3):

Borsäure	1 M
Tris-HCl	1 M
EDTA	200 mM

Tris-Acetat-Puffer 10x (pH-Wert 7,2):

Tris	400 mM
Natriumacetat	200 mM
EDTA	10 mM

DNA-Auftragspuffer (6x):

10xTris-Acetat-Puffer	60 % (v/v)
(pH-Wert 7,2)	
Glycerin	30 % (v/v)
Bromphenolblau	0.15 % (w/v)
Xylencyanol	0.15 % (w/v)
Aqua bidest.	10 % (v/v)

3.6.2 Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA

Mit dieser Methode wurden analytische DNA-Mengen (1 μ g) nach PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdau und präparative DNA-Mengen (10 μ g) zum Zweck der cDNA-*insert* Isolierung aufgetrennt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0.7–2% ige Agarosegele in 1x TBE-Puffer hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Agarosemenge in der Hälfte des benötigten Puffers durch Erhitzen bis zur Siedetemperatur gelöst und nach Abkühlen mit dem verbleibenden Puffer und 5 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Dieser Gelmix wurde zur Polymerisation zügig und blasenfrei in den Gelträger (14 x 11 x 0.7 cm) gegossen. Nach 30-60 min bei RT konnte das Gel benutzt werden. In der Gelkammer wurde es mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 5-10 μ l Auftragspuffer vermischt, aufgetragen und bei 45–100 mA getrennt. Auf einem UV-Durchlichttisch (302 nm) konnten die durch Interkalation von Ethidiumbromid sichtbar gemachten DNA-Banden fotografisch dokumentiert und ggf. mit dem Skalpell isoliert werden. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit 1 kb DNA-Längenstandardmischung.

3.7 Amplifikation von Hamster Mrp1- und Mrp2- cDNA bzw. Gen Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die cDNA bzw. mRNA Sequenzen der Mrp1- und Mrp2-Transporter des Chinesischen Hamsters waren zu Beginn der experimentellen Arbeit an dieser Dissertation nicht bekannt. Um eine Grundlage für die Entwicklung von Sonden zum Nachweis von Mrp1- bzw. Mrp2mRNA des Chinesischen Hamsters zu erschließen, wurden Fragmente von entsprechender cDNA isoliert, kloniert und sequenziert. Sonden, die später zum Nachweis einer Mrp1- oder Mrp2-mRNA-Expression verwendet wurden, entsprachen kurzen Teilsequenzen innerhalb der klonierten cDNA Abschnitte.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma IBA (Göttingen) als 100 μ M Stocklösung oder von Sigma/ARK (München) als Lyophilisat bezogen und mit autoklaviertem Wasser auf 100 μ M eingestellt. Stocks wurden bei –20 °C gelagert. Die Sequenzen aller benutzter Primer und Sonden sind in Syntheserichtung (5' \rightarrow 3'-Richtung) tabellarisch aufgeführt (Tabellen 3, 4, 8, 9). Zudem sind die Abschnitte, die den Primern bzw. Sonden entsprechen, auf der cDNA Sequenz (Plus-Strang) kenntlich gemacht (Abbildungen 29, 30, 31, 32).

3.7.1 Puffer und Lösungen

10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE):				
Tris-HCl	1 M	121,14 g/l		
Borat (Borsäure)	1 M	61,83 g/l		
EDTA	20 mM	7,44 g/l		

β -Agarase (0,5 U/µl):

Die Agarase wurde von der Firma MBF Fermentas bezogen und wurde bei -20°C gelagert.

<u>3 M Natriumacetat (p</u>	H-Wert 4,6):	
C ₂ H ₃ NaO ₂	3 M	123,04 g/l
Aqua bidest.		ad 500 ml
		pH-Wert 4,6

Das Salz wurde in 500 ml Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit 37 %iger Essigsäure eingestellt.

80 % Ethanol

Ethanol	80 ml
Aqua bidest.	20 ml

Der Ethanol wurde bei 4°C gelagert.

3.7.2 **PCR-Techniken**

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden DNA-Matrizen (Templates) sequenzspezifisch amplifiziert. Dazu wird die DNA durch Hitze zunächst denaturiert. Im zweiten Schritt, der Anlagerungsreaktion, hybridisieren anschließend die Oligonukleotidprimer mit ihrem komplementären DNA-Strang (Anlagerung), worauf im dritten Schritt die DNA-Polymerase eine DNA-Neusynthese zwischen diesen Primern in 5' \rightarrow 3'-Richtung vornimmt (Verlängerung). Der Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung wird 20-35mal wiederholt, wobei die neu synthetisierten Tochterstränge im nächsten Zyklus selbst als DNA-Matrizen fungieren. Schon ab dem dritten Zyklus entstehen so DNA-

Doppelstränge, deren Länge dem Abstand zwischen den Primern entspricht. Mit jedem Zyklus erhöht sich der Anteil dieser DNA-Abschnitte mit der Zielsequenz auf etwa das doppelte, so dass theoretisch nach n Zyklen eine Anzahl von maximal 2ⁿ DNA-Molekülen dieser Länge im Reaktionsansatz enthalten ist. Dies entspricht einer logarithmischen Vervielfältigung der DNA-Zielsequenz.

Alle PCR-Produkte wurden im Anschluss an die Reaktion elektrophoretisch auf einem DNA-Agarosegel analysiert (s. 3.6.2.). Um optimale Voraussetzungen für die PCR-Amplifikation zu erreichen, wurden die cDNA-Sequenzen der *MRP1/Mrp1*- und *MRP/Mrp2*-Gene von Mensch, Maus und Ratte genomischen Sequenzen aus der EMBL Gendatenbank gegenübergestellt. Es wurde gemutmasst, dass die Mrp1- und Mrp2-cDNA Sequenzen des Hamsters einen hohen Grad an Homologie aufweisen würden und daher übereinstimmende Bereiche als Basis für die Primerauswahl verwendet werden könnten (s. 4.4.1 u. 4.5.1.).

Zum S	Sequenzverg	leich verwar	ndte cDNA-S	Sequenzen at	us EMBL-Da	tenbank:

MRP1/Mrp1-cDNA	Sequenz	Sequenz	Homologie
	Mensch	Maus	83 %
	Mensch	Ratte	73 %
	Maus	Ratte	78 %

Tab. 1:Homologien der MRP1/Mrp1-cDNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Spezies.
Die MRP1-Sequenz des Menschens entspricht einem Fragment von 5011bp und ist unter
der Acc. No. NM00392 in der EMBL-Genbank abgelegt. Die Mrp1-Sequenz der Maus
entspricht einem Fragment von 4587 bp (Acc. No. AF022908), die der Ratte entspricht
einem Fragment von 2909 bp (Acc. No. AJ277881).

MRP2/Mrp2-cDNA	Sequenz	Sequenz	Homologie
	Mensch	Maus	53 %
	Mensch	Ratte	78 %
	Maus	Ratte	79 %

Tab. 2:Homologien der MRP2/Mrp2-cDNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Spezies.
Die MRP2/Mrp2-Sequenz des Menschens entspricht einem Fragment von 4868 bp und ist
unter der Acc. No. NM00392 in der EMBL-Genbank abgelegt. Die Mrp2-Sequenz der
Maus stand mit einem Teilfragment von nur 516 bp zur Verfügung, die der Ratte mit
einem Fragment von 4918 bp.

Zur Primerauswahl der PCR wurden Sequenzbereiche von 20-23 bp, die zwischen den drei Spezies möglichst identisch waren, ausgewählt. Für den Primer Mrp2for2 wurde an Position 13 eine statische Mischung aus Cytosin/Thymin eingesetzt (Y=C/T). Die PCR-Primer hatten folgende Eigenschaften:

3.7.3 PCR-Primer-Auswahl für Mrp1 (Hamster)

Primer	5'-Oligonukleotid Sequenz-3' (Syntheserichtung)
Mrp1for1	TCA TGA GTG GCG GCA AGA TCT C
Mrp1for2	ACT GGA ACT ACA TGAAGG CCA T
Mrp1rev3	ATC ATG GAG TCC ACT GTG TCC A

Tab. 3:Verwendete PCR-Primer für Mrp1-mRNA des Hamsters. Der Mrp1for1, Mrp1for2
sowie der Mrp1rev3 Primer erschlossen sich aus den homologen
cDNA-Sequenzbereichen der bereits bekannten MRP1/Mrp1-Sequenzen von Mensch,
Maus und Ratte (s. 4.4.1. u. 4.5.1.)

3.7.4 PCR-Primer-Auswahl für Mrp2 (Hamster)

Primer	5'-Oligonukleotid Sequenz-3' (Syntheserichtung)	
Mrp2for1	CAT CCC TCA CAA ACT GCC TCT TC	
Mrp2for2	CCT GGT CCT GGA YGA AGC CAC	
Mrp2rev3	CAA TGC CGG CTT CCT TGG CCA TC	

Tab. 4:Verwendete PCR-Primer für Mrp2-mRNA des Hamsters. Der Mrp2for1, Mrp2for2
sowie der Mrp2rev3 Primer erschlossen sich aus den homologen
cDNA-Sequenzbereichen der bereits bekannten MRP2/Mrp2-Sequenzen von Mensch,
Maus und Ratte (s. 4.4.1. u. 4.5.1.)

3.7.5 One-step RT-PCR

Es wurde der *one-step* RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) Kit (Invitrogen) eingesetzt, um mit genspezifischen Primern (21–23 bp) Hamster Mrp cDNA-Fragmente bis zu 1.5 kb zu amplifizieren. Dabei wurde eine Enzymmischung mit reverser

Methoden

Transkriptase und thermostabiler DNA Polymerase verwendet. Über Reverse Transkription wurde zunächst anhand der mRNA Matrize (*template* mRNA) cDNA synthetisiert. Diese cDNA wurde einer Amplifikation über PCR unterzogen. Folgender Reaktionsansatz wurde unter Eiskühlung in einem 0.2 ml PCR-Gefäss hergestellt:

Template RNA 1µg/µl	1 μl
MgSO ₄ -Lösung (50mM)	1,8 µl
2x Reactions Mix	25 μl
DNA-Polymerase/	
Reverse Transkriptase	
Mix	1 μl
Forward-Primer (10µM)	2,5 µl (Mrp1for1 oder Mrp2for1)
Reverse-Primer (10µM)	2,5 μl (Mrp1rev3 oder Mrp2rev3)
autokl. Aqua bidest.	16,2 μl

Tab. 5:Reaktionsansatz der one-step RT-PCR zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten mit
den genspezifischen Primern Mrp1.for1 und Mrp2for1 als forward-Primer sowie
Mrp1rev3 oder Mrp2rev3 als reverse-Primer.

Es kam das folgende Temperatur-Protokoll zum Einsatz, wobei die reverse Transkriptase nach der initialen cDNA-Synthese bei hoher Temperatur denaturiert und simultan die DNA-Polymerase aktiviert wurde:

Temperaturprogramm:	Initiale Denaturierung	5 min bei 70°C
	cDNA-Synthese	45 min bei 45°C
	(reverse Transkription)	
	Denaturierung	1 min bei 96°C
	(Enzyminaktivierung)	
	35 Zyklen der PCR:	

Denaturierung	15 s bei 94°C
Annealing (Anlagerung)	45 s bei 60°C
Extension (Kettenverlängerung)	2 min bei 72°C
Finale Extension	
(finale Kettenverlängerung)	7 min bei 72°C

Tab. 6:Temperaturprogramm der one-step RT-PCR zur Synthese von cDNA-Sequenzen der
Mrp1- und Mrp2-mRNA

Template DNA	1 μg	
d-NTP (2 mM)	5 µl	
Forward-Primer (10 µM)	2 μl (Mrp1for2 oder Mrp2fo	r2)
Reverse-Primer (10 µM)	2 μl (Mrp1rev3 oder Mrp2re	v3)
Puffer1	5 μl	
Enzym	0,5 μl	
Aqua bidest.	Volumen auf 50 µl	
Temperaturprogramm:		
	Initiale Denaturierung	2 min bei 96°C
	5 Zyklen zur:	
	Denaturierung	20 s bei 96°C
	Annealing	1 min bei 45°C
	Extension	4 min bei 68°C
	30 Zyklen zur	
	Denaturierung	20 s bei 96°C
	Annealing	45 s bei 60°C
	Extension	4 min bei 68°C

3.7.6 PCR auf genomischer DNA für *Mrp1* und *Mrp2* Gene

Zy	yklusverlängerung ab dem	11. Zyklus
je	weils	20 s
Fi	nal Extension	8 min bei 68°C
Ве	eenden	bei 4°C

Tab. 7:PCR-Ansatz zur Amplifikation von genomischen DNA-Sequenzen der Hamster-
Mrp1- und Mrp2-Gene unter Verwendung von isolierter genomischer DNA

Die Ergebnisse der PCR mit genomischer DNA waren zu den Resultaten der cDNA Identifizierungen, die über das RT-PCR Verfahren (3.7.5) ermöglicht wurden, konsistent. Eine weitere Untersuchung der genomischen Strukter der Hamster *Mrp1*- und *Mrp2*-Gene hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt und wurde daher nicht weiter verfolgt.

3.8 Nachweis und Aufreinigung von DNA- und cDNA-Produkten durch Agarosegelelektrophorese

3.8.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente weiteren Experimenten (s. 3.7.5. u. 3.9.) zugänglich zu machen. Hierbei wurden die *low-melting*-Methode (Isolierung von DNA aus *low melting* (LM) Agarose durch Agaraseverdau) angewendet (3.8.2.).

Die entsprechende DNA-Bande wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose- oder LM-Agarosegel (s. 3.8.2.) auf einem Transilluminator unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und wie folgt weiter behandelt:

3.8.2 Low-Melting-Methode

Die LM-Agarose mit der eingebetteten DNA-Bande wurde für 5–10 min bei 65 °C geschmolzen und anschließend auf 42 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden zügig 1 μ l Agarase/100 mg LM-Agarose (bei 1% LM-Gelen) zugegeben, der Ansatz für 1 h bei 42 °C inkubiert und anschließend präzipitiert. (s. 3.8.3.).

3.8.3 DNA-Präzipitation

Hierzu wurde die zu präzipitierende DNA-Lösung mit 1 µl einer Glykogenlösung (20 mg/ml), 1/10 Volumenanteil einer 3 M Natriumacetatlösung (pH-Wert 4,6) und 2 Volumenanteilen Isopropanol versetzt und gut gemischt. Nach Zentrifugation bei 21910 x g und 4 °C für 20 min wurde das DNA-Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und 5 min bei 4 °C und 21910 x g zentrifugiert. Die DNA wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen.

3.9 Klonierung der Mrp1-PCR-Produkte

Die Ligation der PCR-Produkte in den Vektor, die Transformation von *E. coli* mit dem Vektor sowie die Herstellung der Mini-Präparationen von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des TOPO®XL PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen/Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe) durchgeführt.

3.9.1 Ligation von PCR-Produkten in den pCR®-XL-TOPO®-Vektor

Diese von der Firma Invitrogen patentierte Methode erlaubt die direkte Ligation von gereinigten PCR-Produkten in diverse Klonierungs- und Expressionsvektoren (z.B. pCR-XL-TOPO) mit einer wesentlich höheren Ligationseffizienz als die klassische Ligation mit T4-Ligase. TOPO-Vektorlösungen enthalten linearisierten Vektor mit 3'-T-Überhängen, die komplementär zu den von der Taq-DNA-Polymerasen erzeugten 5'-A-Überhängen sind. Die Ligation wird von einer mit den Vektorenden assoziierten Topoisomerase vermittelt. Für die Ligationsreaktion nach Herstellerprotokoll wurden PCR-Produkt und Vektorlösung in einem Gesamtvolumen von 6 μ l gemischt, 5 min bei RT inkubiert und die Reaktion mit einer konzentrierten Salzlösung (0.3 M NaCl, 0.06 M MgCl₂) gestoppt.

Das Ligationsprodukt wurde direkt zur Elektroporation (Transformation) eingesetzt oder vorher einer Isopropanolpräzipitation (s. 3.8.4.) unterzogen, um den Salzgehalt und damit eine erhöhte Leitfähigkeit der Ligationslösung zu reduzieren (zur Vermeidung eines Kurzschlusses während des Hochspannungspulses bei der Elektroporation elektrokompetenter *E.coli* (s. 3.9.2.).

3.9.2 Herstellung elektrokompetenter E.coli-Zellen

Eine Vorkultur aus 20 µl Bakterienstock (TOP 10) in 6 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurde ü.N. unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und anschließend gleichmäßig auf 3 x 200 ml LB-Medium aufgeteilt. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0.65-0.8$ vermehrt, auf Eis abgekühlt und auf 12 vorgekühlte 50 ml-Röhrchen (Sarstedt) verteilt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter Eiskühlung oder bei 4 °C (Zentrifuge) ausgeführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 3220 x g wurden die Pellets in je 1 ml eiskaltem 10%-Glycerin (in autoklaviertem Aqua bidest.) resuspendiert, auf 30 ml mit 10%-Glycerin aufgefüllt und erneut 10 min bei 3220 x g zentrifugiert. Nach Resuspension in je 1 ml eiskaltem 10%-Glycerin wurden je 2 Pellets in 30 ml 10%-Glycerin vereinigt und die Zentrifugation wiederholt (6 Röhrchen). Es erfolgte eine Resuspension in 30 ml 10%-Glycerin und Zentrifugation für 10 min bei 3220 x g und eine weitere Vereinigung der Pellets (3 Röhrchen). Nach einer finalen Resuspension in 30 ml 10%-Glycerin und Zentrifugation für

10 min bei 3220 x g wurden die drei Bakterien-Pellets vorsichtig in je 400 μ l 10%-Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Bakterien wurden in vorgekühlte Eppendorf-Gefässe (60 μ l) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.9.3 Transformation von E.coli durch Elektroporation

Für die Transformation eines Ligationsansatzes wurde ein Aliquot (60 µl) elektrokompetenter E. coli (s. 3.9.2.) für 30 min auf Eis aufgetaut und mit 2–4 µl des Ligationsprodukts vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführt und die gefüllte Küvette im Elektroporator unverzüglich mit einem Hochspannungspuls (2500 V, 25 μ F, 200 Ω) behandelt. Nach Zugabe von 500 μ l vorgewärmtem SOC-Medium in die Küvette wurde der gesamte Transformationsansatz in ein Falcon-Röhrchen überführt und ca. 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte das Ausplattieren von 10–300 µl transformierter *E. coli*-Suspension auf Selektionsplatten (LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum) und Inkubation im Trockeninkubator für 12-18 h bei 37 °C. Die entstandenen Kolonien wurden mittels einer Minipräparation und Gelelektrophorese analysiert (s. 3.9.5.) und die isolierte Plasmid-DNA gegebenenfalls sequenziert (s. 3.10.1.).

Die	Kulturmedien	für	kompetente	E.coli-Bakterien	und	die	Agarplatten	hatten	folgende
Zusa	ammensetzung:								

	SOC-Medium	LB-Medium	LB-Agar-Platten
Trypton	2.0% (w/v)	1.0% (w/v)	1.0% (w/v)
Hefeextrakt	0.5% (w/v)	0.5% (w/v)	0.5% (w/v)
NaCl	0.06% (w/v)	1.0% (w/v)	1.0% (w/v)
KCl	2 mM	_	_
MgCl ₂	10 mM	_	_
MgSO ₄	10 mM	_	_
Glucose	20 mM	_	_
Agar		_	1.5% (w/v)
pH-Wert	7.0	7.0	7.0

Die Medien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Die erforderliche Glukosemenge wurde in autoklaviertem Aqua bidest. gelöst, steril filtriert und dem autoklavierten Medium zugesetzt. SOC-Medium wurde bei –20 °C aufbewahrt und vor Gebrauch aufgetaut. LB-Medium wurde bei 4 °C für einige Wochen gelagert. LB-Agar-Medium wurde nach dem Autoklavieren auf ca. 55 °C gekühlt, mit dem entsprechenden

Selektionsantibiotikum (Endkonzentrationen Ampicillin 0,1 mg/ml, Kanamycin 0,05 mg/ml) und nach Bedarf IPTG und X-Gal (Endkonzentrationen 80 mg/l X-Gal, 100 μ M IPTG) versetzt und unter semi-sterilen Bedingungen in Kulturschalen (56,7 cm²) gegossen. Nach dem Aushärten der Agarplatten wurden diese für einige Wochen bei 4 °C gelagert. Stammlösung:

Ampicillin	$50 \text{ mg/ml in H}_2\text{O}$
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O
IPTG	100 mM in H ₂ O
X-Gal	40 mg/ml in DMF

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

3.9.4 Mini-Präparation von Plasmid-DNA und Analyse der Produkte

spensionspuffer (pH-Wert 8,0):

Tris	50 mM
EDTA	10 mM
RNAse A	0.1 %
Lysepuffer:	

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Neutralisationspuffer (pH-Wert 5,5):

Kaliumacetat 3 M

Zur Herstellung einer Minikultur wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versetzt und anschließend mit einer frisch isolierten Kolonie von der Agarplatte inokuliert. Diese Kultur wurde ca. 8–12 h bei 750–900 rpm und 37 °C geschüttelt. Die Isolierung der auf diese Weise erhaltenen Plasmid-DNA diente analytischen Zwecken (Restriktionsverdau, Sequenzierung) und wurde in modifizierter Form der alkalischen Lyse durchgeführt. Von der Minikultur wurden 2 ml bei 1780 x g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl RNase A enthaltenden Resuspensionspuffer
aufgenommen, 5 min mit 200 μ l alkalischem Lysepuffer und anschließend für 5 min mit schwach saurem Neutralisationspuffer inkubiert. Das Proteinpräzipitat wurde 30 min bei 21910 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml Eppendorfgefäß) überführt, mit 2 Volumenanteilen absoluten Ethanols (1 ml) versetzt und nach sorgfältigem Mischen 20 min bei 4 °C und 21910 x g zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 4 °C und 21910 x g zentrifugiert, in der Vakuumzentrifuge bei RT getrocknet und in 20–40 μ l autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen.

3.9.5 Herstellung von Glycerinkryokulturen

Glycerinkryokulturen wurden aus den LB-Kulturen der Plasmidminipräparationen (s. 3.9.4.) durch Zugabe von 200 μ l Glycerin zu 400 μ l der Bakteriensuspension hergestellt. Die Stocklösungen wurden gut gemischt und unverzüglich bei –20 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Eppendorfgefässe zur Dauerlagerung in den –80 °C Tiefkühlschrank überführt.

3.10 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten bei der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Die auf dem Ketten-Abbruch-Verfahren basierende Sequenzierreaktion von Sanger und Coulson (1975) verwendete fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddNTPs) zur Erzeugung einer statistischen Mischung von synthetisierten DNA-Fragmenten. Für die PCR-Amplifikation wurden DNA-Mengen zwischen 200 ng und 500 ng pro 10 μ l-Ansatz zusammen mit 1 μ l des entsprechenden Sequenzier-Primers (10 μ M) und 2 μ l BigDye-Mix (ddNTPs, DNA-Polymerase, MgCl₂ und Puffer) verwendet:

Start:	Initiale Denaturierung	2 min bei 94 °C
24 Zyklen	: Denaturierung	15 s bei 96 °C
	Anlagerung	5 s bei 56.5 °C
	Kettenverlängerung	4 min bei 60 °C

Abschluss: Finale Kettenverlängerung 4 min bei 60 °C

3.10.1 Sequenzieren von Mrp1- und Mrp2-PCR-Produkten bzw. von klonierten Mrp1-cDNA-Fragmenten

Nach einer Sephadex-Filtration (Sephadex G-50 *superfine*, Amersham) wurde mit den erhaltenen Produkten das Standard-Leseweitenprogramm (700 bp) auf dem automatischen Sequenzierer *3100 Genetic Analyzer* (ABI) gestartet. Die Auswertung der Sequenzdateien (.abi) erfolgte mit den PC-Software-Produkten *Sequencing Analysis* (PerkinElmer), *Chromas* (Technelysium), *Staden Package* und *ClustalW* (EBI). Vergleiche mit den Sequenzdatenbanken EMBL und Genbank wurden mit Hilfe des Blast-Programms über den Webserver URL: http://:www.ncbi.nlm.nih am NIH (USA) oder über den Fasta3-Server URL: http://:www.ebi.ac.uk am EBI (Cambridge, GB) vorgenommen. Zur Bestätigung neuer Sequenzen wurden mindestens zwei identische cDNA-Klone oder ein direkt sequenziertes PCR-Produkt benötigt.

3.11 Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot

3.11.1 Puffer und Lösungen

Prähybridisierungslösung:

NaCl	0,9 M
Trinatriumcitrat	0,09 mM
Formamid deionisiert	12,5 M
SDS	17 mM
Denhardts-Lösung (100-fach)	5 % (v/v)
Heringssperma-DNA	400 µg/ml

Formamid wurde wie unter 3.3.1. beschrieben deionisiert.

Heringssperma-DNA-Lösung (10 mg/ml) wurde vor Gebrauch mit Ultraschall behandelt, um DNA-Fragmente von 500-700 kb zu erhalten und anschließend bei –20°C gelagert. Direkt vor der Verwendung wurde die Heringssperma-DNA durch 5-minütiges Erhitzen in siedendem Wasser und sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert.

Denhardts-Lösung (100-fach):

Ficoll (MW 400000)	2 % (w/v)
Polyvinylpyrrolidon	2 % (w/v)
BSA	2 % (w/v)

Die Lösung wurde nach dem Ansetzten in Aqua bidest. durch 5 μ m und 0,45 μ m Vorsatzfilter sterilfiltriert.

Waschpuffer SSC (2x):	
NaCl	300 mM
Trinatriumcitrat	30 mM
SDS	0.1 %
Waschpuffer SSC (1x): NaCl	150 mM
Trinatriumcitrat	150 mM
SDS	0.1 %
Waschpuffer SSC (0,1x):	
NaCl	15 mM
Trinatriumcitrat	1,5 mM
SDS	0.1 %

3.11.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Zur radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden wurde die endständige Phosphatgruppe von [γ -³²P]-ATP mittels T4-Polynukleotidkinase auf das 5'-Ende von Oligonukleotiden übertragen. Die Markierung der verwendeten Oligonukleotide wurde in einem Gesamt-volumen von 10 µl durchgeführt. Der Markierungsansatz bestand aus 50 pmol Oligonukleotid, autoklaviertem Aqua bidest. ad 3 µl, 1 µl T4-Polynukleotidkinase Puffer-konzentrat (10x, Endkonzentration: 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 70 mM Tris-HCl), sowie 5 µl (entspricht 1,85 mBq) [γ -³²P]-ATP (spezifische Aktivität: 222 TBq/mmol). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (8 I.E./µl) gestartet und für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

Zur Trennung von markierten Oligonukleotiden und freiem $[\gamma^{-32}P]$ -ATP wurden MicroSpin G 25 Sephadex-Säulen (Pharmacia) eingesetzt. Das Säulenmaterial wurde zunächst durchmischt und die Säule nach Entfernung des Verschlusses in einem Reaktionsgefäss für 1 min bei 735 x g zentrifugiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 40 µl

100 mM EDTA-Lösung gestoppt, der vollständige Ansatz mittig auf die Oberfläche der Säule aufgegeben und erneut für 2 min bei 735 x g zentrifugiert. Das erhaltene Eluat wurde anschließend mit 300 µl denaturierter Heringssperma-DNA (Stammlösung 10 mg/ml) versetzt und für die Hybridisierung eingesetzt. Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde durch Bestimmung der Radioaktivität im Eluat überprüft.

3.11.3 Hybridisierungs-Oligonukleotid-Sonden für Mrp1

Die nachfolgende Tabelle erläutert die Verwendung, Herkunft und Größe in der Arbeit benutzter Mrp1-Oligonukleotid Sonden:

Sonde	5'-Sequenz-3' bzw. Herkunft	Verwendung
Mrp1rev4	21 bp Fragment aus 683 bp cDNA-	Nachweis von Mrp1-
(hamster)	Sequenzprodukt der Primer:	mRNA des Hamsters im
	Mrp1for1 u. Mrp1rev3	Northern Blot
	GAT GCC CAA GGC CCC ATA GAC	
Mrn 1 rou5	22 hn Errormont aug 682 hn aDNA	Nachweis von Mrn1
Mipnev5	22 op Flagment aus 085 op cDNA-	Nachweis von Mipi-
(hamster)	Sequenzprodukt der Primer:	mRNA des Hamsters im
	Mrp1for1 u. Mrp1rev3	Northern Blot
	AGC TCA TGG GCG AGC GCA GGA G	
β-Aktin		Kontroll-
(human)		Rehybridisierung zum
		Nachweis von ß-Aktin
	GCG CTC AGG AGG AGC AAT G	mRNA im Northern Blot

Tab. 8:Verwendete cDNA-Sonden für Mrp1-mRNA des Hamsters. Die Mrp1.rev4-Sonde
entspricht dem Sequenzbereich Nukleotide 496–517, die Mrp1rev5-Sonde dem
Sequenzbereich Nukleotide 611–633 auf der cDNA-Sequenz des Hamsters für Mrp1
(Genbank Accession Number AJ 504425).

3.11.4 Hybridisierungs-Oligonukleotid-Sonden für Mrp2

Die nachfolgende Tabelle erläutert die Verwendung, Herkunft und Größe der in der Arbeit benutzten Mrp2-Oligonukleotid Sonden:

Sonde	5'-Sequenz-3' bzw. Herkunft	Verwendung
Mrp2rev5	22 bp Fragment aus 560 bp cDNA-	Nachweis von Mrp2-
(hamster)	Sequenzprodukt der Primer:	mRNA des Hamsters im
	Mrp2for1 u. Mrp2rev3	Northern Blot
	CTC GAA GGT CGT GCA GTC CAA C	
Mrp2rev4	21 bp Fragment aus 560 bp cDNA-	Nachweis von Mrp2-
(hamster)	Sequenzprodukt der Primer:	mRNA des Hamsters im
	Mrp2for1 u. Mrp2rev3	Northern Blot
	GTT GTC ACC ACC CTC TGT CAC	
ß-Aktin		Kontroll-
(human)		Rehybridisierung zum
		Nachweis von ß-Aktin
	GCG CTC AGG AGG AGC AAT G	mRNA im Northern Blot

Tab. 9:Verwendete cDNA-Sonden für Mrp2-mRNA des Hamsters. Die Mrp2rev5-Sonde
entspricht dem Sequenzbereich Nukleotide 55–77, die Mrp2rev4-Sonde dem
Sequenzbereich Nukleotide 240–261 auf der cDNA-Sequenz des Hamsters für Mrp2
(Genbank Accession Number AJ 504426).

3.11.5 Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot durch Hybridisierung mit ³²Phosphor-markierten Sonden

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurden die Membranen für 2-3 h bei 38 °C im Hybridisierungsofen mit Prähybridisierungslösung inkubiert. Zur Einleitung der Hybridisierung wurden die vorbehandelten markierten Sonden enthaltenden Ansätze (Mrp1rev4, Mrp1rev5, Mrp2rev4, Mrp2rev5, B-Aktin) zur Prähybridisierungslösung pipettiert. Die Hybridisierung wurde für 16-24 h bei 38 °C vorgenommen. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Membranen zur Entfernung unspezifisch gebundener Oligonukleotide zunehmender Temperatur (37-55 °C) und abnehmender unter

Ionenkonzentration des Waschpuffers (2 x SSC / 0,1 % SDS (w/v), 1x SSC / 0,1 % SDS (w/v) 0,1 x SSC / 0,1 % SDS (w/v) je 5 min unter Schütteln gewaschen. Waschtemperatur und Ionenkonzentration waren von der verwendeten Sonde abhängig. Nach jedem Waschschritt wurde die verbliebene Aktivität mit einem Flächenzähler gemessen. Beim Erreichen einer konstanten Aktivität wurde die Waschprozedur abgebrochen und die Membranen feucht in Klarsichtfolie eingeschweißt. Zur Quantifizierung der gebundenen Radioaktivität wurde ein *Bio-Imaging-Analyzer*, BAS 1500, verwendet. Hierzu wurden [³²P]-sensitive Nachweisplatten für 3–72 h der Stahlenexposition durch die hybridisierte Membran ausgesetzt. Mit der Software BAS-Reader konnten die einzelnen Signale ausgewertet werden. Anschließend wurden die Membranen zur autoradiographischen Darstellung mit aufgelegten Röntgenfilmen in einer Kassette mit Verstärkerfolien bis zu 3 Wochen bei –80 °C gelagert. Anschließend wurden die Filme entwickelt.

3.12 Durchführung des Neutralrot-Assays mit V79-Zellen

Der Neutralrot-Assay ist als ein häufig eingesetztes Verfahren zur Untersuchung der Zytotoxizität chemischer Agenzien. Dieser *In-vitro-*Zytotoxizitätstest wurde erstmals von Babick und Borenfreund (1992) beschrieben und beruht auf der Tatsache, dass nur lebende Zellen den Farbstoff Neutralrot nach Substanzkontakt aufnehmen.

In der Mikrotiterplattenversion wird die Zellkultur, die am Gefäßboden aufgewachsen ist, für 24 Stunden gegenüber einer Konzentrationsreihe der zu prüfenden Substanz exponiert. Am Ende der Expositionszeit wurden die Zellen gewaschen und mit Neutralrot, einem schwach kationischen Vitalfärbestoff, versetzt. Die Farbstoffakkumulation erfolgt im Wesentlichen in den zellulären Lysosomen. Der Farbstoff passiert die Zellmembran und bindet intrazellulär an Carboxyl- und Phosphatgruppen (Winckler 1974). Wird durch Exposition mit einer toxischen Substanz die Zellmembran der Zelle oder die lysosomale Membran geschädigt, kommt es zu einer verminderten Farbstoffretention (Lullmann-Rauch 1979). Tote und membrangeschädigte Zellen können den Farbstoff nicht akkumulieren und dieser wird während der anschließenden Waschund Fixierungsschritte nicht intrazellulär zurückgehalten. Diese Tatsache erlaubte eine direkt proportionale Aussage über die Zytotoxizität der eingesetzten Testsubstanz nach Expositon der Zellen, da die aufgenommene Neutralrot-Menge im Neutralrot-Assay photometrisch gemessen werden konnte (Borenfreund und Puerner 1985).

Die Auswertung erfolgt über eine Auswaschung des Farbstoffs und dessen photometrische Vermessung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Die Zytotoxizität wird als relativer Gehalt an Neutralrot angegeben [%] und stellt ein Maß für den Anteil letal geschädigter Zellen dar. Für einen Vergleich hinsichtlich der Empfindlichkeit zwischen den verschiedenen selektierten V79-Klonen wurde der 50%-Wert der Neutralrot-Aufnahme im Neutralrot-Assay herangezogen. Dieser Wert wird im folgendem mit ED50 (effektive Dosis 50%) abgekürzt.



Abb. 8: 96-Multi-Well Platte zur Durchführung des *In-vitro-*Zytotoxizitätstestes.

Im Neutralrot-Assay wurden V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79), V79-Zellen mit einer 6-wöchigen 10 μ M Arsenit-Vorbehandlung (K) und Arsenit-resistente V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) mit einer 6-wöchigen Arsenit-Vorbehandlung nach der Klonierung vergleichend untersucht. Es wurden 104 V79-Zellen pro Vertiefung in einer 96-Multi-Well-Platte 24 h mit 100 μ l Kulturmedium ohne Testsubstanz inkubiert und anschließend zusammen mit dem Arsenit und 100 μ l Kulturmedium in die Multi-Well-Platte pipettiert. Die oben genannten V79-Zellen wurden jeweils Arsenit-Konzentrationen von 1,5 μ M, 3 μ M, 6 μ M, 12 μ M, 24 μ M, 50 μ M, 75 μ M und 100 μ M für 24h ausgesetzt und anschließend mit der Neutralrot-Gebrauchslösung inkubiert. Der Neutralrot-Assay wurde pro V79-Zellansatz (V79, K, K4, K6, K7, K8, K9) dreimal durchgeführt und dabei wurden jeweils pro Arsenit-Konzentration 6 photometrische Messwerte ermittelt.

Für die Versuche mit Cisplatin wurden ebebfalls 104 V79-Zellen pro Vertiefung in der Multi-Well-Platte 24 h mit 100 μ l Kulturmedium ohne Testsubstanz inkubiert und anschließend zusammen mit der jeweiligen Cisplatin-Konzentration und 100 μ l Kulturmedium in die Multi-Well-Platte pipettiert. Die oben genannten untersuchten V79-Zellen wurden jeweils Cisplatin (CPDD)-Konzentrationen von 1,5 μ M, 3 μ M, 6 μ M,12 μ M, 24 μ M, 50 μ M, 75 μ M und 100 μ M für 24h ausgesetzt und anschließend mit der Neutralrot-Gebrauchslösung inkubiert. Der Neutralrot-Assay mit Cisplatin wurde im Gegensatz zu den Neutralrot-Assay mit Arsenit pro V79-Zellansatz (V79, K, K4, K6, K7, K8, K9) nur einmal durchgeführt. Auch hierbei wurden jeweils pro Cisplatin-Konzentration 6 photometrische Messwerte bestimmt.

In allen Versuchsreihen diente ein Ansatz ohne Zellen mit Aqua Bidest. und Reagenzien als Hintergrundprobe dazu, die Absorption der Neutralrotlösung als Negativkontrolle zu ermitteln. Nach Lyse der Zellen wurde die Neutralrotfarbe extrahiert und die Absorption bei 540 nm an einem Multi-Well-Platten-Spektralphotometer gemessen (s. 3.13.2).

3.12.1 Puffer und Lösungen

Hepes-Puffer 1 M (Seromed):	
100 ml Flasche	
Lagerung zwischen 18-25° C	
Neutralrot-Stocklösung (flüssig):	

Neutralrot (Natriumsalze)	3,33 g/l
Aqua bidest.	100 ml

Die Lösung wurde membranfiltriert und konnte zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden.

|--|

Kulturmedium		46,4 ml
Hepes-Puffer	1 M	1 ml
Neutralrot-Stocklösung		400 µl

Feeincourer	Alkohol	(Meeelöeun	<u>(</u>).
Essignation	AIKONOL	uviessiosun	91

Ethanol	50 %	250 ml
Essigsäure (37 %)	1 %	5 ml

Aqua bidest.

4	mМ	Natriumarsenit-Lösung:	

50 mM Stammlösung	1 ml
Aqua bidest.	11,5 ml

ad. 0,51

Die 4 mM Lösung wurde in der Zellkultur für eine konstante Arsenit-Exposition von 10 μ M verwendet.

5 mM Cisplatin-Stammlösung:

Pt (NH ₃) ₂ Cl ₂	5 mM	150 mg
Aqua bidest.		100 ml

3.12.2 Aufbereitung von V79-Zellkulturen für den Neutralrot-Assay

Mit Hilfe des Neutralrot-Assays wurden die Zellklone auf eine erhöhte Toleranz gegenüber Arsen und Cisplatin überprüft. Er wurde alle 3 Wochen parallel zur Zellkultur durchgeführt.

Die 96-Multi-Well-Platten wurden mit 10^4 Zellen und $100 \,\mu$ l Kulturmedium beschickt. Anschließend folgte eine Inkubation 24 h in Begasungschränken. Das Medium wurde gewechselt und zusammen mit der Arsenit- oder Cisplatin-Testsubstanz in einem Volumen von 100 μ l in die Multi-Well-Platte pipettiert. Dabei wurden in den verschiedenen Vertiefungen Testkonzentrationen von 1,5 μ M, 3 μ M, 6 μ M, 12 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M und 100 μ M hergestellt. Anschließend folgte eine Inkubation von 24 h in Begasungsschränken.

Die Zellen wurden mit 100 μ l PBS-Puffer (s. 3.1.1.) gewaschen und jeweils mit 100 μ l Neutralrot-Gebrauchslösung (s. 3.13.1.) versetzt, es folgte eine Inkubation von 3 h im Begasungsbrutschrank. Anschließend wurde die Neutralrot-Gebrauchslösung entfernt, die Zellen mit 100 μ l PBS-Puffer gewaschen und mit 100 μ l des Eisessig (1 %) / Ethanol (50 %)-Gemisches (s. 3.13.1.) versetzt, um durch Lyse der Zelle die Neutralrotfarbe zu extrahieren. Nach 10 min auf dem Multi-Well-Platten-Schüttler wurde die Absorption der Neutralrotfarbe bei 540 nm an dem Spectralphotometer gemessen.

3.13 Durchführung des Mikrokerntests mit V79-Zellen

Die Genotoxizität chemischer Agenzien oder ionisierender Strahlung kann anhand des von Matter und Schmid (1971) entwickelten Mikrokerntests (bzw. Mutagenitätstest) eingeschätzt werden. Dieser Test wird als *in-vitro*-Test zur Prüfung von chromosomalen Schäden (Chromosomenbruch bzw. klastogener Effekt) sowie zur Feststellung von Schäden am Spindelapparat der V79-Zellen (aneugener Effekt) eingesetzt.

Für die Mikrokernentstehung ist die Fähigkeit der Zelle zur Zellteilung (Mitose) notwendig. Mikrokerne können durch eine ungleiche Chromosomenverteilung (bzw. durch den Verlust ganzer Chromosomen) aufgrund von Schädigung der Zentromere oder des Spindelapparates entstehen. Diese Schäden führen schließlich dazu, dass DNA-Fragmente während der Zellteilung in der Mitte der beiden Spindelpole zurückbleiben und nicht zu den beiden Spindelpolen separiert werden.

Je nachdem, wieviel DNA während der Telophase zurückbleibt, können die Mikrokerne ganze Chromosomen beinhalten (Fenech 2000). Um diese Fragmente bildet sich eine vollfunktionsfähige Kernmembran aus und sie haben die Struktur eines normalen Kerns und besitzen Kernporen, Kernhülle und Chromatin. Als Ursache für die Entstehung von Mikrokernen kommen Defekte von Proteinen in Frage, die sich direkt oder indirekt auf den Aufbau und die Funktion des Centrosoms sowie der Spindelapparatur auswirken.

Eine weitere Quelle für Mikrokerne sind alle Schädigungen der DNA, die zur Fragmentierung durch z.B Doppelstrangbrüche führen (Fenech 2000). Mikrokerne kommen in gesunden Zellen sehr selten vor, können aber nach Exposition mit einer genotoxischen Substanz drastisch erhöht werden. Kommt es nach Exposition zu einer signifikanten Erhöhung der Mikrokernkernfrequenz über die Spontanrate hinaus, so ist von einer gentoxischen Wirkung der Testsubstanz auszugehen und in den nachfolgenden Generationen mit vererbaren genetischen Schäden zu rechnen. Das Auftreten von Mikrokernen wird somit als Maß für den zytogenetischen Schäden angesehen (Fenech 2000). Zytogenetische Schäden sind bei karzinomatösen Zellen vorhanden. Deshalb werden Substanzen, die im erhöhten Maße Mikrokerne hervorrufen als potentiell karzinogen betrachtet.



Abb. 9:Möglichkeiten der Mikrokernentstehung: 1) Klastogene (strukturelle) DNA-Schäden2) Aneugene (numerische) DNA-Schäden 3) Auslösen der Apoptose (modifizert nach Fenech 2000).

Kriterien zur Klassifikation von Mikrokernen im klassischen Mikrokerntest von Countryman und Heddle (1976):

- sie gleichen morphologisch dem Zellkern und haben einen Durchmesser max. 1/3 des Hauptkerndurchmessers
- sie besitzen eine glatte, runde oder ovale Form
- sie berühren und überlappen nicht den Zellkern und sind nicht über eine nukleoplasmatische Brücke mit diesem verbunden
- die Farbintensität des Mikrokerns entspricht der des Kernes
- die Fokussierungsebene des Mikrokerns liegt bei der Detektion in etwa auf der des Zellkernes
- der Mikrokern befindet sich im gemeinsamen Cytoplasma mit dem Zellkern

Diese Bewertungsmaßstäbe fanden auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung. Dabei wurde die sogenannte Einzelkernmethode angewandt. Es wurden alle einkernigen Zellen mit einem Mikrokern nach den o. g. Kriterien ausgezählt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Zur Anfärbung der Zellen wurde Giemsa-Lösung verwendet. Bei der Auswertung unter dem Lichtmikroskop wurden pro Versuchsansatz 1000 Zellen ausgezählt und die dabei detektierten Mikrokerne notiert.



Abb. 10: Lichtmikroskopische Fotographie einer Zelle mit typischen Mikrokern (Fenech et al. 2003)

In den Mikrokerntests wurden V79-Zellen (V79, K) und daraus selektierte Klone (K4, K6, K7, K8, K9) nach einer 4 tägigen Kultivierung ohne Arsenit jeweils Arsenit-Konzentrationen von 1,5 μ M, 3 μ M, 6 μ M, 12 μ M und 25 μ M für 24h ausgesetzt. Es wurden nicht klonierte V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79), nicht klonierte V79-Zellen mit einer 6-wöchigen 10 μ M Arsenit-Vorbehandlung (K) und Arsenit-resistente V79-Klone (K4, K6, K7,

K8, K9) mit einer 6-wöchigen Arsenit-Vorbehandlung nach der Klonierung auf eine Mikrokernbildung nach Exposition der jeweiligen Arsenit-Konzentration untersucht.

3.13.1 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco w/o):

NaCl	137,0 mM	8 g		
NaH ₂ PO ₄	6,5 mM	1,44 g		
KCl	2,7 mM	0,2 g		
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,2 g		
Aqua bidest.		ad 1 l		
		pH-Wert 7,0		
Hypotonische Lösung:				
KCl	0,07 M	4 Teile		
NaCl 0,9 %	0,15 M	1 Teil		
Die Lösung wurde unmittelt	oar vor dem Gebrauc	h hergestellt und im Wasserbad für ca.		
15 min auf 37 °C erwärmt.				
<u>Carnoy-Fixativ-Lösung:</u>				
Essigsäure 99,8 %	1 Teil	10 ml		
Methanol	9 Teile	90 ml		
Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und für ca. 30 min bei -200 C kühl				
gelagert.				
<u>Sörensen-Puffer I:</u>				
KH ₂ PO ₄		9,08 g		
Aqua bidest.		ad 1 1		
Sörensen-Puffer II:				
Na ₂ HPO ₄		11,88 g		
Aqua bidest.		ad 1 1		

Beide Puffer können mehrere Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Giemsa-Gebrauchslosung (<u>5 %1g) Gurr®:</u>	
Sörensen-Puffer I	1 Teil	40 ml
Sörensen-Puffer II	1 Teil	40 ml
Giemsa-Lösung	0,1 Teil	4 ml

(FALL) O

Die Gebrauchslösung wurde unmittelbar vor der Färbung angesetzt und sollte innerhalb von 30 min aufgebraucht werden.

Depex-Einschlussmittel (Gurr®):

mit Xylol (Isomerengemisch)

<u>.</u>

A 1

1 1...

3.13.2 Herstellung von Mikrokernpräparaten aus V79-Zellenkulturen

Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm (28,27 cm² Grundfläche) mit 5 ml Kulturmedium (s. 3.1.1.) ausplattiert und anschließend für insgesamt 4 Tage in Begasungsbrutschränken inkubiert. Nach 24 h Inkubation mit der jeweiligen Arsenit-Konzentration wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS-Puffer (s. 3.1.1.) gewaschen und mit 500 µl Trypsin zum Ablösen gebracht. Nach einer 5 minütigen Inkubation wurden die Zellen zusammen mit dem Trypsin und 1 ml PBS in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde anschließend für 10 min bei 155 × g und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment vorsichtig unter tropfenweiser Zugabe des ersten ml der hypotonischen Lösung (s. 3.12.1.) unter Schütteln resuspendiert, um eine möglichst schonende Zellschwellung zu erreichen. Anschließend konnte die Zellsuspension zügig mit den restlichen 5 ml der hypotonischen Lösung versetzt werden.

Nach einer 5-minütigen Hypotoniezeit wurde der Ansatz erneut für 10 min bei $155 \times g$ und 20 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 6 ml von -20 °C vorgekühltem Carnoy-Fixativ (s. 3.12.1.) resuspendiert, wobei der erste ml erneut tröpfchenweise unter Schütteln der Zellsuspension zugeführt wurde. Für die anschließende Fixierung der Zellen wurde die Suspension mindestens 1,5 h. bei 4 °C kühl gelagert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 155 × g und 20 °C wurde das Sediment anschließend erneut in 6 ml auf -20 °C vorgekühltem Carnoy-Fixativ resuspendiert, wobei der erste ml wieder tröpfchenweise unter Schütteln der Zellsuspension zugeführt wurde. Es folgte eine Fixierung der Zellen bei 4 °C für 30 min. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 155 × g und 20 °C wurde das Sediment mit einer Pipette aus ca. 10 cm Höhe auf mit Ethanol gereinigte -20 °C vorgekühlte

Objektträger aufgetropft. Die beschichteten Objektträger wurden danach auf einer 40 °C warmen Heizplatte getrocknet und konnten anschließend durch eine 15-minütige Beschichtung mit 5 % (v/v) Giemsa-Lösung (s. 3.12.1.) angefärbt werden. Nach der Färbung wurden die Präparate mit A.Dest abgespült und luftgetrocknet. Zur langfristigen Aufbewahrung erfolgte am nächsten Tag die Einbettung mit Depex-Einschlussmittel.

Für jede Konzentration der Testsubstanzen wurde zweimal ein Doppelansatz angefertigt und mikroskopisch nach den Kriterien von Fenech (1997) ausgewertet. Es wurden bei einer 400fachen Vergrößerung 1000 Zellen auf Mikrokerne untersucht. Bei der Auszählung musste ein Mikrokern morphologisch und farblich mit dem Zellkern identisch sein, durfte den Zellkern nicht berühren oder überlappen und nicht über eine nukleoplasmatische Brücke mit diesem verbunden sein. Ein Mikrokern konnte sich nicht dunkler darstellen als der Zellkern selber und einen Durchmesser max. 1/3 des Hauptkerndurchmessers aufweisen.

4 Ergebnisse

Im Folgenden findet sich eine Übersicht der eingesetzten V79-Zellen und daraus selektierten Zellklone:

V79	nicht klonierte V79-Zellen, ohne Substanz-Vorbehandlung
	(wenn nicht im jeweiligen Versuch angegeben)
K	nicht klonierte V79–Zellen nach 6-wöchiger 10 µM
	Arsenit-Inkubation
	in den Versuchen 4.9.4 bis 4.9.6:
	nicht klonierte V79-Zellen nach 4-wöchiger 10 μ M
	Dimethylarsonsäure-Inkubation
K4, K6, K7, K8, K9	klonierte V79-Zellen, die 8 Wochen vor der Klonierung mit 10 μ M
	Arsenit und 6 Wochen nach der Klonierung mit 10 µM Arsenit
	inkubiert wurden
	in den Versuchen 4.9.4 bis 4.9.6:
	klonierte V79-Zellen, die 8 Wochen vor der Klonierung mit 10 μ M
	Arsenit und 4 Wochen nach der Klonierung mit 10 µM Dimethyl-
	arsonsäure inkubiert wurden

Die folgenden Versuchsergebnisse wurden mit den oben genannten V79-Zellen erhoben. Die Ergebnisse zeigten mittels Neutralrot-Assay eine erhöhte Resistenz gegenüber Arsenit sowie eine Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin und zeigten das veränderte genotoxische Potential von Arsenit an den vorbehandelten V79-Zellen mit Hilfe des Mikrokerntestes (s. Kap. 4.1 bis 4.3).

Weiter wird die Ermittlung der Oligonukleotid-Hybridisierungssonden, die für den Nachweis der Mrp1-mRNA von V79-Zellen im Northern Blot eingesetzt werden konnten, dargestellt (s. Kap. 4.4. bis 4.9). Zum Schluß erfolgt die Auswertung der ermittelten relativen Mrp1-mRNA-Expression [%] der V79-Zellen und daraus selektierten Zellklone unter verschiedenen Inkubationsbedingungen mit Arsenit (As^{III}) und Dimethylarsonsäure (DMA^V) (s. Kap. 4.9.1 bis 4.9.6).

4.1 Untersuchung der Arsenit-Resistenz in V79-Zellen und daraus selektierten Klonen mittels Neutralrot-Assay

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vergleichenden Zytotoxizität von Arsenit in den unterschiedlich behandelten Zellen bzw. Klonen beschrieben. Der Wert der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Alle weiteren Angaben sind Relativwerte im Vergleich zu dieser Kontrolle. In den Abbildungen 11 bis 16 sind jeweils 3 Mittelwerte aus je n=6 Einzelmessungen der drei Versuchsreihen pro Arsenit-Konzentrationen aufgetragen sowie der Mittelwert dieser drei Werte angegeben. Letztere Werte wurden dann mittels Linie graphisch verbunden.



Abb. 11

Abb. 12

Abb.11: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) und Arsenit vorbehandelten nicht klonierten V79-Zellen (K).

Abb. 12: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) und dem Arsenit-resistenten V79-Klon K4 (K4).

Es wurden 3 relative Mittelwerte aus je n=6 Einzelmessungen der drei Versuchsreihen pro Arsenit-Konzentrationen aufgetragen und der Mittelwert dieser drei relativen Werte verbunden. Der Mittelwert der Negativkontrolle wurde gleich 100% gesetzt.

In Abbildung 11 ist die Neutralrot-Aufnahme von V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) sowie nichtklonierte Zellen mit 6-wöchiger 10 μ M Arsenit-Vorbehandlung (K) dargestellt. Diese Gegenüberstellung der beiden V79-Zellen stellt die Induzierbarkeit einer Arsen-Resistenz dar. Wie Abb. 11 zu entnehmen ist, liegt der 50%-Wert der Neutralrot-

Aufnahme (effektive Dosis 50%, ED50) der V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) im Vergleich zu den vorbehandelten Zellen (K) zwischen einer Arsenit-Exposition von 12 und 24 μ M. Die ED50 der nicht-klonierten Zellen mit 6-wöchiger 10 μ M Arsenit-Vorbehandlung (K) liegt zwischen 24 und 50 μ M und damit höher. In den Abbildungen 12 bis 16 erfolgt die Gegenüberstellung der nach der Klonierung und für 6 Wochen mit 10 μ M Arsenit vorbehandelten selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) zu den V79-Zellen ohne Arsenit-Vorinkubation (V79).



Abb. 13

Abb. 14

Abb. 13: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) und dem Arsenit-resistenten V79-Klon K6 (K6).

Abb. 14: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) und demArsenit-resistenten V79-Klon K7 (K7).

Es wurden 3 relative Mittelwerte aus je n=6 Einzelmessungen der drei Versuchsreihen pro Arsenit-Konzentrationen aufgetragen und der Mittelwert dieser drei relativen Werte verbunden. Der Mittelwert der Negativkontrolle wurde gleich 100% gesetzt.

Die ED50 der V79-Zellklone lag im Vergleich zur Kontrolle (V79) bei höheren Arsenit-Konzentrationen. K6 zeigt eine ED50 bei einer Exposition von 75 μ M Arsenit (Abb. 13). Der V79-Klon K7 zeigt in Abb. 14 bei einer Arsenit-Konzentration von bis zu 100 μ M eine etwas mehr als 50% ige Neutralrot-Aufnahme.



Abb. 15

Abb. 16

Abb. 15: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) und dem Arsenit-resistenten V79-Klon K8 (K8).

Abb. 16: Neutralrot-Aufnahme nach Arsenit-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) und dem Arsenit-resistenten V79-Klon K9 (K9).

Es wurden 3 relative Mittelwerte aus drei Versuchsreihen mit 6 photometrischen Messungen pro Arsenit-Kkonzentration aufgetragen und der Mittelwert dieser drei Werte graphisch verbunden. Die Negativkontrolle wurde gleich 100% gesetzt

Die V79-Klone K8 und K9 (Abb. 15 und 16) wiesen wie K4 und K7 bis zu einer Arsenit-Konzentration von 100 µM noch eine über 50 %ige Neutralrot-Aufnahme auf, bei K9 lag die ED50 etwa bei 100 µM Arsenit. In Bezug auf die ED50 lagen die Arsenit-Konzentrationen während der 24h Inkubation bei den eingesetzten V79-Klonen zweifach bis fünffach oberhalb der Kontrolle (V79). Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass die erhobenen Messdaten eindeutige Hinweise auf eine vorliegende Arsenit-Resistenz der V79-Zellklone liefern, wobei besonders die Klone K4, K7, K8 und K9 eine höhere Resistenzausprägung aufzuweisen schienen.

4.2 Untersuchung der Cisplatin-Resistenz in V79-Klonen mittels Neutralrot-Assay

Platinverbindungen wie Cisplatin finden therapeutische Anwendung als Zytostatika. Bei Chemotherapeutika-Resistenzen gegen Cisplatin wurden Kreuzresistenzen gegen Arsenit und Cadmium festgestellt (Cole et al. 1994, Ishikawa et al. 1996). Es ist mittlerweile bekannt, dass die humane erworbene Cisplatin-Resistenz durch Transportproteine aus der Familie der ABC-Proteine vermittelt werden können: MRP1 und MRP2. Wang Z et al. zeigten diese Kreuzresistenz gegen Cisplatin ebenfalls 1996 in Arsenit-resistenten V79-Zellen.

Um festzustellen, ob die generierten Arsenit-resistenten V79-Klone gleichzeitig eine Resistenz gegen Cisplatin besitzen, wurden die V79-Zellen (V79, K) und daraus selektierten Klone (K4, K6, K7, K8, K9) mittels Neutralrot-Assay bezüglich der zytotoxischen Wirkungen von Cisplatin (CPDD) untersucht.

In dieser Versuchsreihe wurden V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79), V79-Zellen mit einer 6-wöchigen 10 µM Arsenit-Vorbehandlung (K) und Arsenit-resistente V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) mit einer 6-wöchigen Arsenit-Vorbehandlung nach der Klonierung auf eine Cisplatin-Resistenz untersucht. Die Abbildungen 17 bis 22 stellen die Neutralrot-Assays zur Untersuchung der Cisplatin-Resistenz der V79-Zellen dar. Pro Zelle wurde ein Neutralrot-Assay durchgeführt, bei dem pro untersuchter Cisplatin-Konzentration 6 Werte photometrisch ermittelt werden konnten.

In den Abbildungen 17 bis 22 sind die relativen Mittelwerte aus je n=6 Einzelmessungen der Versuchsreihe pro Cisplatin-Konzentrationen aufgetragen und mittels Linie graphisch verbunden. Der Wert der Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt und der Mittelwert der 6 Werte wurde prozentual zur Kontrolle berechnet.



Abb. 17

Abb. 18

- Abb. 17: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu nicht klonierten mit Arsenit vorinkubierten V79-Zellen (K).
- Abb. 18: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K4 (K4).

Gezeigt sind relative Mittelwerte aus einer Versuchsreihe mit 6 Meßwiederholungen pro Cisplatin-Konzentrationen. Der Mittelwert der Negativkontrollen wurden jeweils 100% gesetzt.

Wie Abb.17 zu entnehmen ist, lag die ED50 der V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) bei einer Exposition zwischen 6 und 12 μ M Cisplatin (CPDD). Die nichtklonierten Zellen mit 6-wöchiger 10 μ M Arsenit-Vorbehandlung (K) zeigten im Vergleich dazu erst bei einer Cisplatin-Inkubation bei etwas unter 75 μ M eine 50% ige Neutralrot-Aufnahme. Somit lag möglicherweise eine Induzierbarkeit der Cisplatin-Resistenz bei den V79-Zellen mit einer 6-wöchigen 10 μ M Arsenit-Vorbehandlung (K) vor. Der V79-Klon K4 (s. Abb. 18) zeigte bei einer Inkubation mit 100 μ M Cisplatin noch eine über 50% ige Neutralrot-Aufnahme, was auf eine ausgeprägte Resistenz hinweist, wobei aber Schwankungen im Kurvenverlauf die Ableitung einer ED50 erschweren.



Abb. 19

Abb. 20

Abb. 19: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K6 (K6).

Abb. 20: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K7 (K7).

Gezeigt sind relative Mittelwerte aus einer Versuchsreihe mit 6 Meßwiederholungen pro Cisplatin-Konzentrationen. Der Mittelwert der Negativkontrollen wurden jeweils 100% gesetzt.

In den Abbildungen 18 bis 22 wurde die Neutralrot-Aufnahme von nichtklonierten V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) den Arsenit-resistenten V79-Klonen (K4, K6, K7, K8, K9) gegenübergestellt.

Die ED50 des V79-Klones K6 (Abb. 19) lag in einem ähnlichen Bereich wie die der nichtklonierten Zellen mit 6-wöchiger Arsenit-Vorbehandlung (K) in Abbildung 17. Der V79-Klon K7 (Abb.20.) zeigte bei einer Cisplatin-Exposition zwischen 75 und 100 μ M eine 50% ige Neutralrot-Aufnahme (ED50).



Abb. 21

Abb. 22

- Abb. 21: Neutralrot-Aufnahme als nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenitresistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K8 (K8).
- Abb. 22: Neutralrot-Aufnahme nach Cisplatin-Inkubation (24h) bei nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K9 (K9).

Gezeigt sind relative Mittelwerte aus einer Versuchsreihe mit 6 Meßwiederholungen pro Cisplatin-Konzentrationen. Der Mittelwert der Negativkontrollen wurden jeweils 100% gesetzt.

Für den V79-Klon K8 (Abb. 21) zeigt sich für den Meßpunkt bei 50 μ M ein Wert, der eine ED50 schwerer abschätzen lässt. Lässt man diesen Wert ausser Betracht, lässt sich eine ED50 bei 25 μ M Cisplatin abschätzen. Der V79-Klon K9 (Abb. 22) zeigte bei einer Cisplatin-Exposition zwischen 75 und 100 μ M eine 50% ige Neutralrot-Aufnahme (ED50).

In Bezug auf die erhobenen Messdaten kann von einer Cisplatinkreuzresistenz der V79-Zellklone (K4, K6, K7, K8 und K9) gesprochen werden. Wie in den vorausgegangenen Neutralrot-Assay-Untersuchungen bezüglich einer Arsenit-Resistenz (s. Kap. 4.1.) konnten bei mehreren der V79-Klone, insbesondere bei K7 und K9, erneut eine erhöhte Resistenz bestätigt werden, wobei die Kurvenverläufe auf eine unterschiedliche Ausprägung der Resistenz hindeuteten.

4.3 Untersuchung der Arsenit-Genotoxizität in V79-Klonen mittels Mikrokerntest

Die Versuche in den Abbildungen 23 bis 28 stellen Untersuchungen zur Genotoxizität von Arsen bei V79-Zellen mittels des Mikrokerntests dar. Pro Zelle wurden 2 Versuche mit Doppelbestimmungen durchgeführt, so dass pro Arsenit-Konzentration 4 Werte erhalten wurden. Von den Doppelbestimmungen eines Versuchses wurde jeweils ein Mittelwert berechnet. Aus diesen 2 Mittelwerten wurde schließlich erneut der gemittelte Wert berechnet und mittels Linie in der Graphik verbunden.

Die nicht klonierten unbehandelten V79-Zellen (V79) dienten als Kontrolle, um im Vergleich zu prüfen, wie sich die Arsenit-Resistenz der Klone auf die Ausprägung von Mikrokernen und somit auf die genotoxischen Wirkungen von Arsenit auswirkt.



Abb. 23

Abb. 24

- Abb. 23: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu nicht klonierten V79-Zellen mit einer 6-wöchigen 10 μM Arsenit-Vorbehandlung (K).
- Abb. 24: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K4 (K4).

Gezeigt sind 2 Mittelwerte aus Doppelbestimmungen aus zwei Versuchen. Der gemittelte Wert beider Mittelwerte wurde graphisch verbunden.

Um die Induzierbarkeit einer potentiellen Mikrokerninhibition nach 6-wöchiger Arsenitbehandlung zu prüfen, wurden die 6 Wochen mit Arsenit vorinkubierten, nicht klonierten V79-Zellen (K) den nicht klonierten und unbehandelten V79-Zellen (V79) in Abb. 23 gegenübergestellt.

Wie in Abbildung 23 zu entnehmen ist, bildeten die nicht klonierten V79-Zellen mit einer 6wöchigen 10 μ M Arsenit-Vorbehandlung (K) im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) ab einer Arsenit-Konzentration von 1,5 μ M nur eine unwesentlich geringere Anzahl von Mikrokernen. Somit konnte in Bezug auf die Mikrokerninhibition nach 6 wöchiger Arsenit-Inkubation der V79-Zellen (K) keine eindeutige Induktion gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu ließ sich bei dem V79-Klon K4 ab einer Arsenit-Konzentration von $1,5 \mu$ M eine geringere Mikrokernrate im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) feststellen (Abb. 24).



Abb. 25

Abb. 26

- Abb. 25: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K6 (K6).
- Abb. 26: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K7 (K7).

Gezeigt sind 2 Mittelwerte aus Doppelbestimmungen aus zwei Versuchen. Der gemittelte Wert beider Mittelwerte wurde graphisch verbunden.

Neben K4 zeigten die V79-Klone K6, K7 und K8 im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) ab einer Arsenit-Konzentration von 1,5 μ M eine geringere Mikrokernanzahl (Abb. 25, Abb. 26 und Abb. 27). Bei K6 war der Unterschied nur schwach ausgeprägt. Bei K9 ließ sich erst ab einer Arsenit- Konzentration von 12 μ M ein deutlicherer Unterschied beobachten (vgl. Abb. 28).

Am deutlichsten ausgeprägt waren die Unterschiede zwischen den Arsenit-resistenten V79-Klonen und der Kontrolle (V79) bei einer Arsenit-Konzentration von 25 μ M. Bei dieser Arsenit-Konzentration bildeten die nicht klonierten V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) über 60 Mikrokerne pro 1000 ausgezählten Zellen, bei den Arsenit-resistenten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) waren zwischen 32 und 45 Mikrokerne pro 1000 ausgezählten Zellen nachweisbar. Im Fisher Exakt Test waren diese Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant (p<0,05) bis auf den Wert von 45 Mikrokernen (p=0,07).



Abb. 27

Abb. 28

- Abb. 27: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K8 (K8).
- Abb. 28: Induktion von Mikrokernen nach 24h Arsenit-Inkubation in nicht klonierten unbehandelten V79-Zellen (V79) im Vergleich zu dem Arsenit-resistenten V79-Klon K9 (K9).

Gezeigt sind 2 Mittelwerte aus Doppelbestimmungen aus zwei Versuchen. Der gemittelte Wert beider Mittelwerte wurde graphisch verbunden.

Aufgrund dieser erhobenen Messwerte lässt sich die Aussage machen, dass die Arsenitresistenten V79-Klone im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) insgesamt tendenziell weniger Mikrokernbildung bei steigenden Arsenit-Konzentrationen zeigten. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass sich die Arsenit-Resistenz der V79-Klone auf die Ausprägung von Mikrokernen und somit auf die genotoxischen Wirkungen von Arsenit auswirken könnte.

4.4 Sequenzgegenüberstellung für MRP1/Mrp1-Teilsequenzen in Mensch (hu), Maus (m) und Ratte (r)

Zur Auswahl von Oligonukleotidsonden wurden die bisher bekannten, der EMBL Datenbank entnommenen MRP1/Mrp1 cDNA-Sequenzen aus Mensch (hu), Maus (m) und Ratte (r) gegenübergestellt (s.Tab.1). Es wurde vermutet, dass die Mrp1-Sequenzen des Chinesischen Hamsters einen hohen Grad an Homologie mit entsprechenden cDNA-Bereichen des Menschen (hu), der Maus (m) und der Ratte (r) aufweisen würden und daher übereinstimmende Bereiche als PCR-Primer verwendet werden könnten (s. 3.7.3.). Im mittleren Sequenzbereich konnten zwei konservierte 22 bp lange Bereiche gefunden werden, die als Entwurf der entsprechenden **Primer** dienten: **Mrp1for1** und **Mrp1rev3** (s. Abb. 29).

Mrp1for1

mMrp1	AAGTGGATGTCATCATTGTCATGAGTGGCGGCAAGATCTCAGGAGTGGGTTCTTATCAGGAGCTGCTAGACCGGGATGGG 2	2580
rMrpl	AAGTGGATGTCATCATTGTCATGAGTGGCGGCAAGATCTCAGGAGATCTTATCAGGAGCTGCTAGACCGGGATGGG 2	2622
huMRP1	AGGTGGACGTCATCATCG <mark>TCATGAGTGGCGGCAAGATCTC</mark> TGAGATGGGCTCCTACCAGGAGCTGCTGGCTCGAGACGGC 2	2776
	******* * * * * * * * * * * * * * * * *	
mMrp1	GCCTTCGCTGAGTTCCTGCGCACCTATGCCAACGCTGAGCAGGACCTGGCCTCGGAGGATGACAGTGTCAG	2651
rMrpl	GCCTTTGCTGAGTTCGTGCGCACCTATGCCAACACTGAGCAGGACCTGGCTTCAGAGGATGACAGTAAGAATGGTGTCAG	2702
huMRP1	GCCTTCGCTGAGTTCCTGCGTACCTATGCCAGCACAGAGCAGGAGCAGGAGGAGAGAGGAGGAGGAG	2856
	***** ******* **** ******** * * *******	
mMrp1	TGGTTCAGGGAAGGAGTCAAAGCCGGTGGAAAATGGGATGCTGGTGACAGACA	2731
rMrpl	TGGTTTAGGGAAGGAGTCAAAGCCGGTGGAAAATGGGATACTGGTGACAGACGCAGTAGGGAAGCCCCTGCAGAGGCATC	2782
huMRP1	CGGTCCAGGGAAGGAAGCAAAGCAAATGGAGAATGGCATGCTGGTGACGGACAGTGCAGGGAAGCAACTGCAGAGACAGC 2	2936
	*** ****** ***** **** **** ** ***** *** *** *** *** *** ****	
mMrp1	TCAGCAACTCGTCTTCCCACAGTGGGGATACCAGCCAGCAACACAGCAGCATAGCCGAACTGCAGAAGGCTGGAGCTAAG 2	2811
rMrpl	TCAGCAACTCTTCTTCCCACAGTGTGGTTACTAACCAGCAGCACAGCAGCAGCCGAGCTGCAGAAGTCTGGAGTTAAG 2	2862
huMRP1	TCAGCAGCTCCTCCTATAGTGGGGACATCAGCAGGCACCACAACAGCACCGCAGAACTGCAGAAAGCTGAGGCCAAG	3016
	***** *** ** *** * **** ** * * *** **** ****	
mMrp1	GAGGAGACGTGGAAGCTAATGGAAGCAGACAAGGCCCAGACAGGGCAGGTGCAGCTGTCAGTGTACTGGAACTACAT	2888
rMrpl	GAGGAGACTTGGAAGCTGATGGAAGCAGACAAGGCCCAGACAGGGCAGGTGAAGCTTTCCGTGTACTGGAACTACAT	2939
huMRP1	AAGGAGGAGACCTGGAAGCTGATGGAGGCTGACAAGGCGCAGACAGGGCAGGTCAAGCTTTCCGTGTACTGGGACTACAT	3096
	****** ******* ***** * ***** * ******* ****	
mMrp1	GAAGGCCATTGGCCTCTTCATCACCTTCTTGAGTATCTTCCTTTTCCTGTGCAACCATGTATCTGCACTGGCCTCTAACT 2	2968
rMrpl	GAAGGCCATTGGCCTCTGCATCTCCTTTGAGTATCTTCCTTTTCCTGTGCAATCATGTATCTGCACTGGCTTCTAACT	3019
huMRP1	GAAGGCCATCGGACTCTTCATCTCCTTCCTCAGCATCTTCCTTTTCATGTGTAACCATGTGTCCGCGCTGGCTTCCAACT	3176
	******* ** **** **** **** * ** ********	
mMrp1	ATTGGCTGAGCCTCTGGACAGATGACCCCCCTGTTGTCAATGGGACTCAGGCGAACAGGAATTTTCGGCTGAGTGTCTAT	3048
rMrp1	ATTGGCTGAGTCTCTGGACAGATGACCGCCCTGCTGTCAATGGGACTCAGGAGAACAGGAATTTTCGACTAAGTGTCTAT	3099
huMRP1	ATTGGCTCAGCCTCTGGACTGATGACCCCATCGTCAACGGGACTCAGGAGCACACGAAAGTCCGGCTGAGCGTCTAT	3253

mMrp1	${\tt GGGGCCTTGGGCATCTTGCAAGGTGCAGCAATATTTGGCTACTCCATGGCTGTGTCCATCGGGGGGCATCTTTGCCTCCCG}$	3128		
rMrp1	${\tt GGGGCCTTGGGCATCTTGCAAGGTGTGGCAGTATTTGGCTATTCCATGGCTGTGTCCATTGGGGGGCATCTTTGCCTCCCG}$	3179		
huMRP1	GGAGCCCTGGGCATTTCACAAGGGATCGCCGTGTTTGGCTACTCCATGGCCGTGTCCATCGGGGGGGATCTTGGCTTCCCG	3333		
	** *** ***** * ***** ** ***** ** ******			
mMrp1	TCGCTTGCACCTGGACCTGCTATACAATGTTCTTCGATCACCCATGAGTTTCTTCGAGCGTACACCCAGTGGGAACCTAG	3208		
rMrp1	TCGCCTGCACCTAGACCTGCTACAGAATGTCCTGCGATCACCCATGAGTTTCTTTGAGCGTACACCCAGTGGGAACCTAG	3259		
huMRP1	${\tt CTGTCTGCACGTGGACCTGCTGCACAGCATCCTGCGGTCACCCATGAGCTTCTTTGAGCGGACCCCCAGTGGGAACCTGG}$	3413		
	* ***** * ******* * * * * ** ** *******			
mMrp1	TGAACCGATTCTCCAAGGAGC <mark>TGGACACAGTGGACTCCATGAT</mark> CCCGCAGGTCATCAAGA 3268			
rMrp1	TGAACCGATTCTCCAAGGAGT <mark>TGGACACAGTGGACTCCATGAT</mark> CCCGCAGGTCATCAAGA 3319			
huMRP1	TGAACCGCTTCTCCAAGGAGC <mark>TGGACACAGTGGACTCCATGAT</mark> CCCGGAGGTCATCAAGA 3473			
	***** *********** *********************			
Mrp1rev3				

Abb. 29: Sequenzgegenüberstellung für MRP1/Mrp1-Teilsequenzen in Mensch (hu), Maus (m) und Ratte (r). Die für die PCR ausgewählten Primer-Bereiche sind gelb markiert (Mrp1for1, Mrp1rev3) (s. 3.7.3.). Die identisch ermittelten Bereiche der hier gegenübergestellten Basensequenzen sind durch die Markierung eines Sterns (*) erkennbar.

4.5 Sequenzgegenüberstellung für MRP2/Mrp2-Teilsequenzen in Mensch (hu), Maus (m) und Ratte (r)

Zur Generierung eines cDNA Abschnitts der mutmaßlichen Hamster-Mrp2-mRNA wurden genspezifische PCR-Primersequenzen gesucht. Dafür wurden die cDNA-Sequenzen der bisher bekannten MRP2/Mrp2-Sequenzen aus Mensch (hu), Maus (m) und Ratte (r) aus der EMBL Datenbank gegenübergestellt (s. Tab. 2). Es wurde ebenfalls vemutet, dass die Mrp2-Sequenzen des Hamsters einen hohen Grad an Homologie mit entsprechenden cDNA-Bereichen des Menschen (hu), der Maus (m) und der Ratte (r) aufweisen würden und daher übereinstimmende Bereiche als PCR-Primer verwendet werden könnten (s. 3.7.4.). Auch hier konnten im mittleren Sequenzbereich zwei konservierte 23 bp lange Bereiche gefunden werden, die als Entwurf der entsprechenden **Primer** dienten: **Mrp2for1** und **Mrp2rev3** (Vgl. Abb 30).

	Mrp2for1	
mMrp2	GAAGGTCGGTGTGGTGGGCAGGACCGGAGCTGGAAAAT <mark>CATCCCTCACAAACTGCCTCTTC</mark> AGAATCTTAGAGTCTGCAG	4057
rMrp2	GAAGGTCGGCGTAGTGGGCAGGACTGGGGCTGGGAAAT <mark>CATCCCTCACAAACTGCCTCTTC</mark> AGAATCTTAGAGTCTGCGG	4086
huMRP2	GAAGATTGGTGTGGTGGGCAGGACAGGAGCTGGAAAGT <mark>CATCCCTCACAAACTGCCTCTTC</mark> AGAATCTTAGAGGCTGCCG	4100
	**** * ** ** ********* ** ***** ** *****	
mMrp2	${\tt GTGGCCAGATCATCATTGATGGGATTGATATTGCCTCCATTGGACTGCACGACCTTCGAGGGAGACTGACCATCATTCCC}$	4137
rMrp2	${\tt GGGGCCAGATCATCATTGATGGGATAGATGTTGCCTCCATTGGACTGCACGACCTTCGAGAGAGGCTGACCATCATTCCC}$	4166
huMRP2	${\tt GTGGTCAGATTATCATTGATGGAGTAGATATTGCTTCCATTGGGCTCCACGACCTCCGAGAGAAGCTGACCATCATCCCC}$	4180
	* ** ***** ********* * *** **** *******	

Ergebnisse

mMrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG	4217
rMrp2	${\tt CAGGACCCCATTTTGTTCTCGGGGAGTCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATATTCAGATGAGGAGGTTTGGAG$	4246
huMRP2	${\tt CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGAAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGATTTGGAA}$	4260
	********* *****************************	
mMrp2	GGCCCTGGAATTGGCTCATCTCAAATCCTTTGTGGCTGGC	4297
rMrp2	GGCCCTGGAGTTGGCTCACCTCAGATCCTTTGTGTCTGGCCTACAGCTTGGGTTGTTATCCGAAGTGACAGAGGGTGGTG	4326
huMRP2	GGCCTTGGAGCTGGCTCACCTCAAGTCTTTTGTGGCCAGCCTGCAACTTGGGTTATCCCACGAAGTGACAGAGGCTGGTG	4340
	**** **** ****** **** ** ****** *******	
		4077
mMrp2		4377
rMrp2	ACAACCTGAGCATAGGGCAGAGGCAGCTCCTATGCCTGGGCAGGGCTGTGCTTCGAAAATCCTAGATCCTGGTCCTGGAT	4406
huMPR2	GCAACCTGAGCATAGGCCAGAGGCAGCTGCTGTGCCTGGGCAGGGCTCTGCTTCGGAAATCCAAGATCCTGGTCCTGGAT	4420

mMrp2	GAAGCCACAGCCGCAGTGGATCTAGAGACGGATAGCCTCATTCAGACGACCATCCGGAACGAGTTCTCCCCAGTGCACGGT	4457
rMrp2	GAAGCCACGGCTGCAGTGGATCTCGAGACGGATAGCCTCATTCAGACGACCATCCGAAAGGAGTTCTCCCCAGTGCACGGT	4486
huMRP2	GAGGCCACTGCTGCGGTGGATCTAGAGACAGACAGACCATCCAT	4500
	** **** ** ** ****** ***** ** * * ******	
mMrp2	CATCACTATCGCGCACAGGCTGCACACCATCATGGACAGTGACAAGATAATGGTCCTAGACAGCGGCAAGATTGTTGAAT	4537
rMrp2	${\tt CATCACCATCGCTCACAGGCTGCACACCATCATGGACAGTGACAAGATAATGGTCCTAGACAACGGGAAGATTGTCGAGT$	4566
huMRP2	${\tt GATCACCATCGCCCACAGGCTGCACACCATCATGGACAGTGACAAGGTAATGGTCCTAGACAACGGGAAGATTATAGAGT}$	4580
	***** ***** ***************************	
		4617
nimi pz		4017
rmrpz		4646
IIUMRP2		4000
mMrp2	CACACGGAGCTCTAG 4632	
rMrp2	CACACAGAGCTCTAGCAGCT 4666	
huMRP2	AGCACAAAATTCTAGCAGAA 4680	
	*** * ****	

Abb. 30: Sequenzgegenüberstellung für MRP2/Mrp2-Teilsequenzen in Mensch (hu), Maus (m) und Ratte (r). Die für die PCR ausgewählten Primer-Bereiche sind gelb markiert (Mrpfor1, Mrp2rev3) (s. 3.7.4.). Die identisch ermittelten Bereiche der hier gegenübergestellten Basensequenzen sind wieder durch die Markierung eines Sterns (*) erkennbar.

4.6 Isolierung von Mrp1- und Mrp2-cDNA-Teilsequenzen des Hamsters

Mittels reverser Transkription wurde eine cDNA-Synthese mit Hamster mRNA als Vorlage durchgeführt, um intakte cDNAs von Hamster Mrp1-mRNA bzw. Mrp2-mRNA zu generieren. Anschließend wurde diese cDNA mittels PCR amplifiziert. Dabei kamen versetzte genspezifische Primer (Mrp1for1, Mrp1rev3 bzw. Mrp2for1, Mrp2rev3) zum Einsatz. Zwecks Sequenzanalyse wurden alle PCR-Fragmente in den pCR ® XL-TOPO-Vektor ligiert und die Plasmide in elektrokompetenten *E.coli*-Zellen (s. 3.8.2.) vermehrt (s. 3.8.3.). Nach Isolierung der Plasmid-DNA aus den selektierten Bakterienkolonien (s. 3.8.4.) erfolgte eine Sequenzierung der Plasmid-Inserts (s. 3.10.1.).

Es wurden zwei PCR-Produkte in einer Länge von 683bp (Mrp1) und 560 bp (Mrp2) erhalten. Damit konnte die Existenz bzw. die Expression des *Mrp1*- bzw. des *Mrp2*-Gens in der V79-Zelle des Chinesischen Hamsters bestätigt und eine offizielle Eintragung der cDNA-Teilsequenz des Mrp1- u. Mrp2-Transporters in die Genbank (EMBL) vorgenommen werden.

4.7 Auswahl der Hybridisierungs-Oligonukleotid-Sonden aus kloniertem Mrp1-cDNA-Fragment des Hamsters

Für die Ermittlung der exakten Sequenz der klonierten Mrp1-cDNA-Fragmente wurden die cDNA inserts, die sich aus mRNA von zwei unabhängigen V79 Zell-Klonen mit hoher nachgewiesener Arsenit-Resistenz (K6, K9) bzw. aus nicht-Arsenit-resistenten Zellen (V79) ableiteten, sequenziert. Die Mrp1-cDNA-Sequenz des Hamsters wurde unter der Zugangsnummer (accession no.) AJ504425 in der Genbank EMBL abgelegt. Im hinteren Sequenzbereich des erhaltenen 683 bp langen PCR-Produktes des Hamsters konnten zwei Mrp1-cDNA-Sonden mit einem ausgewogenen Basenanteil von Guanin und Cytosin Prüfung (s. Abb.31), die mittels BLASTN ausgewählt werden nach (http://www.nbci.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast) hinsichtlich ihrer Sequenz-Spezifität als Oligonukleotid-Hybridisierungssonden für den Nachweis von Mrp1-mRNA des Hamsters geeignet waren (rev4, Mrp1rev4). Sie wurden als Hybridisierungssonden zum Nachweis spezifischer Mrp1-mRNA von V79-Zellen (Hamster) im Northern Blot eingesetzt (s. 3.11.3.).

mMrp1	AAGTGGATGTCATCATTG <mark>TCATGAGTGGCGGCAAGATCTC</mark> AGAGATGGGTTCTTATCAGGAGCTGCTAGACCGGGATGGG	2580
rMrpl	AAGTGGATGTCATCATTG <mark>TCATGAGTGGCGGCAAGATCTC</mark> AGAGATGGGATCTTATCAGGAGCTGCTAGACCGGGATGGG	2622
huMRP1	AGGTGGACGTCATCATCG <mark>TCATGAGTGGCGGCAAGATCTC</mark> TGAGATGGGCTCCTACCAGGAGCTGCTGGCTCGAGACGGC	2776
chMrp1	AGAGATGGGCTCCTACCAGGAGCTGCTAGACCAGGATGGG	40
	***** ** ** ********* * * ** **	
mMrp1	GCCTTCGCTGAGTTCCTGCGCACCTATGCCAACGCTGAGCAGGACCTGGCCTCGGAGGATGACAGTGTCAG	2651
rMrp1	${\tt GCCTTTGCTGAGTTCGTGCGCACCTATGCCAACACTGAGCAGGACCTGGCTTCAGAGGATGACAGTAAGAATGGTGTCAG}$	2702
huMRP1	${\tt GCCTTCGCTGAGTTCCTGCGTACCTATGCCAGCACAGAGCAGGAGCAGGAGCAGGAGGAGAACGGGGTCACGGGCGTCAGGGCGTCAGGGCGTCACGGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGGGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGCGTCACGGGGGCGTCACGGGGGGGG$	2856
chMrp1	GCCTTCGCCGAGTTCCTGCGCACCTATGCCAGTGCTGAGCAGGACCTGGCCTCAGAGGATAACAGTGTCAG	111
	***** ** ***** **** ******* * ****** * *	
mMrp1	TGGTTCAGGGAAGGAGTCAAAGCCGGTGGAAAATGGGATGCTGGTGACAGACA	2731
rMrp1	TGGTTTAGGGAAGGAGTCAAAGCCGGTGGAAAATGGGATACTGGTGACAGACGCAGTAGGGAAGCCCCTGCAGAGGCATC	2782
huMRP1	CGGTCCAGGGAAGGAAGCAAAGCAAATGGAGAATGGCATGCTGGTGACGGACAGTGCAGGGAAGCAACTGCAGAGACAGC	2936
chMrp1	TGGTTCTGGGAAGGAGTCAAAGCCAGTGGAGAATGGATTGCTGGTGACAGTGGGGAAATACCCTCAGAGGCATC	185

Mrp1for1

102

mMrp1	TCAGCAACTCGTCTTCCCACAGTGGGGATACCAGCCAGCAACACAGCAGCATAGCCGAACTGCAGAAGGCTGGAGCTAAG	2811
rMrp1	TCAGCAACTCTTCTTCCCACAGTGTGGTTACTAACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGAGCTGCAGAAGTCTGGAGTTAAG	2862
huMRP1	TCAGCAGCTCCTCCTATAGTGGGGACATCAGCAGGCACCACAACAGCACCGCAGAACTGCAGAAAGCTGAGGCCAAG	3016
chMrp1	TCAGCAGCTCTTCTTCCCACAGTGGGGATGCTGGCCAGCAACACAGCAGCAGCTGAACTGCAGAAGGCTGGCGCCAAG	265
	***** *** ** *** * **** ** * **** ******	
mMrp1	GAGGAGACGTGGAAGCTAATGGAAGCAGACAAGGCCCAGACAGGGCAGGTGCAGCTGTCAGTGTACTGGAACTACAT	2888
rMrp1	GAGGAGACTTGGAAGCTGATGGAAGCAGACAAGGCCCAGACAGGGCAGGTGAAGCTTTCCGTGTACTGGAACTACAT	2939
huMRP1	AAGGAGGAGACCTGGAAGCTGATGGAGGCTGACAAGGCGCAGACAGGGCAGGTCAAGCTTTCCGTGTACTGGGACTACAT	3096
chMrp1	GAGAAGGCCTGGAAGCTGATGGAAGTGGACAAGGCACAGACAG	342
	*** ** * ******* ***** * ****** * ******	
mMrp1	GAAGGCCATTGGCCTCTTCATCACCTTCTTGAGTATCTTCCTTTTCCTGTGCAACCATGTATCTGCACTGGCCTCTAACT	2968
rMrp1	GAAGGCCATTGGCCTCTGCATCTCCTTTGAGTATCTTCCTTTTCCTGTGCAATCATGTATCTGCACTGGCTTCTAACT	3019
- huMRP1	GAAGGCCATCGGACTCTTCATCTCCTTCCTCAGCATCTTCCTTTTCATGTGTAACCATGTGTCCGCGCTGGCTTCCAACT	3176
chMrp1	GAAGGCCATTGGCCTCTTCATCACCTTCTTGAGTATCTTTCTCTTTCCTATGCAACCACGTGTCTGCCCTGGCCTCCAATT	422
1	******* ** **** **** **** * ** ** **** *	
mMrp1	ATTGGCTGAGCCTCTGGACAGATGACCCCCCTGTTGTCAATGGGACTCAGGCGAACAGGAATTTTCGGCTGAGTGTCTAT	3048
rMrp1	ATTGGCTGAGTCTCTGGACAGATGACCGCCCTGCTGTCAATGGGACTCAGGAGAACAGGAATTTTCGACTAAGTGTCTAT	3099
huMRP1	ATTGGCTCAGCCTCTGGACTGATGACCCCATCGTCAACGGGACTCAGGAGCACACGAAAGTCCGGCTGAGCGTCTAT	3253
chMrp1	ACTGGCTGAGCCTCTGGACAGATGACCACCCCACTGTGAATGGGACTCAGGAGCACAGGACGTACCGACTGAGT <mark>GTCTAT</mark>	502
	* **** ** ****** ****** ** ** ** ** ****	
mMrn1		3128
rMrn1		3179
huMDD1		3333
chMrp1		582
CIMIPI		502
	Mrp1rev4	
mMrp1	TCGCTTGCACCTGGACCTGCTATACAATGTTCTTCGATCACCCATGAGTTTCTTCGAGCGTACACCCAGTGGGAACCTAG	3208
rMrpl	TCGCCTGCACCTAGACCTGCTACAGAATGTCCTGCGATCACCCATGAGTTTCTTTGAGCGTACACCCAGTGGGAACCTAG	3259
huMRP1	CTGTCTGCACGTGGACCTGCTGCACAGCATCCTGCGGTCACCCATGAGCTTCTTTGAGCGGACCCCCAGTGGGAACCTGG	3413
chMrpl	TCACCTGCACCTAGACCTGCTGCGCAAT <mark>GTCCTGCGCTCGCCCATGAGCT</mark> TCTTTGAGCGTACACCCAGCGGGAACCTAG	662
	***** * ******** * * ** ** ** ******* ****	
	Mrp1rev5	
mMrpl	TGAACCGATTCTCCAAGGAGC <mark>TGGACACAGTGGACTCCATGAT</mark> CCCGCAGGTCATCAAGA 3268	
rMrp1	TGAACCGATTCTCCAAGGAGT <mark>TGGACACAGTGGACTCCATGAT</mark> CCCCGCAGGTCATCAAGA 3319	
huMRP1	TGAACCGCTTCTCCAAGGAGC <mark>TGGACACAGTGGACTCCATGAT</mark> CCCGGAGGTCATCAAGA 3473	
chMrp1	TGAACCGCTTCTCCAAGGAGC 683	
	***** ****	

Mrp1rev3

Abb. 31: Vergleich der ermittelten Hamster-Mrp1-cDNA-Sequenz (ch) mit Sequenzgegenüberstellung für MRP1/Mrp1-Teilsequenzen in Mensch (hu), Maus (m), Ratte (r). Die ausgewählten Mrp1-cDNA-Sequenzen, die als Sonden zum Nachweis spezifischer Mrp1-mRNA von V79-Zellen (Hamster) im Northern Blot eingesetzt wurden, sind hier blau markiert (s. 3.11.3.), die ausgewählten cDNA-Primer mit einem hohen Grad an Homologie der entsprechrenden MRP1/Mrp1-cDNA-Bereiche von Maus (m), Ratte (r) und Mensch (hu) gelb markiert (s. 3.7.3.).

4.8 Auswahl der Hybridisierungs-Oligonukleotid-Sonden aus kloniertem Mrp2-cDNA-Fragment des Hamsters

Für die Ermittlung der exakten Sequenz der klonierten Mrp2-cDNA-Fragmente wurden ebenfalls cDNA inserts, die sich von mRNA aus zwei unabhängigen Zell-Klonen mit hoher nachgewiesener Arsenit-Resistenz (K6 u. K9) bzw. aus nicht Arsenit-resistenten Zellen (V79) ableiteten, sequenziert. Die Mrp2-cDNA-Sequenz des Hamsters wurde unter der Zugangsnummer (accession no.) AJ504426 in der Genbank EMBL abgelegt. Im hinteren Sequenzbereich des erhaltenen 560 bp langen Mrp2-PCR-Produkts des Hamsters konnten zwei Mrp2-cDNA-Sonden mit einem ausgewogenen Basenanteil von Guanin und Cytosin die Prüfung ausgewählt werden (s. Abb.32), nach mittels BLASTN (http://www.nbci.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast) hinsichtlich ihrer Sequenz-Spezifität als Oligonukleotid-Hybridisierungssonden für den Nachweis von Mrp2-mRNA des Hamsters geeignet waren (Mrp2rev5, Mrp2rev4). Sie wurden als Hybridisierungssonden zum Nachweis spezifischer Mrp2-mRNA von V79-Zellen (Hamster) im Nothern Blot eingesetzt (s. 3.11.4). Es ließ sich jedoch mit diesen Sonden kein Signal nachweisen.

	Mrp2for1	
mmrp2	GAAGGTCGGTGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGAAAT <mark>CATCCCTCACAAACTGCCTCTTC</mark> AGAATCTTAGAGTCTGCAG	4057
rmrp2	GAAGGTCGGCGTAGTGGGCAGGACTGGGGCTGGGAAAT <mark>CATCCCTCACAAACTGCCTCTTC</mark> AGAATCTTAGAGTCTGCGG	4086
huMRP2	GAAGATTGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	4100
chmrp2	ATCTTAGAGTCCGCGG	16
	******* * ** *	
mmrp2	${\tt GTGGCCAGATCATCATTGATGGGATTGATATTGCCTCCATTGGACTGCACGACCTTCGAGGGAGACTGACCATCATTCCC}$	4137
rmrp2	${\tt GGGGCCAGATCATCATTGATGGGATAGATGTTGCCTCCATTGGACTGCACGACCTTCGAGAGAGGCTGACCATCATTCCC}$	4166
humrp2	${\tt GTGGTCAGATTATCATTGATGGAGTAGATATTGCTTCCATTGGGCTCCACGACCTCCGAGAGAAGCTGACCATCATCCCC}$	4180
chmrp2	GTGGCCAGATCATCATTGACGGGATCGATATTGCTTCC <mark>GTTGGACTGCACGACCTTCGAG</mark> GGAAACTGACCATCATCCCC	96
	* ** ***** ****** ** * *** **** *** *** *** ** ****	
	Mrp2rev5	
mmrp2	${\tt CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG$	4217
mmrp2 rmrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATTTTGTTCTCGGGGGAGTCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATATTCAGATGAGGAGGTTTGGAG	4217 4246
mmrp2 rmrp2 humrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATTTTGTTCTCGGGGGAGTCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATATTCAGATGAGGAGGTTTGGAG CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGAAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGATTTGGAA	4217 4246 4260
mmrp2 rmrp2 humrp2 chmrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATTTTGTTCTCGGGGGGGTCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATATTCAGATGAGGAGGTTTGGAG CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGAAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGGATTTGGAA	4217 4246 4260 176
mmrp2 rmrp2 humrp2 chmrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATTTTGTTCTCGGGGGGGTCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATATTCAGATGAGGAGGTTTGGAG CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGAAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGGATTTGGAA CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTAGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGGTTTGGAA	4217 4246 4260 176
mmrp2 rmrp2 humrp2 chmrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATTTTGTTCTCGGGGGGGTCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATATTCAGATGAGGAGGTTTGGAG CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGAAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGGATTTGGAA CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTAGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGGTTTGGAA	4217 4246 4260 176
mmrp2 rmrp2 humrp2 chmrp2 mmrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATCTTGTTCTCTGGGGGGGGTCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATATTCAGATGAGGAGGATTTGGAA CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCGGATGAGGAGGATTTGGAA ********************	4217 4246 4260 176 4297
mmrp2 rmrp2 humrp2 chmrp2 mmrp2 rmrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATTTTGTTCTCGGGGGGGTCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGGATTTGGAG CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGGATTTGGAA CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTAGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGGATTTGGAA ********************	4217 4246 4260 176 4297 4326
mmrp2 rmrp2 humrp2 chmrp2 chmrp2 mmrp2 rmrp2 humrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGGATTTGGAA CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTAGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGGATTTGGAA CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTAGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGGATTTGGAA ********************	4217 4246 4260 176 4297 4326 4340
mmrp2 rmrp2 humrp2 chmrp2 mmrp2 rmrp2 humrp2 chmrp2 chmrp2	CAGGACCCCATTTTGTTCTCTGGGAATCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATACTCGGATGAGGAGATCTGGAG CAGGACCCCATCTTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAAATATTCAGATGAGGAGGATTTGGAA CAGGACCCCATCCTGTTCTCTGGGAGCCTGAGGATGAATCTCGACCCTTTCAACAACTACTCAGATGAGGAGGATTTGGAA ********************	4217 4246 4260 176 4297 4326 4340 256

Mrp2rev4

mmrp2	${\tt acaacctgagcatagggcagaggcagctcctatgcctgggtagggctgtgcttcgaaaatccaaaatcctggtcctggat}$	4377
rmrp2	${\tt A} {\tt C} {\tt A} {\tt C} {\tt A} {\tt C} {\tt A} {\tt G} {\tt G} {\tt C} {\tt A} {\tt G} {\tt G$	4406
huMRP2	${\tt GCAACCTGAGCATAGGCCAGAGGCAGCTGCTGTGCCTGGGCAGGGCTCTGCTTCGGAAATCCAAGATCCTGGTCCTGGAT}$	4420
chMrp2	ACAACCTGAGCATAGGGCAGAGGCAGCTCCTGTGCCTGGGCAGGGCTCTGCTTCTAAAATCTAAAATCCTGATCCTGGAT	336
	******* ***** ********** ** ****** ** *	
mMrp2	${\tt GAAGCCACAGCCGCAGTGGATCTAGAGACGGATAGCCTCATTCAGACGACCATCCGGAACGAGTTCTCCCAGTGCACGGT$	4457
rMrp2	${\tt GAAGCCACGGCTGCAGTGGATCTCGAGACGGATAGCCTCATTCAGACGACCATCCGAAAGGAGTTCTCCCAGTGCACGGT}$	4486
huMRP2	${\tt GAGGCCACTGCTGCGGTGGATCTAGAGACAGACAGACCATCCAT$	4500
chMrp2	${\tt Gaggctacagctgctgctgcagaccagacagccagacagccttattcagacgaccatccggaatgagttctccaactgcacagt}$	416
	** ** ** ** ** ****** * *** ** * *** ****	
mMrp2	${\tt CATCACTATCGCGCACAGGCTGCACACCATCATGGACAGTGACAAGATAATGGTCCTAGACAGCGGCAAGATTGTTGAAT}$	4537
rMrp2	${\tt Catcaccatcgctcacaggctgcacaccatcatggacagtgacaagataatggtcctagacaacgggaagattgtcgagt}$	4566
huMRP2	${\tt GATCACCATCGCCCACAGGCTGCACCACCATCATGGACAGTGACAAGGTAATGGTCCTAGACAACGGGAAGATTATAGAGT}$	4580
chMrp2	${\tt CATCACCATCGCCCACAGGCTGCACACCATCATGGACAGTGACAAGATAATGGTCCTAGACAGTGGGAAGATTGTGGAAT$	496
	**** ***** ****************************	
	Mrp2rev3	
mMrp2	ACGGCAGTCCTGAAGAACTGCTGTCCAATATGGGTCCCTTCTACTT <mark>GATGGCCAAGGAAGCCGGCATTG</mark> AAAGTGTGAAC	4617
rMrp2	ATGGCAGTCCTGAAGAACTGCTGTCCAACAGAGGTTCCTTCTATCT <mark>GATGGCCAAGGAAGCCGGCATTG</mark> AAAATGTGAAT	4646
huMRP2	GCGGCAGCCCTGAAGAACTGCTACAAATCCCTGGACCCTTTTACTT <mark>TATGGCTAAGGAAGCTGGCATTG</mark> AGAATGTGAAC	4660
chMrp2	ACGGCAGTCCTGAGGAACTGATGTCCAAAACAGGTCCCTTTTATTTGATGGCCAAGGAAGCCCG	576
	**** **** ***** * * * ** ** * * **** ** ****	
mmrp2	CACACGGAGCTCTAG 4632	
rMrp2		
nuMRP2	AGCACAAAATTCTAGCAGAA 4680	
cnMrp2	560	

Abb. 32: Vergleich der ermittelten Hamster-Mrp2-cDNA-Sequenzen (ch) mit Sequenzgegenüberstellung für MRP2/Mrp2-Teilsequenzen in Mensch (hu), Maus (m), Ratte (r). Die ausgewählten Mrp2-cDNA-Sequenzen, die als Sonden zum Nachweis spezifischer Mrp2-mRNA von V79-Zellen (Hamster) im Northern Blot eingesetzt wurden, sind hier blau markiert (s. 3.11.4), die ausgewählten cDNA-Primer mit einem hohen Grad an Homologie der entsprechrenden Mrp2-cDNA-Bereiche von Maus (m), Ratte (r) und Mensch (hu) gelb markiert (s. 3.7.4).

4.9 Untersuchung der relativen Mrp1-mRNA-Expression in kultivierten V79-Zellen und daraus selektierten Klonen in Anwesenheit von Arsenit (As^{III}) oder Dimethylarsonsäure (DMA^V)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der im Northern-Blot nachgewiesenen Mrp1-mRNA-Signale der untersuchten V79-Zellen (V79, K) und daraus selektierten Klone (K4, K6, K7, K8, K9) dargestellt.

In den Kapiteln 4.9.1 bis 4.9.6 (Abb. 33 bis 38) wurde die Induktion der Mrp1-RNA-Expression [%] der selektierten V-79-Zellen unter dem Einfluß der Vorinkubation mit Arsenit (As^{III}) bzw. Dimethylarsonsäure (DMA^V) untersucht. Die einzelnen V79-Zellen erhielten, wie auf S.88 bereits beschrieben, jeweils eine bestimmte Vorbehandlung (s. S. 88, Kapitel 4). In den Diagrammen wurde die relative Mrp1-mRNA-Expression [%], der unklonierten V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79), der unklonierten für 6 Wochen mit Arsenit vorbehandelten V-79-Zellen (K) und die der selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) dargestellt.

Zur Ermittlung der Mrp1-mRNA-Signalintensitäten des Hamsters (chMrp1) konnten mittels Vergleich der bekannten MRP1/Mrp1-Sequenzen von Mensch (huMRP1), Maus (mMrp1) und Ratte (rMrp1) 2 genspezifische **Mrp1-Hybridisierungssonden** ermittelt und eingesetzt werden: **Mrp1rev4** und **Mrp1rev5** (s. Kapitel 4.4 und 4.7). Beide Sonden wurden unterschiedlich für den Mrp1-mRNA-Nachweis eingesetzt. **Mrp1rev4** wurde in den Versuchen 4.9.1, 4.9.2 und 4.9.5. verwendet. Der Mrp1-mRNA-Nachweis mittels **Mrp1rev5**-Sonde wurde in den Versuchen 4.9.3, 4.9.4 sowie 4.9.6 durchgeführt. Die jeweilig eingesetzte c-DNA-Sonde wurde in den Versuchsüberschriften angegeben.

Für den Mrp2-mRNA-Nachweis des Hamsters (chMrp2) wurden ebenfalls genspezifische Mrp2-cDNA-Sonden generiert und eingesetzt (s. Kapitel 4.5 und 4.8). Diese zeigten jedoch mittels der ausgewählten genspezifischen Mrp2-mRNA-Hybridisierungssonden (Mrp2rev5 und Mrp2rev4) kein Signal im Northern Blot und wurden in den folgenden Darstellungen nicht berücksichtigt. Die nach Hybridisierung erhaltenen Signalintensitäten, die mittels der genspezifischen Mrp1-Hybridisierungssonden **Mrp1rev4** bzw. **Mrp1rev5** gemessen werden konnten, wurden bezüglich der β-Aktin-Expression normalisiert. Die unklonierten für 6 Wochen mit Arsenit vorbehandelten V-79-Zellen (K) wurden als Kontrollwert der relativen mRNA-Expression in V79-Zellen verwendet und jeweils gleich 100% gesetzt. Die relative Mrp1-mRNA-Expression der V79-Klone (K4, K6, K7, K8 und K9) wurde prozentual bezogen auf diesen Wert dargestellt (s. Kapitel 4.9.1 bis 4.9.6).

4.9.1 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev4-Sonde: V79-Zellen und nach As^{III}-Inkubation selektierte Klone mit 4-tägiger As^{III}-Kultivierung vor der RNA-Isolierung



Abb. 33: Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach einer 4tägigen Zellkultur mit As^{III} (V79) im Vergleich zu V79-Zellen (K) und daraus selektierten Klonen (K, K4, K6, K7, K8, K9). Die Arsenit-Konzentration betrug 10 μM während der Kultivierung. Die nach Hybridisierung mit der Mrp1-genspezifischen Sonde des Hamsters Mrp1rev4 erhaltenen Signalintensitäten wurden bezüglich der β-Aktin-Expression normalisiert und die Kontrollwerte K wurden jeweils gleich 100% gesetzt.



Blotbild: Northern Blot Analyse. Die Bindung radioaktiver Sonden wurde mit Hilfe eines Imaging Systems sichtbar gemacht (s. Kapitel 3.11.5).

Der ß-Aktin- bzw. Mrp1-mRNA-Nachweis erfolgte mittels Hybridisierung ausgewählter genspezifischer Oligonukleotidsonden für Mrp1 (s. Abb. 31). Die erste Hybridisierung wurde mit Mrp1rev4 durchgeführt, anschließend erfolgte eine Rehybridisierung mit einer ß-Aktin-mRNA spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente die Ethidiumbromidfärbung von 18S und 28S rRNA, sowie die ß-Aktin-mRNA-Expression als mRNA-Kontrolle. Je Wert wurden 25 µg Gesamt -RNA eingesetzt.

In Versuch 4.9.1 wurde die relative Mrp1-mRNA Expression [%] von V79-Zellen (V79, K) und daraus selektierten Klonen (K4, K6, K7, K8, K9) nach einer 4-tägigen As^{III}-Inkubation untersucht. Bei den aufgeführten V79-Zellen K, K4, K6, K7, K8, K9 handelt es sich um bereits vorbehandelte Zellen. Die selektierten Arsenit-resistenten V79 Klone (K4, K6, K7, K8, K9) wurden 8 Wochen vor der Klonierung sowie 6 Wochen nach der Klonierung mit 10 µM Arsenit kultiviert. Sie wurden vor der Durchführung der RNA-Isolierung wie alle in diesem Versuch aufgeführten V79-Zellen (V79, K, K4, K6, K7, K8, K9) 4 Tage in Anwesenheit von 10 µM Arsenit kultiviert (siehe S.88, Kapitel 4).

Die Northern-Blot-Analyse zeigte bei den 4 Tage mit Arsenit behandelten V79-Zellen (V79) keine nachweisbare Mrp1-mRNA-Expression.

Die nicht klonierten V79-Zellen (K), die eine 6 wöchige Arsenit-Inkubation vor mRNA-Isolierung erhalten hatten, wurden im Vergleich zu den 4-tägig mit Arsenit behandelten V79-Zellen (V79) dargestellt, um die Induzierbarkeit einer Arsenit-Resistenz nach Arsenit-Exposition und die Beeinflussung auf die Mrp1-mRNA-Expression nach Arsenit-Exposition zu prüfen.

Die unklonierten für 6 Wochen mit 10 µM Arsenit vorbehandelten V-79-Zellen (K) wurden als Kontrollwert der relativen mRNA-Expression in V79-Zellen verwendet, jeweils gleich 100% gesetzt und die dazu berechnete relative Mrp1-mRNA-Expression der V79-Klone (K4, K6, K7, K8 und K9) graphisch dargestellt.

Der Mrp1-mRNA-Nachweis wurde mittels der ausgewählten genspezifischen Oligonukleotidsonde **Mrp1rev4** (s.Tab. 5) durchgeführt. Die selektierten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) zeigten in diesem Versuch alle höhere Mrp1-mRNA-Gehalte im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen (K). Eine höhere Expression der Mrp1- mRNA des Klons K8 gegenüber den Kontrollzellen (K) wurde nur in diesem Versuchsansatz (4.9.1) festgestellt. In allen folgenden Versuchsprotokollen war die Expression im Klon 8 erniedrigt (Beschreibung siehe weiter unten).

In diesem Versuch waren bei dem Klon K8 um den Faktor 3,2 erhöhte Gehalte der Mrp1mRNA nachweisbar. Bei den Klonen K9 und K6 lagen um die Faktoren 4,3 bzw. 4,6 erhöhte relative Mrp1-mRNA-Gehalte vor. Die höchsten Mrp1-mRNA-Gehalte konnten bei den Klonen K4 und K7 mit einer Erhöhung um den Faktor 6,3 bzw. 9,2 nachgewiesen werden.

Bei den V79-Klonen K4 und K7 ließ sich bereits im Neutralrot-Assay eine starke Arsenitund Cisplatin-Resistenz (s. Kapitel 4.1 und 4.2) ermitteln, was einen potentiellen Zusammenhang mit der Erhöhung der nachgewiesenen relativen Mrp1-mRNA-Expression dieser V-79 Klone darstellen könnte.
Andererseits konnte bei dem V79-Klon K8 eine eher niedrige Mrp1-mRNA-Expression im Vergleich zu den anderen V79-Klonen festgestellt werden, obwohl sich dieser V79-Klon im Neutralrot-Assay mit einer ausgeprägten Arsenit-Resistenz darstellte. Dies kann darauf hinweisen, dass den verschiedenen Arsen-Resistenzen weitere Mechanismen als nur der des Mrp1-Transporter zugrunde liegen.

4.9.2 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev4-Sonde: V79-Zellen und nach As^{III}-Inkubation selektierte Klone ohne As^{III}-Kultivierung bis zur RNA-Isolierung



Abb. 34: Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach einer 4tägigen Zellkultur ohne Substanzkontakt (V79) im Vergleich zu den vorinkubierten V79-Zellen (K) und daraus selektierten Klonen (K4, K6, K7, K8, K9). Die nach Hybridisierung mit der genspezifischen Mrp1-Sonde des Hamsters Mrp1rev4 erhaltenen Signalintensitäten wurden bezüglich der ß-Aktin-Expression normalisiert und die Kontrollwerte K wurden jeweils gleich 100% gesetzt



Blotbild: Northern Blot Analyse. Die Bindung radioaktiver Sonden wurde mit Hilfe eines Imaging Systems sichtbar gemacht (s.Kapitel 3.11.5).

Der ß-Aktin- bzw. Mrp1-mRNA-Nachweis erfolgte mittels Hybridisierung ausgewählter genspezifischer Oligonukleotidsonden für Mrp1 (s. Abb. 31). Die erste Hybridisierung wurde mit Mrp1rev4 durchgeführt, anschließend erfolgte eine Rehybridisierung mit einer ß-Aktin-mRNA spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente die Ethidiumbromidfärbung von 18S und 28S rRNA, sowie die ß-Aktin-mRNA-Expression als mRNA-Kontrolle. Je Wert wurden 25 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

Die Besonderheit des Versuches 4.9.2 besteht in der Ermittlung der relativen Mrp1-mRNA Expression [%] der V79-Zellen und der daraus selektierten Klone nach einer 4-tägigen Kultivierung ohne Arsenit. Diese Arsenit-freie Phase bezieht sich lediglich auf den Zeitraum der Kultivierung vor der RNA-Isolierung. Alle aufgeführten V79-Zellen (K, K4, K6, K7, K8, K9) hatten vor der Kultivierung wie in der einleitenden Beschreibung dargestellt (siehe S. 88, Kapitel 4), jeweils eine Vorbehandlung mit Arsenit erhalten.

Die Northern-Blot-Analyse erlaubte in diesem Fall bei den komplett auch in der Vorbehandlung nicht mit Arsenit behandelten V79-Zellen (V79) einen Nachweis der Mrp1mRNA-Expression von 40% bezogen auf die Kontrollzellen (K). Die mRNA-Expression der nicht klonierten V79-Zellen (K), die eine 6 wöchige As^{III}-Inkubation vor RNA-Isolierung erhalten hatten, wurde erneut auf 100% gesetzt und die dazu berechnete relative Mrp1mRNA-Expression der V79-Klone (K4, K6, K7, K8 und K9) graphisch dargestellt.

Die selektierten V79 Klone (K4, K6, K7, K8, K9) wurden 8 Wochen vor der Klonierung sowie 6 Wochen nach der Klonierung mit 10 μ M As^{III} kultiviert. Die Arsenit-Konzentration betrug konstant 10 μ M während dieser Inkubation. Die vorbehandelten V79-Klone wurden, wie oben beschrieben, ebenfalls 4 Tage ohne Arsenit kultiviert, bevor die für diesen Versuch verwendete RNA isoliert wurde.

Der Mrp1-mRNA-Nachweis erfolgte mittels der ausgewählten Oligonukleotidsonde **Mrp1rev4** (s.Tab. 5). Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4, K6, K7 und K9 zeigten in dem Versuch 4.9.2 höhere Mrp1-mRNA-Gehalte im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen (K). K8 zeigte im Northern Blot eine Mrp1-mRNA-Expression von 60% und lag damit in seiner relativen mRNA-Expression niedriger als die nicht klonierten V79-Zellen (K). Bei dem Klon K4 konnten um den Faktor 1,5 erhöhte Mrp1-mRNA-Gehalte nachgewiesen werden. Bei den V79-Klonen K6 und K9 lag eine Erhöhung der Mrp1-mRNA-Gehalte um den Faktor 2,9 bzw. 2,8 vor. Am deutlichsten zeigte sich in diesem Versuch eine Erhöhung der Mrp1-mRNA-Gehalte bei K7 (um den Faktor 3,3).

Obwohl sich der V79-Klon K8 im Neutralrot-Assay mit einer ausgeprägten Arsenit-Resistenz dargestellt hatte, war in diesem Versuch eine niedrigere relative Mrp1-mRNA-Expression im Vergleich zu den anderen V79-Klonen festgestellt worden.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass sich nach 4-tätiger Inkubation in Abwesenheit von Arsenit die Differenz zwischen der Mrp1-mRNA-Expressionshöhe in Kontrollzellen (K) gegenüber der Expressionshöhe in den Zellklonen verminderte, also die Tendenz der Angleichung der Expressionshöhen sich bemerkbar machte. 4.9.3 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev5-Sonde: V79-Zellen und nach As^{III}-Inkubation selektierte Klone ohne As^{III}-Kultivierung bis zur RNA-Isolierung



Abb. 35: Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach einer 4tägigen Zellkultur ohne Substanzkontakt (V79) im Vergleich zu den vorinkubierten V79-Zellen (K) und daraus selektierten Klonen (K4, K6, K7, K8, K9). Die nach Hybridisierung mit der genspezifischen Mrp1-Sonde des Hamsters Mrp1rev5 erhaltenen Signalintensitäten wurden bezüglich der β-Aktin-Expression normalisiert und die Kontrollwerte K wurden jeweils gleich 100% gesetzt.



Blotbild: Northern Blot Analyse. Die Bindung radioaktiver Sonden wurde mit Hilfe eines Imaging Systems sichtbar gemacht (s. Kapitel 3.11.5)

Der ß-Aktin- bzw. Mrp1-mRNA-Nachweis erfolgte mittels Hybridisierung ausgewählter genspezifischer Oligonukleotidsonden für Mrp1 (s. Abb. 31). Die erste Hybridisierung wurde mit Mrp1rev5 durchgeführt, anschließend erfolgte eine Rehybridisierung mit einer ß-Aktin-mRNA spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente die Ethidiumbromidfärbung von 18S und 28S rRNA, sowie die ß-Aktin-mRNA-Expression als mRNA-Kontrolle. Je Wert wurden 25 µg Gesamt -RNA eingesetzt.

Der gezeigte Versuch 4.9.3 in Abb. 35 unterscheidet sich nun in der ausgewählten genspezifischen Oligonukleotidsonde **Mrp1rev5** für den Mrp1-mRNA-Expression-Nachweis (s. Tab.8). Ansonsten entsprach der Versuchsaufbau in 4.9.3. dem in Versuch 4.9.2 (Abb. 34). Die V79-Zellen K, K4, K6, K7, K8, K9 erhielten vor der Kultivierung, wie in der einleitenden Beschreibung dargestellt (siehe S. 88, Kapitel 4), jeweils Arsenit-Vorbehandlung.

Alle aufgeführten V79-Zellen (V79, K, K4, K6, K7, K8, K9) wurden vor der Durchführung der RNA-Isolierung 4 Tage ohne Arsenit kultiviert.

Die Northern-Blot-Analyse erlaubte in diesem Versuch bei den V79-Zellen (V79) einen Nachweis der Mrp1-mRNA-Expression in Höhe von 50%. Damit konnte erneut mittels der genspezifischen Oligonukleotidsonde **Mrp1rev5**, wie bereits in Versuch 4.9.2., bei den V79-Zellen eine physiologische Mrp1-mRNA-Expression ohne vorherige Arsenit-Exposition (V79) nachgewiesen werden.

Die nicht klonierten V79-Zellen (K), die eine 6 wöchige Arsenit-Inkubation vor RNA-Isolierung erhielten, wurden erneut gleich 100% gesetzt und die dazu berechnete relative Mrp1-mRNA-Expression der V79-Klone (K4, K6, K7, K8 und K9) graphisch dargestellt. Die selektierten V79 Klone (K4, K6, K7, K8, K9) wurden 8 Wochen vor der Klonierung sowie 6 Wochen nach der Klonierung mit 10 µM Arsenit kuliviert. Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4, K6, K7 und K9 zeigten höhere Mrp1-mRNA-Gehalte im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen (K). K8 zeigte im Northern Blot eine Mrp1-mRNA-Expression von 90% und lag in seiner relativen mRNA-Expression etwa auf dem Niveau der nicht klonierten V79-Zellen (K). Bei dem Klon K4 konnten um den Faktor 1,6 erhöhte Gehalte der Mrp1-mRNA nachgewiesen werden. Bei den Klonen K6, K7 und K9 lagen um die Faktoren 2,9 bzw. 3 erhöhte Mrp1-mRNA-Gehalte vor.

Trotz Einsatz verschiedener Oligonukleotidsonden (Mrprev4 bzw. Mrp1rev5) ist eine Parallelität der Ergebnisse zu Versuch 4.9.2 zu beobachten, was für die Sequenz-Spezifität der verwendeten Sonden bezüglich des *Mrp1*-Gens des Hamsters spricht, und den jeweiligen Nachweis der Mrp1-mRNA-Expression bestätigt.

Hinsichtlich dieser Ergebnisse soll darauf hingewiesen werden, dass sich bereits bei den V79-Klonen K7 und K9 im Neutralrot-Assay eine ausgeprägte Arsenit- und Cisplatin-Resistenz (s. Kap 4.1 und 4.2) ermitteln ließ und dass dieses im potentiellen Zusammenhang mit der Erhöhung der nachgewiesenen relativen Mrp1-mRNA-Expression dieser V-79 Klone stehen könnte. Bei dem V79-Klon K8 wurde eine gegenüber der Kontrolle (K) erniedrigte Mrp1mRNA-Expression nachgewiesen, obwohl sich der V79-Klon K8 im Neutralrot-Assay als Arsenit-resistent darstellte. Bei dem V79-Klon K6 konnten in diesem Versuch um den Faktor 3 erhöhte Mrp1-mRNA-Gehalte nachgewiesen werden, obwohl dieser bezüglich der nachgewiesenen Resistenzen im Neutralrot-Assay eher eine geringe ausgeprägte Resistenz zeigte. Somit lässt sich auch nach diesem Ergebnis vermuten, dass den verschiedenen Arsen-Resistenzen weitere Mechanismen als nur der des hier untersuchten Mrp1-Transporters zugrunde liegen. 4.9.4 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev5-Sonde: V79-Zellen (K) und selektierte Klone nach 4-wöchiger DMA^V-Inkubation und anschließender 4-tägiger Kultivierung ohne DMA^V vor RNA-Isolierung



Abb. 36: Diagramm Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach einer 4tägigen Zellkultur ohne Substanz (V79) im Vergleich zu V79-Zellen nach 4-wöchiger DMA^V-Inkubation (K, K4, K6, K7, K8, K9) vor RNA-Isolierung. Die nach Hybridisierung mit der genspezifischen Mrp1-Sonde des Hamsters Mrp1rev5 erhaltenen Signalintensitäten wurden bezüglich der β-Aktin-Expression normalisiert und die Kontrollwerte K wurden jeweils gleich 100% gesetzt.



Blotbild: Northern Blot Analyse. Die Bindung radioaktiver Sonden wurde mit Hilfe eines Imaging Systems sichtbar gemacht (s. 3.11.5)

Der ß-Aktin- bzw. Mrp1-mRNA-Nachweis erfolgte mittels Hybridisierung ausgewählter genspezifischer Oligonukleotidsonden für Mrp1 (s. Abb. 31). Die erste Hybridisierung wurde mit Mrp1rev5 durchgeführt, anschließend erfolgte eine Rehybridisierung mit einer ß-Aktin-mRNA spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente die Ethidiumbromidfärbung von 18S und 28S rRNA, sowie die ß-Aktin-mRNA-Expression als mRNA-Kontrolle. Je Wert wurden 25 µg Gesamt -RNA eingesetzt.

In dem Versuch 4.9.4 wurde ein neuer Ansatz zur Untersuchung der Arsenit-Resistenz in V79-Zellen unternommen. Dimethylarsonsäure (DMA^V) entsteht als ein Produkt während der Arsenitmetabolisierung. In diesem Versuch sollte die Arsen-Resistenz und die damit vermutete Regulierung der Mrp1-mRNA-Expression der klonierten V79-Zellen unter einer DMA^V-Inkubation untersucht werden.

Der Versuch 4.9.4 basiert auf den Vermutungen, DMA^V besäße als ein relevantes metabolisches Ausscheidungsprodukt potentielle koordinative Wirkungen auf die Mrp1mRNA-Expression bei klonierten Arsenit-resistenten V79-Zellen (K4, K6, K7, K8 und K9) sowie nicht klonierten V79-Zellen (V79, K).

Alle aufgeführten V79-Zellen (K, K4, K6, K7, K8, K9) erhielten eine Arsenit-Vorbehandlung, die in der einleitenden Beschreibung dargestellt wurde (siehe Kapitel 4). Die nicht klonierten V79-Zellen (K) erhielten eine 4 Wöchige Inkubation mit 10 μ M DMA^V. Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) wurden 8 Wochen vor der Klonierung mit 10 μ M Arsenit sowie 4 Wochen nach der Klonierung mit 10 μ M DMA^V kultiviert.

Schließlich wurden alle oben beschriebenen V79-Zellen (V79, K, K4, K6, K7, K8, K9) 4 Tage ohne toxische Substanz kultiviert, bevor die RNA-Isolierung durchgeführt wurde. Die Mrp1-mRNA-Expression der nicht klonierten V79-Zellen (K), die eine 4-wöchige DMA^V-Inkubation vor dem Versuch erhalten hatten, wurden erneut gleich 100% gesetzt und die dazu berechnete relative Mrp1-mRNA-Expression der V79-Klone (K4, K6, K7, K8 und K9) graphisch dargestellt.

Der Mrp1-mRNA-Nachweis erfolgte mittels der ausgewählten genspezifischen Oligonukleotidsonde **Mrp1rev5** (s.Tab. 8). Die 4-tägig ohne Substanz behandelten V79-Zellen (V79) zeigten in diesem Versuch einen Nachweis der Mrp1-mRNA-Expression von 90% gegenüber den Kontrollzellen (K) und lagen somit in ihrer relativen mRNA-Expression etwa auf dem Niveau der nicht klonierten V79-Zellen (K).

Die Arsenit-resistenten V79-Klone K4, K6, K7 und K9 zeigten höhere Mrp1-mRNA-Gehalte im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen (K). K8 zeigte im Northern Blot im Vergleich zur Kontrolle Mrp1-mRNA-Gehalte von 70% und lag somit mit relativem mRNA-Gehalt etwas niedriger als die nicht klonierten V79-Zellen (K). Bei dem Klon K4 konnten relative 1,5-fach erhöhte Gehalte an Mrp1-mRNA nachgewiesen werden. Bei den Klonen K6 und K9 lagen um die Faktoren 2 bzw. 1,7 erhöhte Mrp1-mRNA-Gehalte vor. Am deutlichsten war in diesem Versuch die Mrp1 mRNA Expression bei K7 erhöht, mit einem 3,2-fachen Gehalt gegenüber den Kontrollzellen (K). Trotz Einsatz verschiedener Oligonukleotidsonden (Mrprev4 bzw. Mrp1rev5) ist eine Parallelität der Ergebnisse zu Versuch 4.9.2 und 4.9.3 zu beobachten, was für die Sequenz-Spezifität der verwendeten Sonden bezüglich des *Mrp1*-Gens des Hamsters spricht, und den jeweiligen Nachweis der Mrp-mRNA-Expression bestätigt.

Die bereits dargestellte Arsenit- und Cisplatin-Resistenz der V79-Klone K4, K7 und K9 (siehe Kap.4.1 und 4.2) könnte in einem potentiellen Zusammenhang mit der Erhöhung der relativen Mrp1-mRNA-Expression in diesem Versuch stehen. Der V79-Klon K8 stellte sich in diesem Versuch mit einer niedrigen Mrp1-mRNA-Expression von nur 70% dar, obwohl bei dem V79-Klon K8 im Neutralrot-Assay eine ausgeprägte Arsenit-Resistenz festgestellt werden konnte.

In dem vorherigen Versuch 4.9.2 waren bei den V79-Klonen K6 und K9 mit einer Arsenit-Inkubation vor und nach der Klonierung im Vergleich zu einer 4-wöchigen DMA^V -Behandlung nach der Klonierung höhere Mrp1-mRNA-Gehalte nachweisbar. Somit zeigte sich, dass die Expression des *Mrp1*-Gen unter DMA^Vzwar schwächer ausgeprägt war, ein grundsätzlicher bzw. großer Unterschied aber nicht vorhanden zu sein scheint. 4.9.5 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev4-Sonde: V79-Zellen (K) und selektierte Klone nach 4-wöchiger Kultur mit DMA^V und anschließender 24-stündiger Kultivierung mit DMA^V vor RNA-Isolierung



Abb. 37: Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach einer 24h-Inkubation mit DMA^V (V79) im Vergleich zu V79-Zellen (K, K4, K6, K7, K8, K9), die nach 4-wöchiger DMA^V-Inkubation drei Tage ohne DMA^V kultiviert wurden und erneut 24h vor RNA-Isolierung gegenüber DMA^V exponiert wurden. Die nach Hybridisierung mit der genspezifischen Mrp1-Sonde des Hamsters Mrp1rev4 erhaltenen Signalintensitäten wurden bezüglich der β-Aktin-Expression normalisiert und die Kontrollwerte K wurden jeweils gleich 100% gesetzt.



Blotbild: Northern Blot Analyse. Die Bindung radioaktiver Sonden wurde mit Hilfe eines Imaging Systems sichtbar gemacht (s. 3.11.5)

Der β-Aktin- bzw. Mrp1-mRNA-Nachweis erfolgte mittels Hybridisierung ausgewählter genspezifischen Oligonukleotidsonden für Mrp1 (s. Abb. 31). Die erste Hybridisierung wurde mit der Sonde Mrp1rev4 durchgeführt, die zweite Hybridisierung (Rehybridisierung) mit Mrp1rev5 (s. 4.9.6), anschließend erfolgte eine Rehybridisierung mit einer β-Aktin-mRNA spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente die Ethidiumbromidfärbung von 18S und 28S rRNA, sowie die β-Aktin-mRNA-Expression als mRNA-Kontrolle. Je Wert wurden 25 µg Gesamt -RNA eingesetzt. In dem gezeigten Versuch 4.9.5 wurde die Arsenit-Resistenz und die damit vermutete Regulierung der Mrp1-mRNA-Expression der klonierten Arsenit-resistenten (K4, K6, K7, K8 und K9) und nicht klonierten V79-Zellen (V79, K) unter einer DMA^V-Inkubation untersucht.

Dieser Versuch zeichnet sich durch eine 24h-Inkubation mit DMA^V vor der RNA-Isolierung aus. Alle aufgeführten V79-Zellen (K, K4, K6, K7, K8, K9) erhielten eine Vorbehandlung (siehe Kapitel 4).

Die nicht klonierten V79-Zellen (K) wurden einer 4-wöchigen Inkubation mit 10 μ M DMA^V unterzogen, bevor diese weiterkultiviert wurden. Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) wurden 8 Wochen vor der Klonierung mit 10 μ M Arsenit sowie 4 Wochen nach der Klonierung mit 10 μ M DMA^V kultiviert. Schließlich wurden alle oben beschriebenen V79-Zellen (V79, K, K4, K6, K7, K8, K9) 3 Tage ohne jegliche toxische Substanz kultiviert, bevor die Zugabe von 10 μ M DMA^V für 24h vorgenommen wurde.

Durch diese Untersuchung sollte ein Vergleich der Mrp1-mRNA-Expression nach unterschiedlichen Inkubationszeiten von DMA^V vorgenommen werden, um gegebenenfalls einen reversiblen Resistenzmechanismus bzw. eine Regulierung der Mrp1-mRNA-Expression der V79-Zellen zu erfassen. Des Weiteren sollte in diesem Versuch ein Vergleich der V79-Zellen nach einem 4-tägigen expositionsfreien Intervall zu den V79-Zellen mit einer nach 3 Tagen durchgeführten Kultur und anschließender 24h-Exposition erfolgen.

Außerdem wurde bei nachgewiesener Arsenit-Resistenz der klonierten V79-Zellen der Einfluss einer DMA^V-Langzeitinkubation und deren Einfluss auf die Mrp1-mRNA-Expression untersucht.

Die nicht klonierten V79-Zellen (K), die eine 4-wöchige DMA^V-Inkubation vor dem Versuch erhalten hatten, wurden auf 100% gesetzt und die dazu berechnete relative Mrp1-mRNA-Expression der V79-Klone (K4, K6, K7, K8 und K9) graphisch dargestellt. Der Mrp1-mRNA-mRNA-Nachweis erfolgte mittels der ausgewählten genspezifischen Oligonukleotidsonde **Mrp1rev4** (s.Tab. 8).

Die Northern-Blot-Analyse erlaubte in diesem Versuch bei den 24h-DMA^V inkubierten V79-Zellen (V79) einen Nachweis der Mrp1-mRNA-Expression von 30% gegenüber den Kontrollen (K).

Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4, K6, K7 und K9 zeigten höhere Mrp1mRNA-Gehalte im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen (K). K8 zeigte im Northern Blot eine Erniedrigung der Mrp1-mRNA-Gehalte auf 30% der nicht klonierten V79-Zellen (K). Bei den Klonen K9 und K6 konnten um den Faktor 1,5 bzw. 1,9 erhöhte Gehalte der relativen Mrp1-mRNA nachgewiesen werden. Die V79-Klone K7 und K4 zeigten einen erhöhten Mrp1-mRNA-Gehalt um den Faktor 2,5 bzw. 2,7.

Die V79-Klone K4, K7 und K9, die eine nachgewiesene Arsenit-und Cisplatin-Resistenz (s. Kap.4.1 und 4.2) besaßen, zeigten die am stärksten ausgeprägten relativen Mrp1-mRNA-Expressionen in diesem Versuch, welche im potentiellen Zusammenhang mit dem dafür verantwortlichen Arsenit-Transporter stehen könnten. Es ist unklar, warum der V79-Klon K7 in den Versuchen mit einer 4-wöchigen DMA^V-Inkubation und anschließender expositionsfreier 4-tägiger Kultivierung eine höhere Mrp1-Expression der mRNA aufweist (s. 4.9.4) als der Klon K7 mit einer angeschlossenen 24h DMA^V-Inkubation (s. 4.9.5).

4.9.6 Ermittlung der Mrp1-mRNA-Expression mittels Mrp1rev5-Sonde: V79-Zellen (K) und selektierte Klone nach 4-wöchiger Kultur mit DMA^V und anschließender 24-stündiger Kultivierung mit DMA^V vor RNA-Isolierung



Abb. 38: Diagramm: Die relative Mrp1-mRNA-Expression [%] von V79-Zellen nach einer 24h-Inkubation mit DMA^V (V79) im Vergleich zu V79-Zellen (K, K4, K6, K7, K8, K9), die nach 4-wöchiger DMA^V-Inkubation drei Tage ohne DMA^V kultiviert wurden und erneut 24h vor RNA-Isolierung gegenüber DMA^V exponiert wurden. Die nach Hybridisierung mit der genspezifischen Mrp1-Sonde des Hamsters Mrp1rev5 erhaltenen Signalintensitäten wurden bezüglich der β-Aktin-Expression normalisiert und die Kontrollwerte K wurden jeweils gleich 100% gesetzt.



Blotbild: Northern Blot Analyse. Die Bindung radioaktiver Sonden wurde mit Hilfe eines Imaging Systems sichtbar gemacht (s. Kapitel 3.11.5).

Der ß-Aktin- bzw. Mrp1-mRNA-Nachweis erfolgte mittels Hybridisierung ausgewählter genspezifischen Oligonukleotidsonden für Mrp1 (s. Abb. 31). Die erste Hybridisierung wurde mit der Sonde Mrp1rev4 (s. 4.9.5) durchgeführt, die zweite Hybridisierung (Rehybridisierung) mit Mrp1rev5, anschließend erfolgte eine Rehybridisierung mit einer ß-Aktin-mRNA spezifischen Sonde. Als Beladungskontrolle diente die Ethidiumbromidfärbung von 18S und 28S rRNA, sowie die ß-Aktin-mRNA-Expression als mRNA-Kontrolle. Je Wert wurden 25 µg Gesamt -RNA eingesetzt Der gezeigte Versuch 4.9.6 in Abb. 38 wurde unter gleichen Bedingungen wie der Versuch 4.9.5 in Abb. 37 vorgenommen, mit dem Unterschied der ausgewählten genspezifischen Oligonukleotidsonde **Mrp1rev5** für den Mrp1-mRNA-Expressions-Nachweis (s. Tab.8).

Es erfolgte erneut die Untersuchung der potentiellen Wirkungen einer DMA^{V-}Inkubation auf die Mrp1-mRNA-Expression bei nicht klonierten V79-Zellen (V79, K) und klonierten Arsenit-resistenten (K4, K6, K7, K8 und K9). Es erhielten alle verwendenten V79-Zellen (V79, K, K4, K6, K7, K8, K9) während der 4-tägigen Kultivierung nur in den letzten 24h vor der RNA-Isolierung eine Inkubation mit 10 µM DMA^V. Die nicht klonierten V79-Zellen (K) erhielten eine 4-wöchige Inkubation mit 10 µM DMA^V, bevor diese weiterkultiviert wurden. Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) wurden 8 Wochen vor der Klonierung mit 10 µM Arsenit sowie 4 Wochen nach der Klonierung mit 10 µM DMA^V kultiviert.

Schließlich wurden alle oben beschriebenen V-79-Zellen (V79, K, K4, K6, K7, K8, K9) 3 Tage ohne jegliche toxische Substanz kultiviert, bevor die Zugabe von 10 µM DMA^V für 24 h vorgenommen wurde. Die nicht klonierten V79-Zellen (K), die eine 4-wöchige DMA^V-Inkubation vor RNA-Isolierung erhielten, wurden gleich 100% gesetzt und die dazu relative Mrp1-mRNA-Expression der V79-Klone (K4, K6, K7, K8 und K9) abgeleitet. Der Mrp1mRNA-Nachweis erfolgte mittels der ausgewählten genspezifischen Oligonukleotidsonde **Mrp1rev5** (s.Tab. 8).

Die Northern-Blot-Analyse erlaubte in diesem Versuch bei den 24h behandelten DMA^V-V79-Zellen (V79) einen Nachweis der Mrp1-mRNA-Expression von 60% gegenüber den Kontrollen. Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4 und K7 waren in diesem Versuch die einzigen V79-Klone mit höheren Mrp1-mRNA-Gehalten im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen (K). Die V79-Klone K6, K8 und K9 zeigten im Northern Blot eine niedrigere Mrp1-mRNA-Expression als die nicht klonierten V79-Zellen (K). Der Klon K8 zeigte um den Faktor 5 niedrigere Mrp1-mRNA-Gehalte (20% des Kontrollwertes) im Vergleich zu den nicht klonierten V79-Zellen (K), während bei K6 quasi keine Unterschiede im Vergleich zu beobachten waren (90% des Kontrollwertes K). Bei dem Klon K4 konnte ein um den Faktor 1,5 relativ erhöhter Mrp1-mRNA-Gehalt nachgewiesen werden, bei dem Klon 7 lag eine 1,2- fach relativ kaum erhöhte Mrp1-mRNA-Expression vor. In diesem Versuch hier untersuchten Arsenit-resistenten Klone nach 4-wöchiger DMA^Vergab sich für die Kultivierung und anschließender 24h-Inkubation mit DMA^V eine niedrigere mRNA-Expression des Mrp1 als bei den V79-Klonen nach 6-wöchiger Arsenitkultivierung und anschließender 4-tägiger Arsenit-Inkubation (s. Kapitel 4.9.1).

5 Ergebnisüberblick

Zunächst wurde mittels Neutralrot-Assay geprüft, ob die nicht klonierten V79-Zellen (V79, K) und die daraus selektierten Klone (K4, K6, K7, K8, K9) eine erhöhte Resistenz gegenüber der Zytotoxizität von Arsenit und Cisplatin aufwiesen. Für einen Vergleich hinsichtlich der Empfindlichkeit zwischen den verschiedenen selektierten Klonen wurde der 50%-Wert der Neutralrot-Aufnahme im Neutralrot-Assay herangezogen. Dieser Wert wurde mit ED50 (effektive Dosis 50%) abgekürzt.

Ergebnisse bezüglich der Arsenit-Resistenz:

- In Bezug auf die Arsenit-Resistenz konnte bei den nicht klonierten Zellen (K) im Vergleich zu V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) eine Induzierbarkeit festgestellt werden.
- Die zytotoxischen Arsenit-Konzentrationen der eingesetzten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) lagen zwei- bis fünffach über denen im Neutralrot-Assay verwendeten V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (K).

Ergebnisse bezüglich der Cisplatin-Resistenz:

1. Bei den Arsenit-resistenten V79-Klonen (K4, K6, K7, K8, K9) konnte eine Kreuzresistenz zu Cisplatin nachgewiesen werden.

Ergebnisse bezüglich der Genotoxizität von Arsenit:

- In Bezug auf die Genotoxizität bzw. Mikrokernausbildung konnte bei den nicht klonierten V79-Zellen (K) im Vergleich zu den V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) keine induzierbare Resistenz/Inhibition der Mikrokernbildung nach Arsen-Exposition festgestellt werden.
- Die genotoxische Potenz von Arsenit bzw. die Bildung von Mikrokernen war in den Arsenit-resistenten V79-Klonen (K4, K6, K7, K8, K9) im Vergleich zu den V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79) generell geringer ausgeprägt.

Ergebnisse der ermittelten relativen Mrp1-mRNA-Expression der V79-Zellen:

In Versuch 4.9.1: V79-Zellen und nach As^{III}-Inkubation selektierte Klone mit 4-tägiger As^{III} Kultivierung vor der RNA-Isolierung; Mrp1-mRNA Nachweis mittels Mrp1rev4-Sonde

- 1. Die selektierten V79-Klone (K4, K6, K7, K8, K9) zeigten in diesem Versuch höhere Mrp1-mRNA-Gehalte als die nicht klonierten V79-Zellen (K).
- Die Northern-Blot-Analyse zeigte keine nachweisbare Mrp1-mRNA-Expression bei den V79-Zellen (V79).
- 3. Die V79-Klone K4 und K7 zeigten die höchsten Mrp1-mRNA-Gehalte.

In Versuch 4.9.2: V79-Zellen und nach As^{III}-Inkubation selektierte Klone; 4-tägige Kultivierung ohne As^{III} bis zur RNA-Isolierung; Nachweis von Mrp1-mRNA mittels Mrp1rev4-Sonde

 Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4, K6, K7 und K9 zeigten in diesem Versuch einen höheren Mrp1-mRNA-Gehalt als die nicht klonierten V79-Zellen (K).

In Versuch 4.9.3: V79-Zellen und nach As^{III}-Inkubation selektierte Klone; 4-tägige Kultivierung ohne As^{III} bis zur RNA-Isolierung; Nachweis von Mrp1-mRNA mittels Mrp1rev5 Sonde

 Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4, K6, K7 und K9 zeigten in diesem Versuch höhere Mrp1-mRNA-Gehalte als die nicht klonierten V79-Zellen (K).

In Versuch 4.9.4: V79-Zellen (K) und selektierte Klone nach 4-wöchiger DMA^V–Inkubation und anschließender 4-tägiger Kultivierung ohne DMA^V vor RNA-Isolierung; Nachweis von Mrp1-mRNA mittels Mrp1rev5 Sonde

1. Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4, K6, K7 und K9 zeigten höhere Mrp1-mRNA-Gehalte als die nicht klonierten V79-Zellen (K).

In Versuch 4.9.5: V79-Zellen (K) und selektierte Klone nach 4-wöchiger Kultur mit DMA^V; nach anschließender 3-tägiger Kultur ohne DMA^V erfolgte eine 24-stündige Kultivierung mit DMA^V vor RNA-Isolierung; Nachweis der Mrp1-mRNA mittels Mrp1rev4-Sonde

1. Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4, K6, K7 und K9 zeigten höhere Mrp1-mRNA-Gehalte als die nicht klonierten V79-Zellen (K).

In Versuch 4.9.6: V79-Zellen (K) und selektierte Klone nach 4-wöchiger Kultur mit DMA^V; nach anschließender 3-tägiger Kultur ohne DMA^V erfolgte eine 24-stündige Kultivierung mit DMA^V vor RNA-Isolierung; Nach weis von Mrp1-mRNA mittels Mrp1rev5-Sonde

- 1. Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K4 und K7 zeigten höhere Mrp1mRNA-Gehalte als die nicht klonierten V79-Zellen (K).
- Die selektierten Arsenit-resistenten V79-Klone K6, K8 und K9 zeigten im Northern Blot eine niedrigere Mrp1-mRNA-Expression als die nicht klonierten V79-Zellen (K).

6 Diskussion

Hinsichtlich des Arsenmetabolismus, der toxischen Effekte von Arsen sowie der Resistenzmechanismen gegenüber Arsen besteht Forschungsbedarf.

Die Untersuchung des Arsenmetabolismus gestaltet sich unter anderem aufgrund des genetischen Polymorphismus bei der Kontrolle der Methyltransferasen schwierig (Yu et al. 2003, Vahter et al. 1995, Healy et al. 1997, Drobná et al. 2004). Es konnten genetische Polymorphismen in Bezug auf die Purin-Nukleosid-Phoshorylase (PNP), Arsen-Methyl-transferase (AS3MT; frühere Nomenklatur: Cyt19) und Glutathion-S-Transferase (GSTO) ermittelt werden (Zakharyan et al. 1999, Yu et al. 2003, Li et al. 2005, De Chaudhuri et al. 2008, Aposhian et al. 2004, Yin et al. 2001). In diesem Zusammenhang wird eine Beeinflussung auf eine unterschiedliche Metabolisierung sowie auf das individuelle Risiko der Kanzerogenität nach chronisch erhöhter Arsen-Exposition durch Resistenzmechanismen vermutet (Hopenhayn-Rich et al. 1996, Yu et al. 2003, De Chaudhuri et al. 2008).

Dabei wird von einer bisher nicht vollständig geklärten Beeinflussung der Arsenstoffwechselvorgänge durch exogene Faktoren ausgegangen, wobei die Koexposition mit anderen Halbmetallen (Selenit, Quecksilber oder Antimon) oder toxischen Substanzen durch Umweltkontaminationen diskutiert wird (Bailly et al. 1991, Styblo et al. 2002). Studien von arsenexponierten Personen lassen einen Einfluss von Alter, Geschlecht und dem aktuellen Enährungsstatus auf die chronsiche Arsentoxizität vermuten (Heck et al. 2007, Vather und Concha 2001, Chen et al. 2003, Vather und Marafante 1987, Gamble et al 2005).

Es gibt Hinweise auf Prozesse der humanen Gewöhnung bzw. Anpassung an hohe Arsen-Expositionen (Vahter et al. 1984, Drobná et al. 2006, Kitchin 2001, Suzuki et al. 2001, Cui et al. 2004). Sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Zellen können bei Kontakt mit Arsen Resistenzen entwickeln (Silver und Phung 1996, Rosen 2002, Chen und Rosen 1997, Liu et al. 2002, Mukhopadhyay et al. 2002, Ji und Silver 1992).

Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden mit V79-Zellen durchgeführt. Die V79-Zellen des Chinesischen Hamsters bieten ein gutes Versuchsmodell bezüglich der Arsen-Resistenz an, da dieser entdifferenzierten, fibroblastoiden Zelllinie viele fremdstoffmetabolisierende Enzymsysteme, wie die Monooxygenasen des Zytochrom-P-450-Systems, UDP-Glucuronyltransferasen, Methyltransferasen und Phenolsulfotransferasen fehlen (Fischer et al. 1985).

Im Vorfeld dieser Arbeit konnten durch längere Arsenit-Exposition (8 Wochen vor Klonierung der Zellen, sowie 6 Wochen nach Klonierung der Zellen) 5 resistente V79-Zellklone (K4, K6, K7, K8 und K9) selektiert werden. Diese wurden eingesetzt, um die Zytotoxizität und die Genotoxizität von Arsen zu prüfen und die Expression eines am Arsen-Efflux beteiligten Transporters zu identifizieren.

6.1 Genotoxische Wirkungen von Arsenit in V79-Zellen

Zur Untersuchung der Genotoxizität chemischer Agenzien oder ionisierender Strahlung wird vielfach die Induktion von Mikrokernen mittels des von Matter und Schmid (1971) entwickelten Mikrokerntests eingesetzt. Dabei kommt es während der Zellteilung entweder zu aneugenen Wirkungen, z.B. durch ungleiche Chromosomenverteilung aufgrund einer Schädigung der Zentromere oder des Spindelapparates, oder zu klastogenen Wirkungen durch auftretende Chromosomenbruchstücke (Fenech 1997).

Rossman berichtete 2003 in diesem Zusammenhang über eine Mikrokernstudie in V79-Zellen, bei denen eine aneugene Wirkung von Arsenit in niedrigen Konzentrationen (5 µM) sowie klastogene Effekte nach Arsen-Expositionen in höheren Konzentrationen (20 µM) zu detektieren war. Zur Auswertung des Mikrokerntests in vitro wurden in dieser Arbeit V79-Zellen mit einer Teilungszeit von 12h nach einer 24h-Inkubation mit unterschiedlichen Arsenit-Konzentrationen untersucht. Bei den Ergebnissen des Mikrokerntestes war erkennbar, dass bei den klonierten Arsen-Resistenten V79-Zellen im Vergleich zu den nichtklonierten und unbehandelten V79-Zellen (V79) weniger Mikrokerne induziert wurden und somit eine Inhibierung der genotoxischen Wirkungen von Arsenit nachgewiesen werden konnte. Jedoch reichte die Arsenitinkubation von 6 Wochen bei den nicht klonierten V79-Zellen (K) offenbar nicht aus, um dort ebenfalls eine solche Inhibierung zu provozieren. Die Beobachtungen an den nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) deckten sich mit denen anderer Arbeitsgruppen (Gebel T et al. 2002, Rossman 2003). Somit wird durch die Mikrokernrate der Arsenit-resistenten V79-Klone deutlich, dass die Resistenz der Klone ebenfalls eine Resistenz gegen genotoxische Arsenitwirkungen und somit eine Inhibierung der Mikrokernbildung beinhaltet. Analog fanden Gebel T et al. (2002) bei Arsen-resistenten HepG2-Zellen eine verminderte Induzierbarkeit von Mikrokernen nach Arsenit-Exposition.

6.2 Zytotoxische Wirkungen von Arsenit und Cisplatin (CPDD) in V79-Zellen

Arsenit und seinen Metaboliten wird ein sehr unterschiedlich toxisches Wirkspektrum innerhalb der Zellsysteme zugeschrieben. Zunächst wurde postuliert, dass methylierte Arsenverbindungen weniger zytotoxisch sind als Arsenit und Arsenat (Ochi et al. 1994, Eguchi et al. 1997). Mittlerweile wird die Rolle der Metabolisierung von Arsen differenzierter betrachtet und neuere Studien haben ergeben, dass die Methylierung nicht generell als Detoxifikation zu werten ist (Thomas et al. 2001, Petrick et al. 2001, Mass et al. 2001, Kligerman et al. 2003). Die Toxizität wurde nunmehr von der Valenz der Arsenverbindungen abhängig gemacht. Dabei wurde von dreiwertigen Arsenmetaboliten berichtet, die als Vorstufen der fünfwertigen Metabolite entstehen können und durch ihre hohe Reaktivität, eine hohe Toxizität besitzen (Cohen et al. 2006).

Der Vorteil der Methylierung scheint in einer schnelleren Ausscheidung der methylierten fünfwertigen Arsenverbindungen zu liegen (Gebel T et al. 2002). Styblo et al. (2000) zeigten, dass die Methylierungskapazität verschiedener Säugerzelllinien nicht mit dem Grad zytotoxischer Zellschädigung durch Arsenit korrelierten und dreiwertige Arsenverbindungen deutlich toxischer waren als fünfwertige. In Übereinstimmung damit fanden Thomas et al. schon 2001 eine im Vergleich zu Arsenit stärkere zytotoxische Wirkung von dreiwertigen methylierten Arsenen (MMA^{III} und DMA^{III}) in menschlichen Lymphozyten.

In Zelllinien aus humanen Zielorganen der Arsentoxizität wie Leber, Lunge, Haut (monoblastoide Zellen (U937)), und Harnblase (Urothelzellen (UROtsa) konnten Styblo et al. (2000) *in vitro* zeigen, dass MMA^{III} und DMA^{III} die größten zytotoxischen Wirkungen besaßen, wobei DMA^{III} eine vergleichbare bis etwas stärkere Zytotoxizität als As^{III} aufwies. Vega et al. (2001) hingegen beurteilten den Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation in humanen Keratinozyten nach Exposition mit unterschiedlichen Arsenmetaboliten und postulierten Arsenit (As^{III}) als den Arsenmetabolit mit der höchsten zytotoxischen Potenz, gefolgt von MMA^{III} und DMA^{III}.

Obwohl noch Unsicherheiten in der Rangfolge bezüglich der zytotoxischen Wirkung bestehen, stellten Styblo et al. bereits im Jahre 2002 für V79-Zellen bezüglich dreiwertiger Arsenverbindungen eine Reihung der Wirkstärke der Zytotoxizität auf. Der Arsenmetabolit DMA^{III} verursachte bei einer Konzentration von 0,4 μ M eine Zytotoxizität von 50%, gefolgt von MMA^{III} bei bereits 0,5 μ M. As^{III} wies bei den untersuchten V79-Zellen eine etwas schwächere Zytotoxizität bei 4,2 μ M auf.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nach einer 24h Exposition ein Unterschreiten des 50%-Wertes der Neutralrot-Aufnahme (ED50) an den nicht klonierten und nicht Arsenit-resistenten V79-Zellen (V79) bei einer Arsenit-Konzentration zwischen 12 und 24 μ M sowie einer Cisplatin-Konzentration zwischen 6 und 12 μ M erreicht. Die klonierten Arsenit-resistenten V79-Klone zeigten nach einer 24h Exposition zwischen 75 und 100 μ M Arsenit noch eine Neutralrot-Aufnahme von oder über 50%, so dass bei diesen V79-Zellen eine erhöhte Arsenittoleranz in Bezug auf die Zytotoxizität induziert wurde. Sciandrello et al. (2002) beobachteten an nativen V79-Zellen nach 24h Exposition mit 10 μ M Arsenit eine Wachstumsrate von 70%. Gebel T (1998) fand in nicht Arsen-resistenten V79-Zellen eine 50%-ige Reduktion der Neutralrot-Aufnahme (EC 50) bei 25 μ M Arsenit.

Rossman et al. (1997) zeigten in Arsen-resistenten V79-Zellen eine EC 50 bei etwa 60 μ M Arsenit, während Gebel T et al. (2002) in Arsen-resistenten Hep-G2-Zellen eine EC 50 bei 65 μ M Arsenit nachwiesen.

Zur zytotoxischen Wirkung von Arsen wurden unterschiedliche sich gegenseitig beeinflussende Mechanismen als relevant angesehen. Zu nennen wäre beispielsweise die Enzyminhibierung mehrerer Zellenzymsysteme durch die besondere Affinität von Arsen zu Thiol- bzw. Sulfhydryl–Gruppen, welche die unterschiedlichen Zellenzyme beeinflussen, da Arsenit Thiolgruppen in Aminosäuren bindet und infolgedessen zu einer Inhibition von essentiellen Zellfunktionen führt (Raitnake 2003, Gebel T 1997).

Durch die strukturelle Ähnlichkeit des Arsens zu anorganischem Phosphat interferiert Arsen mit den ATP-bildenden Reaktionen der Atmungsketten- und Substratkettenphosphorylierung. Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffradikale stellen für die Energieversorgung der Zelle einen wichtigen Aspekt dar (Wang und Rossman 1996, Snyder 1990). Infolge des durch Arsen induzierten oxidativen Stresses kommt es zu einer Veränderung des Redoxpotentials in der Zelle und Tyrosin-Kinase-Rezeptoren können die apoptotische Signaltransduktionskette durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren initiieren und eine erhöhte Expression von apoptotischen Proenzymen wie Caspasen auslösen.

Cisplatin (CPDD) besitzt ein ausgeprägteres zytotoxisches Potential als Arsenit. Schon 1979 konnten Zwelling et al. ein um 80-90% reduziertes Zellwachstum bei V79-Zellen nach einer 2h Cisplatin-Exposition mit 11µM beobachten. Dabei ist die zytotoxische Potenz von Cisplatin von verschiedenen Faktoren abhängig. Wang SL et al. (2003) beschrieben verstärkte zytotoxische Effekte von Cisplatin an der Osteosarkom-Zellreihe OS-732 in Abhängigkeit von Konzentration und Temperatur. Ein zentrales Thema bei der Untersuchung der Mechanismen für Zytotoxizität und Resistenzentwicklung ist die Interaktion zwischen Cisplatin beruht auf Quervernetzungen von DNA-Strängen. Durch die bevorzugte Reaktion von Cisplatin mit den Nukleinsäuren Guanin und Adenin entstehen Vernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Quervernetzung) und zwischen benachbarten DNA-Strängen (Interstrang-Quervernetzungen).

Donahue et al. (1990) postulierten in Bezug auf zytotoxisch bedingte DNA-Crosslinks in V79-Zellen nach Cisplatin-Exposition ebenfalls eine selektive DNA-Protein-Bindung. Diese hoch mobilen Proteingruppen (HMG) im Zusammenhang mit Cisplatin geschädigter DNA

wurden von Marples et al. (1994) mit dem umfassenden Thema der Chemotherapeutika-Resistenzen und dem Vorgang der DNA-Reparatur in Verbindung gebracht. Die Bindungsaffinität der Metallothioneine zu Cisplatin wurde von Andrews et al. (1987) als höher gewertet als die Bindungsaffinität von Cisplatin zu Glutathion. Sicher ist, dass mehrere Resistenzmechanismen bezüglich der Cisplatin-Resistenz interagieren.

6.3 Arsen-Resistenz in V79-Zellen

6.3.1 Mechanistische Grundlagen der Arsen-Resistenz

Für den Arsen-Efflux wird von einem GSH-abhängigen Transport ausgegangen und es ist bekannt, dass in der humanen Leber vorkommende Adenosin-Triphosphat (ATP)-binding Cassette (ABC)-Transporter für die intrazelluläre Elimination von Arsenmetaboliten verantwortlich sind (Liu et al. 2001, Wang Z et al. 1996, Toyoda et al. 2008, Sodani et al. 2012). In diesem Zusammenhang wurde die vermehrte Expression der ABC-Transporter MRP1 (neue Nomenklatur: ABCC1; ältere Namen: MRP, ABCC, GS-X, ABC29), MRP2 (neue Nomenklatur ABCC2; ältere Nomenklatur: cMOAT1 oder cMRP), MRP3 (neue Nomenklatur ABBC3; ältere Namen: MOAT-D, cMOAT-2) sowie des ABC-Transporters P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1; ältere Namen: P-gp) festgestellt (Cole et al. 1994, Vernhet et al. 2000, Zaman et al. 1995, Liu et al. 2001, Leslie et al. 2004, Sodani et al. 2012). Gemeinsam mit MRP1 vermittelt MRP2 den Transport von konjugierten Metaboliten und an Glutathion (GSH) konjugierten Chemotherapeutika (Zaman et al. 1995, Priebe et al. 1998, Suzuki H und Sugiyama 1998, Nies und Keppler 2007, Sodani et al. 2012).

Der Transport von Glutathion-Konjugaten ist besonders von Interesse, da sie beim Arsemmetabolismus eine wichtige Phase der Detoxifikation darstellen (s. Abb. 5). Der diesbezügliche positive Befund der nachgewiesenen erhöhten Expression der Mrp1-Transporter mRNA in den Arsen-resistenten V79-Klonen K4, K6, K7 und K9 weist darauf hin, dass dieser Transporter zur selektierten Arsen-Resistenz beitragen könnte. Interessanterweise zeigte der V79-Klon K8, bei dem eine starke Arsenit-Resistenz mittels Neutralrot-Assay nachweisbar war, in den Versuchen 4.9.2. u. 4.9.3 eine im Vergleich zu den übrigen V79-Klonen niedrige Mrp1-mRNA-Expression. Somit ist denkbar, dass den verschiedenen Arsen-Resistenzen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen und/oder bei dem Klon K8 durch die Unterbrechung der permanenten Arsen-Inkubierung die Expression des Mrp1-Transporters beeinflusst wurde. So bemerkten Gebel T et al. (2002), dass es aufgrund des unterschiedlichen Zytotoxizitätsniveaus in Zellsystemen wahrscheinlich erscheint, dass Resistenzen gegen Arsen nicht auf einen einheitlichen Mechanismus zurückgeführt werden können.

Weiterhin kann eine Resistenz gegen Arsen dauerhaft exprimiert oder induzierbar sein. So selektierten Wang Z et al. (1996) Arsen-resistente V79-Klone, die ohne Arsen-induzierten Selektionsdruck nach 2 Monaten eine unveränderte stabile Resistenz zeigten. Die Autoren schlossen daher auf eine Mutation in den für die Resistenz verantwortlichen Genen. Dagegen selektierten Gebel T et al. (2002) Arsen-resistente HepG2-Zellen, die bereits nach drei Passagen in Arsen-freiem Medium ihre Resistenz verloren. Diese selektierte Resistenz wurde als eine induzierbare interpretiert. Auch in der vorliegenden Arbeit war zum Erhalt der Arsen-Resistenz der selektierten V79-Klone eine dauerhafte Kultivierung der Zellen mit Arsen notwendig. Somit scheint die hier vorliegende Resistenz eine induzierbare zu sein, zumal eine erhöhte Toleranz in den nicht klonierten V79-Zellen durch eine 6-wöchige Inkubation mit Arsen (K) bezüglich der zytotoxischen Arsen-Effekte induziert werden konnte.

In verschiedenen *in vitro*-Studien wurde gezeigt, dass Säugerzellen eine Resistenz gegenüber anorganischem Arsen entwickeln können. Als bekannte Mechanismen wurden die Induktion von Glutathion, Glutathiontransferase-Aktivität sowie eine Hochregulierung von MDR (*Multi Drug Resistance*)-Transportern der ABC-Transporter diskutiert (Yang und Frenkel 2002, Leslie et al. 2004, Liu et al. 2001).

6.3.2 Die Rolle der MRP/Mrp-Transporter bei der Ausprägung einer Arsen-Resistenz

Das globale Vorkommen von anorganischem Arsen in der Umwelt hat dazu beigetragen, dass sich während der Evolution eine Vielzahl von Anpassungsmechanismen entwickeln konnten (Rosen 2002). Der Resistenzmechanismus des Halbmetalls Arsen wurde in Bakterien, Hefen und Säugerzellen umfassend charakterisiert und es wird vermutet, dass Arsen-Konjugate ähnlich wie andere Thiol-Konjugate, entweder mittels energieabhängiger Efflux-Transporter aus dem Intrazellularraum der Zellen oder durch Sequestrierung in intrazellulären Organellen entgiftet werden (Dey et al. 1994, Gosh et al. 1999).

Für die Arsen-Detoxifikation in Säugerzellen konnten die Adenosin-Triphosphat (ATP)binding Cassette (ABC)-Transporter mitverantwortlich gemacht werden. Diese Transporter sind bereits für Resistenzentwicklungen in verschiedenen Zellsystemen bekannt und ihre Funktion ist keineswegs nur auf induzierbare Resistenzen gegenüber Zellgiften zu reduzieren. Die humanen ABC-Transporter spielen in der heutigen Klinik eine erhebliche Rolle bei der multiplen Arzneimittelresistenz und stehen im Zusammenhang mit der Ausbildung einer Multidrug Resistenz (MDR) während der Tumortherapie (Gottesman et al. 2002, Jemal et al. 2009).

Einer der bedeutendsten Mechanismen der MDR ist die vermehrte Expression des Adenosin-Triphosphat (ATP)-binding Cassette (ABC)-Transporters MRP (*multidrug resistanceassociated proteins*) in der Zellmembran von Tumorzellen, welcher einen Efflux der Zytostatika bewirkt und somit einen Resistenzmechanismus auslösen kann. Aufgrund der sehr breitgefächerten und teilweise auch überlappenden Spezifität der ABC-Transporter für strukturell verschiedene Moleküle, kann es bei der gleichzeitigen Applikation von mehreren Wirkstoffen zu klinisch relevanten Interaktionen kommen (Higgins 2007, Schinkel und Jonker 2003, Henry et al. 2008).

Mehreren Vertretern der MRP-Klasse (neue Nomenklatur: ABCC1 bis ABCC12) wird eine Rolle bei der Multidrug Resistenz (MDR) zugesprochen. In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde vornehmlich die traditionelle MRP Nomenklatur verwendet. Sofern sich Angaben auf Nagetiersysteme beziehen, wurden die Kurzbezeichnungen für die Transporter in der Arbeit nur am Anfang mit einem Großbuchstaben versehen (Mrp) bei humanen Kurzbezeichnungen in Großbuchstaben (MRP). Der Fokus dieser Arbeit lag auf den beiden ABC-Transportern MRP1 (neue Nomenklatur: ABCC1; ältere Namen: MRP, ABCC, GS-X, ABC29) und MRP2 (neue Nomenklatur ABCC2; ältere Nomenklatur: cMOAT1 oder cMRP). In der vorliegenden Arbeit sollte der Resistenzmechanismus Arsen-resistenter V79-Zellen untersucht werden und es wurden 5 resistente Zellklone auf das Vorhandensein einer Mrp1- bzw. Mrp2-mRNA-Expression geprüft. Das humane MRP1 ist in fast allen Geweben lokalisiert, wobei MRP1 in der Lunge, den Hoden, der Niere sowie dem Herz-und Skelettmuskel am häufigsten exprimiert ist (Cole 1999, Flens et al. 1996). Die in dieser Arbeit untersuchten Arsen-resistenten Klone der V79-Zelle entstammen der Lunge des Chinesischen Hamsters und es konnten in dieser Arbeit bei mehreren V79-Zellklonen mittels genspezifischer Oligonukleotidsonden erhöhte Mrp1-mRNA-Expressionen nachgewiesen werden. Das humane MRP2 wurde am häufigsten in der Leber, im Darm, der Galle und Gallenblase detektiert (Kool et al. 1997, Mottino et al. 2001, Schaub et al. 1997). Diese Tatsache könnte eine Erklärung dafür liefern, warum bei dieser verwendeten Lungenepithelzelle des Chinesischen Hamsters (V79) kein deutliches Signal im Northern Blot mittels der ausgewählten genspezifischen Mrp2-mRNA-Hybridisierungssonden nachzuweisen war.

Aus diesem Grund fokussiert sich die Diskussion verstärkt auf die Funktionen und Mechanismen des MRP1-Transporters. Von weiterem Interesse ist die Expression des MRP1-

132

Transporters in einer Vielzahl menschlicher Krebszelllinien (Kool et al. 1997). Klinisch konnten erhöhte MRP1-Expressionen in zahlreichen Krebsarten, wie z.B. kleinzelligem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakrebs und in verschiedenen hämatologischen Krebsarten nachgewiesen werden und mit einen progredienten Verlauf bzw. Rückfall bei Versagen einer Tumortherapie in Verbindung gebracht werden (Sodani et al. 2012, Wright et al. 1998, Tiwari et al. 2011).

Studien mit Säugetierzellen-Modellen haben gezeigt, dass die MRP1-Resistenz gegnüber Arsenit (As^{III}) und Arsenat (As^V) durch eine GSH-abhängige Form vermittelt wird (Cole et al. 1994, Vernhet et al. 2000, Zaman et al. 1995, Liu et al. 2001, Leslie et al. 2004). Allerdings konnte der Arsen-Transportmechanismus, der für den MRP1-abhängigen Efflux verantwortlich ist, bisher nicht bewiesen werden und die chemische Struktur der transportierten Substanzen ist noch nicht vollständig geklärt.

Bekannt ist, dass MRP1-Transporter Glukuronide, Sulfate und Glutathionkonjugate transportieren und dabei GSH-konjugierte organische Anionen (Leukotriene) und lipophile Xenobiotika als Substrate dienen (Leslie et al. 2004). Der Transport von Glutathion-Konjugaten ist für diese Arbeit von besonderem Interesse, da er beim Arsemmetabolismus eine wichtige Phase der Detoxifikation darstellt. Eine ATP-abhängige Glutathion-S-Konjugat-Pumpe wurde bereits 1992 von Ishikawa beschrieben und als GS-X-Pumpe benannt. Diese Funktion von MRP1 erklärt die Transportkapazität für anorganisches Arsenit, welches Komplexe mit GSH-Molekülen bilden kann und somit bei der Kontrolle des intrazellulären Glutathiondisulfid-Spiegels (GSSG) mitwirkt (Zaman et al. 1994, Kruh und Belinsky 2003, Dean et al. 2001). Wang Z et al. (1996) zeigten in diesem Zusammenhang, dass der Arsenefflux aus Arsen-resistenten V79-Zellen durch Inhibitoren der Glutathion-S-Transferase gehemmt wurde. In Übereinstimmung damit fanden Brambila et al. (2002) erhöhte intrazelluläre Glutathionspiegel (GSH) und eine verstärkte Genexpression der Glutathion-S-Transferase (GST) erstmals in humanen Arsen-resistenten Zellen der Prostataepithel-Zelllinie RWPE-1. Die Arsen-Resistenz war nach Behandlung der Zellen mit einem GSH- und GST-Inhibitor aufgehoben. Bei einer Untersuchung von Arsenit- und Antimon-resistenten humanen Leukämiezellen konnten Salerno et al. (2002) eine verstärkte Expression des MRP1-Gens feststellen sowie den Glutathion-abhängigen Efflux von Arsenit und Antimon nachweisen. Die Gene des MRP1 und der Gamma-Glutamylcystein-Synthetase (γ -GCS), dem Schlüsselenzym der Glutathion-Synthese, waren in humanen Leukämie-Zellen koordinativ reguliert und durch Schwermetalle induzierbar (Ishikawa et al. 1996, Kuo et al. 1998).

Daraus schlussfolgernd könnten die intrazelluläre Glutathionkonzentration, die Aktivität der Gamma-Glutamylcystein-Synthetase (γ-GCS) sowie die Expression des MRP1-Transporters einen direkten Einfluss auf die Ausprägung der Arsen-Resistenz einer Zelle haben (Lorico et al. 2002).

Der in dieser Arbeit positive Befund der nachgewiesenen erhöhten Expression der Mrp1-Transporter in den Arsen-resistenten V79-Klonen K4, K6, K7 und K9 macht diesen Transporter als eine Grundlage der selektierten Arsen-Resistenz wahrscheinlich. Bezüglich der Evaluierung einer nachgewiesenen MRP1-Expression in einem Versuchsmodell äußerten Deeley und Cole (2003), dass eine Beurteilung der MRP1-Expression im Allgemeinen schwierig sei, da MRP1 häufig schon physiologisch in vielen Geweben exprimiert werde. Dadurch wäre eine Auswertung nur valide, wenn auch normales, gesundes Gewebe in die Auswertung mit einbezogen würde. Bei den Untersuchungen der Mrp1-mRNA-Expression in dieser Arbeit wurde den Arsen-resistenten V79-Klonen auch eine Kontrolle mit unbehandelten V79-Zellen (V79) gegenübergestellt. Bei diesen unbehandelten V79-Zellen (V79) gelang bis auf den Versuch 4.9.1 der Nachweis einer physiologischen Mrp1-mRNA-Expression im Northern-Blot ohne vorherige Arsenit-Exposition. Nach Langzeitexposition mit Arsenit (As^{III}) bzw. Dimethylarsonsäure (DMA^V) konnte ein Anstieg der Mrp1-mRNA Expression beobachtet werden, so dass die in diesen Experimenten gewonnenen Ergebnisse für eine Induzierbarkeit der Mrp1-mRNA Expression bei den Arsen-resistenten V79-Klonen sprechen. Im Widerspruch dazu zeigte sich in der Northern-Blot-Analyse 4.9.1 bei den V79-Zellen (V79), die ausschließlich 4 Tage vor der RNA-Isolierung eine Arsenit-Exposition erhielten, kein Nachweis einer Mrp1-mRNA-Expression.

Interessanterweise zeigte der V79-Klon K8, bei dem eine starke Arsenit-Resistenz mittels Neutralrot-Assay nachweisbar war, in den Versuchen 4.9.2 u. 4.9.3 eine im Vergleich zu den übrigen V79-Klonen niedrigere Mrp1-mRNA-Expression. Somit ist denkbar, dass den verschiedenen Arsen-Resistenzen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

Insgesamt ist noch unklar, inwieweit beispielsweise der Metabolismus von Arsen einen Einfluss auf das Toleranzniveau gegenüber Arsen haben könnte, jedoch ist es von großer Bedeutung, dass Glutathion im Rahmen der Biomethylierung bei der Reduktion von As^V zu As^{III} als Quelle für Reduktionsäquivalente dient und somit nach Arsen-Exposition intrazellulär "aufgebraucht" wird und den Redoxstatus der Zelle beeinträchtigt (Drobná et al. 2006, Yu et al. 2003, Yang und Frenkel 2002, Leslie et al. 2004, Liu et al. 2001).

So steigt nach oxidativem Stress, wie z. B. nach erfolgter Arsen-Exposition, die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) an. Des Weiteren ist bekannt, dass MRP1 selbst in der Lage ist,

reduziertes GSSG zu transportieren und so das intrazelluläre Redoxpotential abzupuffern (Deeley et al. 2006).

Nach Eintreten der toxischen Metabolite in die Zelle beginnt die enzymatische Biomethylierung durch die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) und AS3MT (As^{III}-S-Adenosylmethionin-Methyltransferase; frühere Nomenklatur: Cyt19) (Yu et al. 2003, Zakharyan et al. 1999). Eine wichtige Aufgabe des MRP1-Transporters besteht darin, mit den Enzymen in der Phase III der Biotransformation zusammenzuarbeiten, um so einen reibungslosen Efflux und somit geringe intrazelluläre Konzentrationen der Arsenmetabolite zu gewährleisten (s. Abb. 2).

Die bereits methylierten Substrate (z.B. DMA^{III}, MMA^{II}) können nach dem heutigen Kenntnisstand intrazellulär weiterhin eine toxische Wirkung ausüben. So kann möglicherweise die Akkumulation der toxischen Metabolite innerhalb der Zelle zur Rückwandlung der methylierten Substrate durch hydrolytische Enzyme führen bzw. könnte die Produktionsinhibition der konjugierenden Glutathion-S-Transferase (GST) die Folge sein (Deeley et al. 2006).

Es wird davon ausgegangen, dass hohe Konzentrationen von Arsenit die enzymatische Methylierung durch die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) und AS3MT (As^{III} -S-Adenosylmethionin-Methyltransferase; frühere Nomenklatur: Cyt19) hemmen und andere Transporter wie GLUT-2 und MRP2 aktiviert werden (Drobná et al. 2010).

Ebenfalls wird diskutiert, die gesteigerte Glutathion S-Transferase (GST)-Expression selber könnte die Kapazität der Konjugation von As^{III} an GSH beeinflussen und somit den gesteigerten effektiven Zellefflux limitieren (Wang und Lee 1993, Wang Z et al. 1996, Gregus et al. 2000, Kala et al. 2000).

Leslie et al. (2004) untersuchten die mittels MRP1 transportierten Arsenmetabolite an Membranen aus der MRP1 transfizierten HeLa Zelllinie sowie aus der H69AR-Zelle mit nachgewiesener MRP1-Expression und postulierten, dass MRP1-Transporter As^{III} nur in Gegenwart von GSH transportieren. Nach Substitution mit nicht reduzierenden GSH-Analoga, denen eine freie Thiolgruppe fehlte, wurde kein Transport von GSH-konjugiertem As^{III} beobachtet, so dass möglicherweise die freie Thiolgruppe von GSH als wichtige Bindungskomponente anzusehen ist. Darüber hinaus scheint der GSH-abhängige Transport von dem pH-Milleu des Cytoplasmas abhängig zu sein, da bei einem pH von 6,5 bis 7 der As^{III}-Transport zweimal höher war als im basischen Milieu. Dabei zeigte sich der As(Gs)₃ Komplex offensichtlich im sauren Millieu stabil und konnte somit mittels MRP1 transport konnte

durch mehrere konjugierte organische Anionen gehemmt werden (wie z.B. durch das metalloide Antimon) (Leslie et al. 2004).

Leslie et al. (2004) konnten an der H69AR-Zelllinie zeigen, dass der As^{III}-Efflux durch MRP1 möglicherweise von der Bildung von As(GS)₃ abhängig ist und die Glutathion-S-Transferase (GSTP1) das für die Konjugation an As^{III} verantwortliche Enzym ist. Interessanterweise fanden die Forscher, dass die normalerweise im Zytosol oder Kern befindliche Glutathion-S-Transferase GSTP1 in der Vesikelmembran der H69AR-Zelllinie nachzuweisen war. Bei MRP1-transinfizierten HeLa-Zellen ohne Glutathion-S-Transferase GSTP1 war kein As^{III}-Transport detektiert worden, auch nicht in Anwesenheit von GSH. Extern verabreichtes synthetisches As(Gs)₃ wiederum wurde von den Zellen transportiert, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Konjugation des Arsenits eine grundsätzliche Bedingung für den MRP1-vermittelten Transport zu sein scheint und die As(GS)₃-Komplexe eine bemerkenswerte hohe Affinität zu dem MRP1-Transporter besitzen.

Um die potentiellen Transportmechanismen und die eventuell unterschiedliche Induzierbarkeit der Mrp1-Expression zu untersuchen, wurden die nach 4 Wochen Inkubation mit 10 μ M Dimethylarsonsäure (DMA^V) in Kultur gehaltenen Arsen-resistenten V79-Klone ebenfalls auf eine erhöhte Mrp1-mRNA-Expression untersucht.

Bei mehreren der Arsen-resistenten V79-Klone (K4, K6, K7 und K9) konnte eine erhöhte Mrp1-mRNA-Expressionen nach einer solchen Inkubation mit 10 µM Dimethylarsonsäure (DMA^V) festgestellt werden (siehe Versuch 4.9.5).

Die in diesen Experimenten gewonnenen Ergebnisse ließen darauf schließen, dass nicht nur Arsenit zu einer Erhöhung der Mrp1-Expression geführt hat, sondern DMA^V ebenfalls ein Stimulus auf die Mrp1-vermittelten Transportmechanismen in der Zelle ausübt. Die ermittelte relative Mrp1-mRNA-Expression der V79-Zellansätze mit DMA^V-Inkubation und anschließender neutraler 4-tägiger Kultivierung zeigten im Vergleich zu den Versuchen nach Arsenit-Inkubation und anschließender neutraler Mrp1-mRNA-Expression.

Innerhalb der V79-Zellen mit einer DMA^V-Langzeitinkubation sind jedoch unterschiedliche Mrp1-Expressionen, abhängig von der weiter durchgeführten Inkubation, zu beobachten. Es stellt sich die Frage, warum die V79-Zellen der dauerhaften DMA^V–Inkubation und anschließender neutraler 4-tägiger Kultivierung eine teilweise höhere Mrp1-Expression der mRNA aufwiesen, als solche mit einer angeschlossenen 24 h DMA^V–Inkubation. Durch den kürzeren Kontakt der V79-Zellen im ersten Ansatz mit der toxischen Substanz DMA^V und dem damit vermuteten geringeren Resistenz-Induktionsreiz, hätten diese V79-Klone am wahrscheinlichsten einen geringeren Mrp1-mRNA-Gehalt aufweisen müssen. Die V79-Klone K6, K7 und K9 zeigen jedoch eine höhere Expression der Mrp1-mRNA nach einem kürzeren Kontakt mit dem Arsenitmetaboliten DMA^V.

Bezüglich der DMA^V-Inkubation konnten Dopp et al. (2004) zeigen, dass die zelluläre Aufnahme bei CHO-Zellen für DMA^{III} 10 %, für MMA^{III}, As^{III} und As^V 2% sowie für DMA^V nur 0,03% betrug.

Dies lässt darauf schließen, dass möglicherweise der schwächere Influx von DMA^V in die Zelle einen geringeren toxischen Reiz und somit weniger Stimuli zur Expression des Mrp1-Transporters in den V79-Zellen auslöst. Ebenso könnte es möglich sein, dass die Aktivität des MRP1-Transporters durch intrazelluläre GSH-Konzentration gesteuert wird und von ihr abhängig ist (Vanhoefer et al. 1996). Demnach weisen DMA^V und As^{III} unterschiedliche Charakteristika in ihrer Induzierbarkeit der Mrp1-mRNA-Expression bei den V79-Klonen auf.

Leslie et al. (2004) untersuchten die GSH-Bindungsdomäne zu MRP1, in der eine Vielzahl von Aminosäuren substituiert worden war. Sie stellten fest, dass die molekulare Struktur des Tripeptids GSH die Transportaktivität des MRP1 mitbestimmte. Manciu et al. (2003) verwendeten eine von innen nach außen gerichtete MRP1-Konfiguration in rekonstruierten Lipidvesikeln und konnten beweisen, dass die Bindung von GSH an MRP1 eine Konformationsänderung des Transporterproteins induzieren Diese konnte. Konformationsänderung verbesserte durch Einfluss auf die strukturelle Organisation der zytosolischen Domänen die Voraussetzungen für die ATP-Bindung und/oder Hydrolyse an dem MRP1-Transporter. Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss GSH auf die Transportaktivität von MRP1 in den V79-Klonen hat. So kann vermutet werden, dass GSH nach Bindung eine allosterische Wirkung auf MRP1 besitzt, bei der es zu einer Konformationsänderung des Transporters kommt, um verbesserte Bedingungen für die Substratbindung bzw. Substrataffinität zu schaffen. Bei einem verminderten GSH-Spiegel nach einer Langzeitinkubation mit Arsenit und Dimethylarsonsäure könnte ein verminderter Efflux und eine verminderte Induktion des Mrp1-Transporters in den V79-Klonen resultiert haben.

Weitere Vertreter der Adenosin-Triphosphat (ATP)-*binding cassette* (ABC)-Transporter stehen bezüglich der intrazellulären Elimination von Arsenmetaboliten zur Diskussion.

So könnte der MRP2-Transporter an einer erworbenen Arsen-Resistenz beteiligt sein. Die V79-Zellen stammen aus Lungengewebe, in dem der Mrp2 physiologisch nicht exprimiert wird, jedoch konnte der MRP2 in einer ganzen Reihe von Lungenkrebszellen auf einem

137

hohen Aktivitätsniveau detektiert werden (Kool et al. 1997, Mottino et al. 2001, Schaub et al. 1997). Weiterhin zeigt auch der an der Gallengangsmembran lokalisierte MRP2 eine GS-X-Pumpen-Aktivität, so dass dieser an Glutathion-konjugierte Substrate transportieren könnte (Oude et al. 1995, Yamazaki et al. 1996, Rost et al. 2001).

Studien ergaben eine fast identische Subratsspezifität von MRP1 und MRP2 bei einer sehr unterschiedlichen Substrataffinität (Nies und Keppler 2007). Beide Transporter befördern sowohl LTC_4 als auch Bilirubinkonjugate, wobei MRP1 eine stärkere Substrataffinität zu GSH-Konjugaten und freiem Glutathion besitzt und außerdem eher LTC_4 transportiert. MRP2 transportiert bevorzugt Bilirubinkonjugate (Cui et al. 1999).

Das von der Aminosäurensequenz zu MRP1 ähnliche MRP2 stellt ebenfalls eine Schlüsselfunktion in der Phase II der Elimination von GSH-konjugierten Xenobiotika dar. Beide MRP-Transporter wurden in Studien als synergistisch agierende Helfer im Rahmen der Resistenzausbildung gegenüber elektrophilen Toxinen und Kanzerogenen diskutiert (Leslie et al. 2004).

Zelcer et al. (2003) entdeckten bezüglich Arsenverbindungen, die den MRP2-Transport stimulierten, dass diese nicht unbedingt selbst von MRP2 transportiert werden müssen und möglicherweise zwei verschiedene Bindungskapazitäten existieren: eine zur Bindung der zu transportierenden Substanz und eine weitere für die allosterische Aktivierung zur Regulation der ersteren. Es ist daher fraglich, ob es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Resistenzmechanismen der V79-Versuchszellen tatsächlich um einen einzigen Transporter handelt, oder ob ein breites Spektrum an Transportern zu der Resistenzentwicklung beiträgt. In diesem Zusammenhang wurden in humanen Hepatozyten, welche vorher einer niedrigen Arsenit-Konzentration ausgesetzt gewesen waren eine gesteigerte MRP2-Expression sowie eine positive Korrelation zwischen MRP2-Expression und der Produktion von Dimethylarsonsäuremetaboliten (DMA^{III}, DMA^V) bzw. Efflux in das Medium festgestellt, sodass MRP2 möglicherweise eine Schlüsselfunktion bei dem Ausschleusen von DMA spielt (Drobná et al. 2010).

Analysen von chronisch-Arsen-exponierten Zellen zeigten eine erhöhte mRNA-Expression des Enzyms Glutathion S-Transferase P (GST-P), von Multidrug Resistenz-assoziierten Proteinen für die Effluxtransporter MRP1, MRP2 (neue Nomenklatur ABCC2; ältere Nomenklatur: cMOAT1 oder cMRP), MRP3 (neue Nomenklatur ABBC3; ältere Namen: MOAT-D, cMOAT-2) sowie des Multidrug Resistenz-Transporters P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1, MDR1; ältere Namen: P-gp) (Liu et al. 2001, Lee et al. 1989, Wang und Lee 1993).

Trotz der geringen Übereinstimmung in den Aminosäurensequenzen, besitzt MRP1 ein mit P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1, MDR1; ältere Namen: P-gp) überlappendes Resistenzspektrum. Es ist bekannt, dass eine Arsenexpostion in der renalen Adenokarzinom Zellinie HTB-46 und in der humanen HepG2 das P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1, MDR1; ältere Namen: P-gp) induzieren kann (Chin et al. 1990, Kioka et al. 1992). Dazu konnten in double-knock-out Mäusen, in denen das P-Glykoprotein fehlte, eine erhöhte Toxizität der Zellen festgestellt werden (Liu et al. 2001). Nach Ausschaltung der Transporter P-Glykoprotein und Mrp1 resultierte eine dramatische zytotoxische Empfindlichkeit der Säugerzellen gegenüber der Arsen-Exposition, die ein Absterben der Zellen als Folge hatte (Allen et al. 2000). So wird das P-Glykoprotein in neueren Studien als ein mögliches "Verstärker-Regel-System" diskutiert (Liu et al. 2001). Durch Inkubation mit einem dosisabhängigen Inhibitor von Glutathion-S-Transferase (GST) (Ethacrynsäure), einem Glutathion-Synthese-Hemmer (Buthioninsuloximin, BSO), einem Inhibitor für MRP1 (Mk571) sowie einem spezifischer Inhibitor für P-Glykoprotein (PSC833) konnte die erworbene Arsen-Resistenz aufgehoben werden (Liu et al. 2001). Bei der Inhibition von MRP1, P-Glykoprotein und bei der Glutathion-Synthese stieg die intrazelluläre Arsenakkumulation, sodass vermutet wurde, dass sich diese Transporter bzw. Enzyme an dem Mechanismus des Arsenefflux beteiligen (Naredi et al. 1995, Wang und Rossman 1996, Wang und Lee 1993).

Es ist bekannt, dass das P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1, MDR1; ältere Namen: P-gp) durch den Calcium-Kanalblocker Verapamil inhibiert werden kann. Dabei scheint Verapamil selbst durch P-Glykoprotein transportiert zu werden. Andererseits wäre denkbar, dass dieser ABC-Transporter auf Veränderungen der intrazellulären Calciumspiegel reagieren könnte. Zhang et al. (1999) postulierten, dass das Maß des intrazellulären Calciumspiegels möglicherweise mit der Ausprägung der Arsen-Resistenz zusammenhängt. So wäre denkbar, dass die durch die ROS-Produktion vermittelte Veränderung des Mitochondrienpotentials und die damit einhergehende Beeinflussung des intrazellulären Calciumspiegels einen Einfluss auf den P-Glykoprotein-Transporter ausübt, der wiederum eine positive Rückkopplung an den MRP1 weiterleitet. In diesem Zusammenhang stellten Loe et al. (2000) fest, dass Verapamil den Transport von GSH durch MRP1 stimuliert und bei Fehlen von Verapamil kein GSH-Transport nachweisbar war.

Weiterhin ist möglich, dass MRP3 (neue Nomenklatur ABBC3; ältere Namen: MOAT-D, cMOAT-2) an dem Efflux von GSH-konjugierten Arsenmetaboliten As^{III}(GS)₃, MAA^{III}(GS)₂ und DMA^{III}(GS) beteiligt ist. Der MRP3-Transporter (neue Nomenklatur ABBC3; ältere

Namen: MOAT-D, cMOAT-2) ist für den Transport von organischen Anionen in der basolateralen Memrandomäne verantwortlich und ist in humanen und Ratten-Hepatozyten für den Efflux in die sinusoidale Blutbahn zuständig. MRP3 teilt mit MRP1 die höchste strukturelle Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz, differenziert sich jedoch stark in seiner Substratspezifität zu MRP1 (König et al. 1999b, Kool et al. 1999). So besitzt MRP3 nur eine geringe Substrataffinität für unkonjugierte hydrophobe Komponenten in Anwesenheit von freiem Glutathion (GSH).

Kool et al. 1999 berichteten in diesem Zusammenhang von einem unveränderten intrazellulären GSH-Spiegel in MRP3-transfizierten Zellen.

Eine erhöhte MRP3-Expression wurde in cholestatischen Leberzellen sowie bei Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom (DJS) beobachtet, denen der für die biliäre Exkretion des glucuronidierten Bilirubins verantwortliche MRP2-Transporter in den kanalikulären Membranen der Leberzellen fehlt (Kubo et al. 2009, Ortiz et al. 1999, Hirohashi et al. 1998). So wird vermutet, dass die Substratspezifität des MRP3-Transporters bei Störung der Gallensekretion oder Funktionsausfall des MRP2-Transporters den Efflux von organischen Anionen aus der Leber in das Blut sichert. Weiterhin kann MRP3 als eine alternative Möglichkeit angesehen werden, den Efflux von Gallensäuren und Glucuroniden aus cholestatischen Hepatozyten zu gewährleisten, ist aber kein Transporter, der sich am enterohepatischen Kreislauf von Gallensäuren beteilgt (Belinsky et al. 2005, Zeng et al. 2000).

MRP1 und MRP3 werden überwiegend in Zellmembranen exprimiert. MRP2 wurde mit höherer Dichte in intrazellulären Membranen von Vesikeln gefunden (Sodani et al. 2012). Drobna et al. (2010) konnten eine vermehrte Expression des MRP2-Transporters (neue Nomenklatur ABCC2; ältere Nomenklatur: cMOAT1 oder cMRP) sowie des ABC-Transporters P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1, MDR1; ältere Namen: P-gp) feststellen und diese Transporter in humanen Hepatozyten mit Ausbildung einer Arsen-Resistenz in Verbindung bringen. Infolgedessen wird davon ausgegangen, dass MRP2 und P-Glykoprotein den Transmembrantransport der an Glutathion konjugierten Arsenmetaboliten As^{III}(GS)₃, MAA^{III}(GS)₂ und DMA^{III}(GS) in die Gallenkanälchen vermitteln.

Es wird vermutet, dass MRP1 (neue Nomenklatur: ABCC1; ältere Namen: MRP, ABCC, GS-X, ABC29) und MRP3 (neue Nomenklatur ABBC3; ältere Namen: MOAT-D, cMOAT-2) an dem Efflux von GSH-konjugierten Arsenmetaboliten As^{III}(GS)₃, MAA^{III}(GS)₂ und DMA^{III}(GS) in die sinusoidale Blutbahn beteiligt sind (Sodani et al. 2012, Drobna et al. 2010).

140

Chavan et al. berichteten 2011 von einer verstärkten Expression des ABC-Transporters ABCB6 (frühere Nomenklatur: MTBC3, umat, PRP) in HepG2 und Hep3B Zellen nach Arsen-Exposition und machten diesen für die Resistenz gegenüber Arsen verantwortlich. Studien in Maus-Zellkulturen und humanen Zellkulturen unterstützten die These, dass ABCB6 eine direkte Korrelation zu der zellulären Vermittlung der Arsen-Resistenz besitzen könnte (Paterson et al. 2007, Annerreau et al 2004). Im Gegensatz dazu konnten Gebel T et al. (2002) keinen Anstieg der mRNA-Expression des ABCB6-Transporters in Arsen-resistenten HepG2-Zellen nachweisen.

Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Arbeit ist, dass mittels des Neutralrot-Assays nicht nur gezeigt werden konnte, dass die Resistenz der Arsen-resistenten V79-Klone sich auch auf die zytotoxischen Wirkungen von Arsenit erstreckt, sondern dass die V79-Klone darüber hinaus eine starke Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin aufwiesen. Dieser Nachweis war von Interesse, weil umgekehrt beschrieben worden war, dass eine erworbene Cisplatin-Resistenz mit einer Kreuzresistenz gegen Arsenit einhergeht (Ishikawa et al. 1996).

Es ist bekannt, dass aufgrund der breiten Substraterkennung der involvierten MRP-Transporter die Möglichkeit der Kreuzresistenz-Ausbildung besteht und Tumorzellen unempfindlich gegenüber mehreren strukturell und vom Wirkungsmechanismus her verschiedenen Zytostatika sind.

Aufgrund der ählichen Substrataffinität von MRP1 und MRP2 liegt eine gemeinsame Beteiligung an der Resistenzentwicklung auch gegenüber Chemotherapeutika nahe. Bezogen auf die verschiedenen Chemotherapie-Resistenzspektren konnte dem MRP2 in verschiedenen Studien eine eindeutige Cisplatin-Resistenz zugeordnet werden (Sodani et al. 2012, Hooijberg et al. 1999, Cui et al. 1999). Die Ausbildung einer Resistenz von MRP2 gegenüber Cisplatin ist von besonderem Interesse, da dem MRP1-Transporter ebenfalls mehrfach eine Cisplatinkreuzresistenz bei Arsen-Resistenz zugeordnet werden konnte (Ishikawa et al. 1996, Sodani et al. 2012, Cole et al. 1994). Die Resistenzentwicklung in den in dieser Arbeit untersuchten V79-Klonen erklärt sich am wahrscheinlichsten über die Fähigkeit des Cisplatins, GSH-Komplexe in den Zellen zu bilden und als GSH-Konjugatsubstrat durch eine ATP-abhängige Glutathion-S-Konjugat-Pumpe aus der Zelle eliminiert zu werden (Sodani et al. 2012, Ishikawa et al.1994, Cui et al. 1999). Somit kann vermutet werden, dass der Mrp1-Transporter für den Transport des Glutathion-konjugierten Cisplatins in den Arsen-resistenten V79-Zellklone mitverantwortlich ist. Während die Funktion der GS-X-Pumpen als Transporter für endogene Metaboliten hinreichend untersucht werden konnte, gestaltete sich die Untersuchung ihrer Rolle als Xenobiotika-Transporter schwieriger. Dennoch zeigten frühe Studien, dass Glutathion (GSH) und die Glutathion-S-Transferasen (GST) direkt an der zellulären Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, wie Cisplatin beteiligt sind (Perez et al 1990, Godwin et al. 1992).

So ist die Arsen-Resistenz in Chemotherapeutika-resistenten Zellen am wahrscheinlichsten als Nebeneffekt der Chemotherapeutika-Resistenz zu werten, da die durch Arsen induzierbare Arsen-Resistenz durch MRP1 und MRP2 gemeinsam vermittelt werden kann und ebenfalls auf einer ATP-abhängigen Glutathion-S-Konjugat-Pumpe basiert.

Die Beteiligung weiterer MRP-Transporter am Cisplatin-Efflux erscheint ebenfalls nicht ausgeschlossen, denn alle bisher beschriebenen Arsen-Resistenzen gingen mit Resistenzen gegen Chemotherapeutika einher. Ueda et al. konnten 1999 schon anhand von Versuchen an der Cisplatin-resistenten humanen Epidermoid-Zell-Linie K-B-3-1 zeigen, dass neben *MRP1* und *MRP2* auch das *MRP3*-Transportergen sowie das *P-Glykoprotein* an der Ausprägung der Cisplatin-Resistenz beteiligt sein könnten, da die Forscher eine eindeutig erhöhte Expression dieser Transportergene nachwiesen. Diese Ergebnisse wurden 2003 von Briz et al. nochmals bestätigt, die in Cisplatin-resistenten humanen Kolonkarzinomzellen eine verstärkte Expression der Gene von *MRP1*, *MRP2*, *P-Glykoprotein* und der *Glutathion-S-Transferase* (*GST*) aufzeigten.

Es wurde gezeigt, dass der ATP7B (copper-transporting-P-type adenosine triphosphatase), einen für die Cisplatin-Resistenz mitverantwortlichen Mechanismus darstellt und es konnte eine eindeutige Verbindung mit der Genexpression der Transporter MRP2 und P-Glykoprotein hergestellt werden (Nakayama et al. 2002). Henness et al. (2002) zeigten, dass eine Cisplatin-Resistenz in Lungenkarzinomzellen durch fraktionierte Bestrahlung induziert werden konnte. Dabei wurden die Transportergene *MRP1*-und *MRP2* überexprimiert, die Expression der Glutathion-S-Transferase (GST) war dagegen abgeschwächt.

Somit ist eine Beteiligung unterschiedlicher Mitglieder der ATP-binding-casette (ABC)-Subfamilie MRP bei der Ausprägung einer Arsen- und Cisplatin-Resistenz möglich, da sie den erforderlichen GSH-abhängigen Substrattransport vermitteln.

Dabei existieren sehr unterschiedliche Substrataffinitäten und Substratspezifitäten und es ist noch unklar, ob GSH ausschließlich als Kosubstrat für konjugierte hydrophile Substrate fungiert oder eine Funktion als allosterischer Co-Faktor einnimmt, der durch Bindung an noch unbekannte Menmranbindungsdomänen am Transporterprotein selber Substratbindungsaffinitäten der MRP-Transporter regulieren kann. Die Komplexität dieses Systems zeigt, dass das Verständnis für den Zusammenhang von MRP1-Transportern eine Herausforderung bleibt. Ebenfalls erscheint komplex, dass es unterschiedliche Substratspezifitäten für an Glukuronid-konjugierte Substrate und GSH-konjugierte Substrate unter den MRP-Mitgliedern zu geben scheint. Dies unterstreicht die Vielfalt der MRP-Transportsysteme. Es besteht weiterhin Forschungsbedarf auf diesem Gebiet, um die molekularen Zusammenhänge des GSH-abhängigen Arsen-Transportes zu verstehen und weitere Wechselwirkungen wie die Beeinflussung von Regulatoren, die die Expression der MRP1- und MRP2-Transporter beeinflussen können, aufzuklären.

6.4 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe von Arsenit (As^{III}) die Mrp1-mRNA-Expression der V79-Zellen gesteigert werden konnte und es eine generelle Assoziation zwischen der Genotoxizität, der Zytotoxizität, und der Mrp1-mRNA-Expression zu geben scheint. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre, die Mrp1-Expression in V79-Zellen unter Einfluss der Substanzen Dimethylarsonsäure (DMA^V) und Cisplatin (CDDP) gegenüberzustellen, um einen Vergleich der Mrp1-Induzierbarkeit unter Substanzen unterschiedlichen toxischen Potentials zu untersuchen.

Außerdem wäre die Untersuchung der möglichen Ausbildung von Mutationen am *Mrp1*-Gen während einer Arsen- oder Cisplatin-Resistenzausbildung von Interesse, da diese durch die DNA-Bindungsaktivität grundsätzlich möglich ist.

Auch weiterführende Untersuchungen, wie z.B. die Klonierung weiterer Transporter sowie die Darstellung ihrer Expression, könnten helfen, die beteiligten Arsen-Transporter weiter einzugrenzen.

Von Interesse wäre beispielsweise eine Ermittlung der Expression der Glutathion-S-Transferase (GST) und der Gamma-Glutamylcystein-Synthetase (γ -GCS) bei Arsen- und Cisplatin-resistenten V79-Zellen, um den Einfluss der glutathionabhängigen Substratkonjugation auf Resistenz bzw. auf Transportmechanismen zu erfassen. Zusätzlich könnten spezifische Inhibitoren zum Einsatz kommen, wie zum Beispiel Ethacrynsäure als Inhibitor der Glutathion-S-Transferase (GST), Buthioninsulfoximin als Inhibitor der Gamma-Glutamylcystein-Synthetase (γ -GCS), PS833 als spezifischer Inhibitor des P-Glykoprotein (neue Nomenklatur: ABCB1, MDR1 ältere Namen: P-gp) oder MK571, der spezifisch zur Inhibition von MRP1-Transportern verwendet wird.
7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der etablierten Fibroblasten-Zell-Linie des Chinesischen Hamsters (V79-Zellen) sowie mit Arsenit-resistenten Klonen dieser Zell-Linie gearbeitet. Es wurden 5 Arsenit-resistente Klone (K4, K6, K7, K8 K9) von der etablierten V79-Linie durch eine 8-wöchige Inkubation mit 10 μ M Arsenit wie in Wang Z et al. (1996) beschrieben herangezüchtet. Die erhaltenen Klone wurden nach einer weiteren 6-wöchigen 10 μ M Arsenit-Inkubation mittels Neutralrot-Assay auf eine etwaige erhöhte Toleranz gegenüber der Zytotoxizität von Arsenit (As^{III}) sowie Cisplatin (CDDP) untersucht und mittels Mikrokerntest auf eine etwaige erhöhte Toleranz gegenüber der Genotoxizität von Arsen hin untersucht.

Über den Neutralrotassay konnte bei den eingesetzten V79-Klonen (K4, K6, K7, K8, K9) eine Resistenz gegenüber Arsen sowie eine Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin (CDDP) festgestellt werden. V79-Zellen (K), die 6 Wochen lang mit Arsenit vorbehandelt, aber nicht kloniert worden waren, zeigten ebenfalls eine höhere Toleranz gegenüber Arsenit und Cisplatin als V79-Zellen ohne Arsenit-Vorbehandlung (V79). Damit konnte eine Induzierbarkeit der Arsenit-Resistenz bei nicht klonierten V79-Zellen (K) nachgewiesen werden.

Bei den V79-Klonen (K4, K6, K7, K8, K9) lagen bezüglich der Arsenit-Resistenz die ED50 Werte zwischen 75 und über 100 μ M und überstiegen somit die ED50 der Kontrolle (V79, 24 μ M) um das Zwei- bis Fünffache. Die Klone K4, K7, K8 und K9 wiesen dabei eine starke Resistenzausprägung auf.

Das genotoxische Potential von Arsenit bzw. die Bildung von Mikrokernen war in den Arsenit-resistenten V79-Klonen generell geringer ausgeprägt im Vergleich zu den unbehandelten V79-Zellen (V79). Die V79-Klone K4 K6, K7 und K8 zeigten ab einer Arsenit-Konzentration von 1,5 μ M eine geringere Mikrokernanzahl. Bei K9 ließ sich erst ab einer Arsenit-Konzentration von 12 μ M eine geringere genotoxische Wirkung feststellen. Am deutlichsten ausgeprägt waren die Unterschiede zwischen den Arsenit-resistenten V79-Klonen und der Kontrolle (V79) bei einer Arsenit-Konzentration von 25 μ M. Bei den vorinkubierten nicht klonierten V79-Zellen (K) konnte keine induzierbare genotoxische Resistenz der Mikrokernbildung nach erneuter Arsenit-Exposition festgestellt werden.

Die aus V79-Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde für Northern Blot Analysen (zur Überprüfung der mRNA-Expression der Transporter Mrp1 und Mrp2) und für die RT-PCR eingesetzt. Da spezifische Hybridisierungssonden für den Nachweis von Mrp1- oder Mrp2-

Zusammenfassung

mRNA im Northern Blot benötigt wurden, die Sequenzen für die entsprechenden Gene des Chinesischen Hamsters jedoch bis dahin nicht in den Genbanken abgelegt worden waren, wurden cDNA-Fragmente zu den Mrp1- bzw. Mrp2-Transkripten des Chinesischen Hamsters durch RT-PCR erschlossen und kloniert. Um geeignete Primer für die RT-PCR-Reaktionen zu finden, wurden die cDNA-Sequenzen der *MRP1-/Mrp1-* und *MRP2-/Mrp2*-Gene von Mensch, Maus und Ratte aus der EMBL Gendatenbank einander gegenübergestellt. Es wurde vorausgesetzt, dass die Mrp1- und Mrp2-Sequenzen des Chinesischen Hamsters einen hohen Grad an Homologie zu den entsprechenden Sequenzen in den anderen Spezies aufweisen würden und daher Sequenzbereiche, die in den anderen drei Spezies übereinstimmten, auch für den Hamster konserviert sein würden. Als Ergebnis dieser Sequenzvergleiche wurden Primer für die RT-PCR ausgewählt, die hochkonservierten Bereichen entsprachen.

Die durch RT-PCR gewonnenen cDNA-Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Die Sequenz des klonierten Mrp1-cDNA Fragments des Chinesischen Hamsters wurde unter der Zugangsnummer (*accession no.*) AJ 504425 in der EMBL Genbank abgelegt. Die Sequenz des klonierten Mrp2-cDNA Fragments des Chinesischen Hamsters wurde unter der Zugangsnummer (*accession no.*) AJ 504426 in der Genbank EMBL abgelegt. Der Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot erfolgte durch Hybridisierung mit ³²Phosphormarkierten Oligonukleotidsonden. Die Sonden zum Nachweis von Mrp1- bzw. Mrp2-mRNA entsprachen kurzen Sequenzbereichen aus den oben beschriebenen klonierten cDNA-Fragmenten.

In den untersuchten Proben der fibroblastoiden Lungenepithelzelle V79 des Hamsters konnte zumindest im Northern Blot keine Mrp2-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Hingegen konnte bei den verschiedenen Arsen-resistenten V79-Klonen im Vergleich zu den nichtklonierten Kontrollzellen (K) eine gesteigerte Mrp1-mRNA-Expression nach einer kontinuierlichen Langzeitinkubation mit 10 µM Arsenit (As^{III}) gezeigt werden. Bei dem Klon K8 war jedoch die niedrige Mrp1-mRNA-Expression im Vergleich zu den anderen resistenten Klonen auffällig, zumal der Klon 8 im Neutralrotassay eine relativ hohe Toleranz gegenüber Arsenit gezeigt hatte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Mrp1-Expression zur Resistenzausprägung gegenüber Arsen generell beitragen könnte. Insbesondere im Falle des Arsen-resistenten Klon K8 könnten jedoch auch andere Mechanismen von Bedeutung sein.

8 Literaturverzeichnis

- Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, Waalkes M (1999): Arsenic: health effects, mechanism of actions, and research issues. Environ Health Perspect <u>107</u> (7), 593-597
- Allen JD, Brinkhuis RF, van Deemter L, Wijnholds J, Schinkel AH (2000): Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. Cancer Res <u>60</u> (20), 5761-5766
- Anderson KC, Boise LH, Louie R, Waxman S (2002): Arsenic trioxide in multiple myeloma rationale and future directions. Cancer J <u>8</u> (1), 12-25
- Andrews PA, Murphy MP, Howell SB (1987): Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. Cancer Chemother Pharmacol <u>19</u> (2), 149-154
- Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, Sampayo-Reyes A, Wollenberg ML (2004): A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. Toxicol Appl Pharmacol <u>198</u>, 327–335
- Aposhian HV (1997): Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol <u>37</u>, 397-419
- Babick H, Borenfreund E: Neutral red assay for toxicology in vitro. In vitro Methods of Toxicology. CRC Press, Boca Raton 1992: 237-251
- Bachleitner-Hofmann TM, Kees M, Gisslinger H (2002): Arsenic trioxide: acute promyelocytic leukemia and beyond. Leuk Lymphoma <u>43</u> (8), 1535-1540
- Bailly R, Lauwerys R, Buchet JP, Mathieu P, Konings J (1991): Experimental and human studies on antimony metabolism: their relevance for the biological monitoring of workers exposed to inorganic antimony. Br J Ind Med <u>48</u> (2), 93-97
- Barbery JT, Pezzullo JC, Soignet SL (2003): Effect of arsenic trioxide on QT interval in patients with advanced malignancies. J Clin Oncol <u>21</u>, 609-615
- Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri AK (2001): Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. Mutat Res <u>488</u> (2), 171-194
- Bates MN, Smith AH, Hopenhayn-Rich C (1992): Arsenic investigation and internal cancers: a review. Am J Epidemiol <u>35</u>, 462- 476

- Belinsky MG, Dawson PA, Shchaveleva I, Bain LJ, Wang R, Ling V, Chen ZS, Grinberg A, Westphal H, Klein-Szanto A, Lerro A, Kruh GD (2005): Analysis of the in vivo functions of Mrp3. Mol Pharmacol <u>68</u> (1), 160-168
- Biscardi JS, Tice DA, Parsons SJ (1999): c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. Adv Cancer Res <u>76</u>, 61-119
- Bode AM, Dong Z (2002): The paradox of arsenic: molecular mechanisms of cell transformation and chemotherapeutic effects. Crit Rev Oncol Hematol <u>42</u> (1), 5-24
- Bolt HM, Stewart JD (2010): Arsenic: metabolism and transport mechanisms in human hepatocytes, Arch Toxico <u>84</u> (1), 1-2
- Borenfreund E, Puerner JA (1985): Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Letters <u>24</u>, 119-124
- Borst P, Zelcer N, van de Wetering K (2006): MRP2 and 3 in health and disease. Cancer Lett. 234 (1), 51-61
- Brambila EM, Achanzar WE, Qu W, Webber MM, Waalkes MP (2002): Chronic arsenicexposed human prostate epithelial cells exhibit stable arsenic tolerance: mechanistic implications of altered cellular glutathione and glutathione S-transferase. Toxicol Appl Pharmacol <u>183</u> (2), 99-107
- Bréchot JM, Hurbain I, Fajac A, Daty N, Bernaudin JF (1998): Different pattern of MRP localization in ciliated and basal cells from human bronchial epithelium. J Histochem Cytochem <u>46</u> (4), 513-517
- Briz O, Macias RI, Vallejo M, Silva A, Serrano MA, Marin JJ (2003): Usefulness of liposomes loaded with cytostatic bile acid derivatives to circumvent chemotherapy resistance of enterohepatic tumors. Mol Pharmacol <u>63</u> (3), 742-750
- Chatterjee A, Das D, Mandal BK, Chowdhury TR, Samanta G, Chakraborti D (1995): Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part 1. Arsenic species in drinking water and urine of the affected people. Analyst <u>120</u>, 643–650
- Chavan H, Oruganti M, Krishnamurthy P (2011): The ATP-binding cassette transporter ABCB6 is induced by arsenic and protects against arsenic cytotoxicity. Toxicol Sci 120(2), 519-528

- Chen YC, Su HJ, Guo YL, Hsueh YM, Smith TJ, Ryan LM, Lee MS, Christiani DC (2003): Arsenic methylation and bladder cancer risk in Taiwan. Cancer Causes Control <u>14</u>, 303–310
- Chen Y, Rosen BP (1997): Metalloregulatory properties of the ArsD repressor. J Biol Chem <u>272</u>, 14257-14262
- Chen CJ, Chen CW, Wu MM, Kuo TL (1992): Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. Br J Cancer <u>66</u> (5), 888-892
- Chen CJ, Chuang YC, Lin TM, Wu HY (1985): Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: high arsenic artesian well water and cancers. Cancer Res <u>45</u> (2), 5895-5899
- Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I and Gottesman MM (1990): Heat shock and arsenite increase expression of the multudrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. J Biol Chem <u>265</u>, 221–226
- Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD (2006): Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. Critical Reviews in Toxicology <u>36</u>, 99-133
- Cole SP (1999): Re: Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. J Natl Cancer Inst <u>91(10)</u>, 888-889
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH (1992): Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science <u>258</u>, 1650-1654
- Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deely RG (1994): Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. Cancer Res <u>54</u> (22), 5902-5910
- Crecelius EA (1977): Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. Environ Health Perspect <u>19</u>, 147-150
- Cui X, Kobayashi Y, Hayakawa T, Hirano S (2004): Arsenic speciation in bile and urine following oral and intravenous exposure to inorganic and organic arsenics in rats Toxicol Sci. <u>82</u>, (2) 478-487

- Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D (1999): Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. Mol Pharmacol <u>55</u> (5), 929-937
- Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y (1999): Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. Blood <u>93</u> (1), 268-277
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. J Lipid Res <u>42</u> (7), 1007-1017
- De Chaudhuri S, Ghosh P, Sarma N, Majumdar P, Sau TJ, Basu S, Roychoudhury S, Ray K, Giri AK (2008): Genetic variants associated with arsenic susceptibility: study of purine nucleoside phosphorylase, arsenic (+3) methyltransferase, and glutathione Stransferase omega genes. Environ Health Perspect <u>116</u> (4), 501-505
- Deeken JF, Löscher W (2007): The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. Clin Cancer Res <u>13</u>, 1663–1674
- Deeley RG, Westlake C, Cole SP (2006): Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. Physiol Rev <u>86</u> (3), 849-899
- Deeley RG, Cole SP (2003): Multidrug Resistance Protein 1. In: Holland IB, Cole SP, Kuchler K, Higgins CF, editors. ABC Proteins: From Bacteria to Man. 393-422
- Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ (1993): Transfer of arsenite from glutathione to dithiols: a model of interaction. Chem Res Toxicol <u>6</u> (5), 598-602
- Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ (1994): Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. Chem Biol Interact <u>90</u> (2), 139-155
- Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderón-Aranda ES, Manno M, Albores A (2001): Stress proteins induced by arsenic. Toxicol Appl Pharmacol 177 (2), 132-148
- Dey S, Rosen BP (1995): Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. J Bacteriol <u>177</u>, 385-389

- Dey S, Papadopoulon B, Roy G, Grondin K, Dou D, Rosen BP, Quellette M (1994): Active efflux of arsenite in oxyanion resistant Leishmania is independent of the amplification of the P-glycoprotein related gene ltpgpA. Mol Biol Parasitol <u>67</u>, 49-57
- Donahue BA, Augot M, Bellon SF, Treiber DK, Toney JH, Lippard SJ, Essigmann JM (1990): Characterization of a DNA damage-recognition protein from mamma lian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. Biochemistry <u>29</u> (24), 5872-5880
- Dong JT, Luo XM (1993): Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. Mutat Res <u>302</u> (2), 97-102
- Dopp E, von Recklinghausen U, Diaz-Bone R, Hirner AV, Rettenmeier AW (2009): Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compounds in methylating and nonmethylating cells. Environ Re <u>110</u> (5), 435-442
- Dopp E, Hartmann LM, Florea AM, von Recklinghausen U, Pieper R, Shokouhi B, Rettenmeier AW, Hirner AV, Obe G (2004): Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinesehamster ovary (CHO) cells.Toxicol Appl Pharmacol <u>201</u> (2), 156-165
- Drobná Z, Walton FS, Paul DS, Xing W, Thomas DJ, Stýblo M (2010): Metabolism of arsenic in human liver: the role of membrane transporters. Arch Toxicol <u>84</u> (1), 3-16.
- Drobná Z, Xing W, Thomas DJ, Stýblo M (2006): shRNA silencing of AS3MT expression minimizes arsenic methylation capacity of HepG2 cells. Chem Res Toxicol <u>19</u>, 894– 898
- Drobná Z, Waters SB, Walton FS, LeCluyse EL, Thomas DJ, Styblo M (2004): Interindividual variation in the metabolism of arsenic in cultured primary human hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol <u>201</u>, 166–177
- Dulout FN, Grillo CA, Seoane AI, Maderna CR, Nilsson R, Vather M, Darroudi F, Natarajan AT (1996): Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. Mutat Res <u>370</u> (3-4), 151-158
- Eguchi N, Kuroda K, Endo G (1997): Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. Arch Environ Contam Toxicol <u>32</u> (2), 141-145

- Evens AM, Tallman MS, Gartenhaus RB (2004): The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. Leukemia Research <u>28</u>, 891-900
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003): HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res <u>534</u> (1-2), 65-75
- Fausto N (2000): Liver regeneration. J Hepatol 32, 19-31
- Fenech M (2000): The in vitro micronucleus technique. Mutat Res 455 (1-2), 81-95
- Fenech M (1997): The zytogenesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat Res <u>285</u>, 35-44
- Fischer AB, Buchet JP, Lauwerys RR (1985): Arsenic uptake, zytotoxicity and detoxification studied in mamma lian cells in culture. Arch Toxicol <u>57</u>, 168-172
- Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ (1996): Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol <u>148</u> (4), 1237-1247
- Gamble MV, Liu X, Ahsan H, Pilsner R, Ilievski V, Slavkovich V, Parvez F, Levy D, Factor-Litvak P, Graziano JH (2005): Folate, homocysteine and arsenic metabolism in arsenic-exposed individuals in Bangladesh. Environ Health Perspect <u>113</u>, 1683-1688
- Gebel T (1997): Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. Chem Biol Int <u>107</u>, 131-144
- Gebel T (1998): Suppresion of arsenic-induced chromosome mutagenicity by antimony. Mutat Res <u>412</u>, 213-218
- Gebel T, Leister M, Schumann W, Hirsch-Ernst K (2002): Low-level self-tolerance to arsenite in human HepG2 cells is associated with a depressed induction of micronuclei. Mutat Res <u>514</u>, 245-255
- Gebel TW (2001a): Unanswered questions in arsenic toxicology. J Environ Pathol Toxicol Oncol <u>20</u> (4), 299-309

- Gebel TW (2001b): Gentoxicity of arsenical compounds. Int J Hyg Environ Health 203 (3), 249-262
- Ghosh M, Shen J, Rosen BP (1999): Pathways of As (III) detoxification in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA <u>96</u>, 5001-5006
- Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME (1992): High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 89, 3070–3074.
- Goering PL, Aposhian HV, Mass MJ, Cebrian M, Beck BD, Waalkes MP (1999): The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. Toxicol Sci <u>49</u> (1), 5-14
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATPdependent transporters. Nat Rev Cancer <u>2</u> (1), 48-58
- Gregus Z, Gyurasics A, Csanaky I (2000): Biliary and urinary excretion of inorganic arsenic:monomethylarsonous acid as a major biliary metabolite in rats. Toxicol Sci 56 (1), 18-25
- Gurr JR, Lin YC, Ho IC, Jan KY, Lee TC (1993): Induction of chromatid breaks and tetraploidy in Chinese hamster ovary cells by treatment with sodium arsenite during the G2 phase. Mutat Res <u>319</u> (2), 135-142
- Gyurasics A, Varga F, Gregus Z (1991): Glutathione-dependent biliary excretion of arsenic. Biochem Pharmacol <u>42</u> (3), 465-468
- Hall AH (2002): Chronic arsenic poisoning. Toxicology Letters 128, 69-72
- Haque R, Mazumder DN, Samanta S, Ghosh N, Kalman D, Smith MM, Mitra S, Santra A, Lahiri S, Das S, De BK, Smith AH (2003): Arsenic in drinking water and skin lesions: dose-response data from West Bengal, India. Epidemiology <u>14</u> (2), 174-182
- Hartwig A, Pelzer A, Asmuss M, Bürkle A (2003): Very low concentrations of arsenite suppress poly (ADP-ribosyl)ation in mammalian cells. Int J Cancer <u>104</u> (1), 1-6
- Hartwig A, Groblinghoff DU, Beyersmann D, Natarajan AT, Filon R, Mullenders LH (1997):
 Interaction of arsenic (III) with Nukleotide exicision repair in UV-irradiated human fibroblasts. Carcinogenesis <u>18</u> (2), 399-405

- Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, Hirano S (2005): A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. Arch Toxicol <u>9</u> (4), 183-1891
- Hayes RB (1997): The carcinogenicity of metals in humans. Cancer Causes Control <u>8</u> (3), 371-385
- Healy SM, Zakharyan RA, Aposhian HV (1997): Enzymatic methylation of arsenic compounds: IV. *In vitro* and vivo deficiency of the methylation of arsenite and momomethylarsonic acid in the guinea pig. Mutat Res <u>386</u> (3), 229-239
- Heck JE, Gamble MV, Chen Y, Graziano JH, Slavkovich V, Parvez F, Baron JA, Howe GR, Ahsan H (2007): Consumption of folate-related nutrients and metabolism of arsenic in Bangladesh. Am J Clin Nutr <u>85</u> (5), 1367-1374
- Hei TK, Liu SX, Waldren C (1998): Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci <u>95</u> (14), 8103-8107
- Henness S, Davey MW, Harvie RM, Davey RA (2002): Fractionated irradiation of H69 small-cell lung cancer cells causes stable radiation and drug resistance with increased MRP1, MRP2, and topoisomerase IIalpha expression. Int J Radiat Oncol Biol Phys <u>54</u> (3), 895-902
- Henry M, Alibert S, Rogier C, Barbe J, Pradines B (2008): Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria. Curr Top Med Chem <u>8</u>, 563–578
- Hernández-Zavala A, Del Razo LM, García-Vargas GG, Aguilar C, Borja VH, Albores A, Cebrián ME (1999): Altered activity of heme biosynthesis pathway enzymes in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. Arch Toxicol <u>73</u> (2), 90-95
- Higgins CF (2007): Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature <u>446</u>, 749–757
- Hirohashi T, Suzuki H, Ito K, Ogawa K, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y (1998): Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in eisai hyperbilirubinemic rats. Mol Pharmacol. <u>53</u> (6), 1068-1075
- Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP (2007): Structure and mechanism of ABC transporter proteins. Curr Opin Struct Biol <u>17</u> (4), 412-418

- Homolya L, Varadi A, Sarkadi B (2003): Multidrug resistance proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfat. Biofactors 17 (1-4), 103-114
- Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, Scheper RJ,
 Borst P, Pinedo HM, Jansen G (1999): Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. Cancer Res <u>59</u> (11), 2532-2535
- Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Smith AH, Kalman DA, Moore LE (1996): Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in drinking water. Environ Health Perspect <u>104</u> (6), 620-628
- Hopenhayn-Rich C, Smith AH, Goeden HM (1993): Human studies do not support the methylation threshold hypothesis for the toxicity of inorganic arsenic. Environ Res <u>60</u> (2), 161-177
- Huang C, Ma WY, Li J, Dong Z (1999): Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. Cancer Res <u>59</u> (13), 3053-3058
- Hughes MF (2002): Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. Toxicol Lett <u>133</u>, 1– 16
- Hunter T (1998): The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci <u>353</u> (1368), 583-605
- Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, Kuo MT (1996): Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. J Biol Chem <u>271</u> (25), 14981-14988
- Ishikawa T, Wright CD, Ishizuka H (1994): GS-pump is functionally overexpressed in cisdiamminedichloroplatinum(II)-resistant human leukemia HL-60 cells and downregulated by cell differentiation. J Biol Chem <u>269</u> (46), 29085-29093
- Ishikawa T (1992): The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. Trends Biochem Sci <u>17</u> (11), 463-468
- Jackson R, Grainge JW (1975): Arsenic and cancer. Can Med Assoc J 113 (5), 396-401
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U (1996): Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. Cancer Res <u>56</u>, 988-994

- Jemal A, Center MM, Ward E, Thun MJ (2009): Cancer occurrence. Methods Mol Biol 471, 3-29
- Ji G, Silver S (1992): Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenicresistance operon of Staphylococcus aureus plasmid pl258. Proc Natl Acad Sci USA <u>89</u>, 9474-9478
- Jones H, Visoottiviseth P, Bux MK, Födényi R, Kováts N, Borbély G, Galbács Z (2008): Case reports: arsenic pollution in Thailand, Bangladesh, and Hungary. Rev Environ Contam Toxicol <u>197</u>, 163-87
- Joshi H, Ghosh AK, Singhal DC, Kumar S (2003): Arsenic contamination in parts of Yamuna sub-basin, West Bengal. Indian J Environ Health <u>45</u>, 265-274
- Kala SV, Neely MW, Kala G, Prater CI, Atwood DW, Rice JS, Lieberman MW (2000): The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. J Biol Chem <u>275</u> (43), 33404-33408
- Kennedy PG (2012): An alternative form of melarsoprol in sleeping sickness. Trends Parasitol <u>56</u> (49), 21-324
- Kenyon EM, Hughes MF (2001): A concise review of the toxicity and carcinogenicity of dimethylarsenic acid. Toxicology <u>160</u> (1-3), 227-236
- Keppler D (2011): Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCCs): importance for pathophysiology and drug therapy. Handb Exp Pharmacol <u>201</u>, 299-323
- Kioka N, Hosokawa N, Komano T, Hirayoshi K, Nagata K and Ueda K (1992): Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the increase of human multidrug resistance gene (MDR1) expression caused by arsenic. FEBS Lett <u>27</u>, 307–309
- Kitchin KT (2001): Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal models and methylated arsenic metabolites. Toxicol Appl Pharmacol <u>172</u>, 249–261
- Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, Winkfield E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop BC, Mass MJ, De Marini DM (2003): Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. Environ Mol Mutagen <u>42</u> (3), 192-205

- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, Borst P (1999): MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. Proc Natl Acad Sci 8, <u>96</u> (12), 6914-6919
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P (1997):
 Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. Cancer Res <u>57</u> (16), 3537-3547
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D (1999a): Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. Biochim Biophys Acta <u>1461</u> (2), 377-394
- König J, Rost D, Cui Y, Keppler D (1999b): Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. Hepatology <u>29</u> (4), 1156-1163
- Kruh GD, Belinsky MG (2003): The MRP family of drug efflux pumps. Oncogene 22 (47), 7537-7552
- Kubo K, Sekine S, Saito M (2009): Compensatory expression of MRP3 in the livers of MRP2-deficient EHBRs is promoted by DHA intake. Biosci Biotechnol Biochem <u>73</u> (11), 2432-2438
- Kuo MT, Bao J, Furuichi M, Yamane Y, Gomi A, Savaraj N, Masuzawa T, Ishikawa T (1998): Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcystein synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. Biochem Pharmacol <u>55</u> (5), 605-615
- Kuroda K, Endo G, Okamoto A, Yoo YS, Horiguchi S (1991): Genotoxicity of beryllium, gallium and antimony in short-term assays. Mutat Res <u>264</u>, 163-170
- Laity JH, Lee BM, Wright PE (2001): Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. Curr Opin Struct Biol <u>11(1)</u>, 39-46
- Lee TC, Wie ML, Chang WJ, Ho IC, Lo JF, Jan KY, Huang H (1989): Elevation of glutathioneS-transferase activity in arsenic resistant Chinese hamster ovary cells. *In vitro* Cell Dev Biol <u>25</u>, 442-448

- Lee TC, Oshimura M, Barrett JC (1985): Comparison of arsenic-induced cell transformation, zytotoxicity, mutation and zytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. Carcinogenesis <u>6</u> (10), 1421-1426
- Lehrbach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry <u>16</u>, 4743-4751
- Leslie EM, Haimeur A, Waalkes MP (2004): Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. J Biol Chem <u>279</u> (31), 32700-32708
- Lerda D (1994): Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. Mutat Res <u>312</u> (2), 111-120
- Li J, Waters SB, Drobna Z, Devesa V, Styblo M, Thomas DJ (2005): Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the inorganic arsenic methylation phenotype Toxicol Appl Pharmacol <u>204</u> (2), 164-169
- Li ZS, Zhao Y, Rea PA (1995): Magnesium Adenosine 5[prime]-Triphosphate-Energized Transport of Glutathione-S-Conjugates by Plant Vacuolar Membrane Vesicles. Plant Physiol <u>107</u> (4), 1257-1268
- Liu Z, Shen, J, Carbrey JM, Mukhopadhyay R, Agre P, Rosen BP (2002): Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. Proc Natl Acad Sci <u>99</u>, 6053– 6058
- Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, Klaassen CD, Waalkes MP (2001): Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. Mol Pharmacol <u>60</u> (2), 302-309
- Loe DW, Deeley RG, Cole SP (2000): Verapamil stimulates glutathione transport by the 190kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics <u>293</u>, 530–538
- Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SPC (1996): Multidrug resistance protein (MRP)mediated transport of leukotriene C₄ and chemotherapeutic agents in membrane vesicles: Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. Biol Chem <u>271</u>, 9675-9682

- Lorico A, Bertola A, Baum C, Fodstad O, Rappa G (2002): Role of the Multidrug Resistence Protein 1 in protection from heavy metal oxyanions: investigations *in vitro* and in MRP1-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun <u>291</u> (3), 617-622
- Lu WJ, Tamai I, Nezu J, Lai ML, Huang JD (2006): Organic anion transporting polypeptide-C mediates arsenic uptake in HEK-293 cells. J Biomed Sci <u>13 (</u>4), 525-533
- Lullmann-Rauch R (1979): Drug-induced lysosomal storage disorders. Front Biol 48, 49-130
- Lüllmann H (1999): Pharmakologie und Toxikologie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Lynn S, Gurr JR, Lai HT, Jan KY (2000): NADH oxidase activation is involved in arseniteinduced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. Circ Res <u>86</u> (5), 514-519
- Manciu L, Chang XB, Buyse F, Hou YX, Gustot A, Riordan JR, Ruysschaert JM (2003): Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. Journal of Biological Chemistry <u>278</u>, 3347–3356
- Marafante E, Vahter M, Envall J (1985): The role of the methylation in the detoxication of arsenate in the rabbit. Chem Biol Interact <u>50</u>, 49
- Marples B, Adomat H, Billings PC, Farrell NP, Koch CJ, Skov KA (1994): Recognition of platinum-induced DNA damage by nuclear proteins: screening for mechanisms. Anticancer Drug Res <u>9</u> (5), 389-399
- Mass MJ, Tennant A, Roop BC, Cullen WR, Styblo M, Thomas DJ, Kligerman AD (2001): Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. Chem Res Toxicol <u>14</u> (4), 355-361
- Matter B, Schmid W (1971): Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mamma lian species, evaluated by the micronucleus test. Mutat Res <u>12</u> (4), 417-425
- Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S (2002): Mechanisms of action of arsenic trioxide. Cancer Res <u>62</u>, (14), 3893-3903
- Mitchell RD, Ayala-Fierro F, Carter DE (2000): Systemic indicators of inorganic arsenic toxicity in four animal species. J Toxicol Environ Health <u>59</u>, 119-134
- Morales KH, Ryan L, Kuo TL, Wu MM, Chen CJ (2000): Risk of internal cancers from arsenic in drinking water. Environ Health Perspect <u>108</u> (7), 655-661

- Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Cao J, Vore M (2001): Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol <u>280</u> (6), 1261-1273
- Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, Silver S (2002): Microbiol arsenic: from geocycles to genes. FEMS Microbiol Rev <u>26</u>, 311-325
- Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y (2002): Coppertransporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. Int J Cancer <u>101</u> (5), 488-495
- Naredi P, Heath D, Enns RE, Howell SB (1995): Crossresistance between cisplatin, antimony potassium tartrate and arsenite in human tumor cells. J Clin Invest <u>95</u>, 1193-1198
- Nies AT, Keppler D (2007): The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). Pflugers Arch <u>453</u> (5), 643-659
- Nies AT, König J, Pfannschmidt M, Klar E, Hofmann WJ, Keppler D (2001): Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. Int J Cancer <u>94</u> (4), 492-499
- Nordstrom DK (2002): Worldwide occurrences of arsenic in groundwater. Science 296, 2144–2145
- Ochi T, Nakajima F, Fukumori N (1998): Different effects of inorganic and dimehtylated arsenic compounds on cell morphology, cytoskeletal organization, and DNA synthesis in cultured Chinese hamster V79 cells. Arch Toxicol <u>72</u> (9), 566-573
- Ochi T, Kaiser T, Oya-Ohta Y (1994): Glutathione plays different roles in the induction of the zytotoxic effects of inorganic and organic arsenic compounds in cultured BALB/c 3T3 cells. Experientia <u>50</u> (2), 115-120
- Ortiz DF, Li S, Iyer R, Zhang X, Novikoff P, Arias IM (1999): MRP3, a new ATP-binding cassette protein localized to the canalicular domain of the hepatocyteAm J Physiol <u>276</u> (6 Pt 1), 1493-1500
- Oude Elferink RPJ, Meijer DKF, Kuipers F (1995). Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. Biochem Biophys Acta <u>1241</u>, 215-268

- Oya-Ohta Y, Kaise T, Ochi T (1996): Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. Mutat Res <u>357</u> (1-2), 123-129
- Paterson JK, Shukla S, Black CM, Tachiwada T, Garfield S, Wincovitch S, Ernst DN, Agadir A, Li X, Ambudkar SV, Szakacs G, Akiyama S, Gottesman MM (2007): Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. Biochemistry <u>46</u> (33), 9443-9452
- Peplow D and Edmonds R (2004): Health risks associated with contamination of groundwater by abandoned mines near Twisp in Okanogan County, Washington, USA. Environ Geochem Health <u>26</u> (1), 69-79
- Perez RP, Hamilton TC, Ozols RF (1990): Resistance to alkylating agents and cisplatin: insights from ovarian carcinoma model systems. Pharmacology and Therapeutics <u>48</u>, 19–27
- Petrick JS, Jagadish B, Mash EA, Aposhian HV (2001): Monomethylarsonous acid (MMA (III)) and arsenite: LD (50) in hamsters and *in vitro* inhibition of pyruvate dehydrogenase. Chem Res Toxicol <u>14</u> (6), 651-656
- Petrick JS, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DE, Vasken Aposhian H (2000): Monomethylarsonous acid (MMA (III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol <u>163</u> (2), 203-207
- Plasschaert SL, de Bont ES, Boezen M, vander Kolk DM, Daenen SM, Faber KN, Kamps WA, de Vries EG, Vellenga E (2005): Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res <u>11</u> (24), 8661-8668
- Priebe W, Krawczyk M, Kuo MT, Yamane Y, Savaraj N, Ishikawa T (1998): Doxorubicinand daunorubicin-glutathione conjugates, but not unconjugated drugs, competitively inhibit leukotriene C₄ transport mediated by MRP/GS-X pump.Biochem Biophys Res Commun <u>247</u> (3), 859-863
- Qian Y, Castranova V, Shi X (2003): New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction. Inorg Biochem <u>96</u> (2-3), 271-278
- Rahman M, Tondel M, Ahmad SA, Chowdhury IA, Faruquee MH, Axelson O (1999): Hypertension and arsenic exposure in Bangladesh. Hypertension <u>33</u> (1), 74-78

Ratnaike RN (2003): Acute and chronic arsenic toxicity. Postgrad Med J 79, 391-396

- Reddy MM, Light MJ, Quinton PM (1999): Activation of the epithelial Na+ channel (ENaC) requires CFTR Cl- channel function. Nature <u>402</u>, 301–304
- Rosen BP, Liu Z (2009): Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. Environ Int <u>35</u> (3), 512-515
- Rosen BP (2002): Minireview Biochemistry of arsenic detoxification. FEBS Lett 529, 86-92
- Rosen BP (1999): Families of Arsenic transporters. Trends in Mircob 7, 207-212
- Rossman TG (2003): Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. Mutat Res. 533, 37–65
- Rossman TG, Goncharova EI, Rajah T, Wang Z (1997): Human cells lack the inducible tolerance to arsenite seen in hamster cells. Mutat Res <u>386</u> (3), 307-314
- Rost D, König J, Weiss G, Klar E, Stremmel W, Keppler D (2001): Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. Gastroenterology <u>121</u> (5), 1203-1208
- Sanger F, Coulson AR (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol <u>94 (3)</u>, 441-448
- Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D (1997):
 Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. J Am Soc Nephrol <u>8</u> (8), 1213-1221
 Schaumlöffel N, Gebel T (1998): Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. Mutagenesis <u>13</u> (3), 281-286
- Schinkel AH, Jonker JW (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Adv Drug Deliv Rev <u>55</u>, 3–29
- Schwerdtle T, Walter I, Mackiw I, Hartwig A (2003): Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. Carcinogenesis <u>24</u> (5), 967-974
- Sciandrello G, Barbaro R, Caradonna F, Barbata G (2002): Early induction of genetic instability and apoptosis by arsenic in cultured Chinese hamster cells. Mutagenesis <u>17</u> (2), 99-103

- Silver S, Phung LT (1996): Bacterial Heavy Metal Resistance. New Surprises. Ann Rev Microbiol <u>50</u>, 753–89
- Smith AH, Lingas EO, Rahman M (2000): Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. Bull World Health Organ <u>78</u>, 1093–1103
- Smith AH, Goycolea M, Haque R, Biggs ML (1998): Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. Am J Epidemiol <u>147</u> (7), 660-9
- Snyder R (1990): Modulation of DNA repair by metals. CRC Press, Metal Carcinogenesis Vol <u>2</u>, 347-368
- Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen ZS (2012): Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. Chin J Cancer <u>31</u> (2), 58-72
- Sordo M, Herrera LA, Ostrosky-Wegman P, Rojas E (2001): Zytotoxic and genotoxic effects of As, MMA, and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes. Carcinog Mutagen <u>21</u> (4), 249-60
- Southern EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J Mol Biol <u>98</u>, 503-517
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ (2000): Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol <u>279</u> (4), 1495-1503
- Styblo M, Drobná, Z, Jaspers I, Lin S, Thomas DJ (2002): The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update Environmental Health Perspectives, <u>110</u> (5), 767-771
- Styblo M, Del Razo LM, Vega L, Germolec DR, LeCluyse EL, Hamilton GA, Reed W, Wang C, Cullen WR, Thomas DJ (2000): Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. Arch Toxicol <u>74</u> (6), 289-299
- Suzuki KT, Tomita T, Ogra Y, Ohmichi M (2001): Glutathione-conjugated Arsenics in the Potential Hepato-enteric Circulation in Rats. Chem Res Toxicol <u>14</u> (12), 1604-1611
- Suzuki H, Sugiyama Y (1998): Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. Semin Liver Dis <u>18</u> (4), 359-376

- Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006): Targeting multidrug resistance in cancer. Nat Rev Drug Discov 5, 219–234
- Tapio S, Grosche B (2006): Arsenic in the aetiology of cancer. Mutation Research <u>612</u>, 215-246
- Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001): The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. Toxicol Appl Pharmacol <u>176</u> (2), 127-144
- Thompson DJ (1993): A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. Chem Biol Interact <u>88</u> (2-3), 89-14
- Tiwari AK, Sodani K, Dai CL, Ashby CR Jr, Chen ZS (2011): Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. Curr Pharm Biotechnol <u>12</u> (4), 570-94
- Tondel M, Rahman M, Magnuson A, Chowdhury IA, Faruquee MH, Ahmad SA (1999): The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh.Environ Health Perspect <u>107</u> (9), 727-729
- Toyoda Y, Hagiya Y, Adachi T, Hoshijima K, Kuo MT, Ishikawa T (2008): MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. Xenobiotica <u>38</u> (7-8), 833-62
- Tsai SH, Hsieh MS, Chen L, Liang YC, Lin JK, Lin SY (2001): Suppression of Fas ligand expression on endothelial cells by arsenite through reactive oxygen species. Toxicol Lett <u>123(1)</u>, 11-9
- Tseng CH (2004): The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. Toxicol Appl Pharmacol <u>197</u> (2), 67-83
- Ueda K, Suzuki H, Akiyama S, Sugiyama Y (1999): Differences in substrate specificity among glutathione conjugates (GS-X) pump family members: comparison between multidrug resistance-associated protein and a novel transporter expressed on a cisplatin-resistant cell line (KCP-4). Jpn J Cancer Res <u>90</u> (4), 439-447
- Vahter M, Concha G (2001): Role of metabolism in arsenic toxicity. Pharmacol Toxicol <u>89</u> (1), 1-5
- Vahter M (2000): Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. Toxicol Lett <u>112</u>, 209-217

- Vahter M, Concha G, Nermell B, Nilsson R, Dulout F, Natarajan AT (1995): A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. Environ Toxicol Pharm Sec 293, 455-462
- Vahter M, Marafante E (1987): Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation of arsenite in the rabbit. Toxicol Lett <u>37</u>, 41–46
- Vahter M, Marafante E and Dencker L (1984): Tissue distribution and retention of 74Asdimethylarsinic acid in mice and rats. Arch. Environ Contam Toxicol <u>13</u>, 259-264
- Vanhoefer U, Cao S, Minderman H, Toth K, Skenderis BS 2nd, Slovak ML, Rustum YM (1996): d,l-buthionine-(S,R)-sulfoximine potentiates in vivo the therapeutic efficacy of doxorubicin against multidrug resistance protein-expressing tumors. Clin Cancer Res.12 (2), 1961-1968
- Vega L, Styblo M, Patterson R, Cullen W, Wang C, Germolec D (2001): Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cells proliferation and zytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. Toxicol Appl Pharmacol <u>172</u> (3), 225-232
- Vega L, Gonsebatt ME, Ostrosky-Wegmann P (1995): Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes *in vitro*: an individual susceptibility effect detected. Mutat Res <u>334</u> (3), 365-373
- Vernhet L, Allain N, Bardiau C, Anger JP, Fardel O (2000): Differential sensitivities of MRP1-overexpressing lung tumor cells to cytotoxic metals. Toxicology <u>142</u> (2), 127-134
- Walter I, Schwerdtle T, Thuy C, Parsons JL, Dianov GL, Hartwig A (2007): Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene expression and poly(ADP-ribosyl)ation in cultured human cells. DNA Repair (Amsterdam) <u>6</u>, 61-70
- Wang SL, Zhang J, Yang DS, Fan SW (2003): Zytotoxic efffect of thermo-chemotherapy with cisplatin on osteosarcoma OS-732 cell line. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban <u>32</u> (5), 427-432
- Wang Z, Rossman TG (1996): The carcinogenicity of arsenic. In:Chang LW, Toxicology of Metals, CRC Press, Boca Raton, FL 219-227

- Wang Z, Dey S, Rosen BP, Rossman TG (1996): Efflux-mediated resistance to arsenicals in arsenic-resisant and-hypersensitive Chinese hamster cells. Toxicol Appl Pharmacol <u>137</u>, 112-119
- Wang HF, Lee TC (1993): Glutathione S-transferase pi facilitates of the excretion of arsenic from arsenic-reistant Chinese hamster ovary cells. Biochem Biophys Res Commun <u>192</u>, 1093-1099
- Waters SB, Devesa V, Fricke MW, Creed JT, Styblo M, Thomas DJ (2004): Glutathione modulates recombinant rat arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase-catalyzed formation of trimethylarsine oxide and trimethylarsine. Chem Res Toxicol <u>17</u>, 1621– 1629
- WHO (2002): Arsenic and Arsenic Compounds. 2nd ed. Environmental Health Criteria 224,World Health Organization, Geneva
- Wijeweera JB, Gandolfi AJ, Parrish A, Lantz RC (2001): Sodium arsenite enhances AP-1 and NfkappaB DNA binding and induces stress protein expression in precision-cut rat lung slices. Toxicol Sci <u>61</u> (2), 283-294
- Winckler J (1974): Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red. Prog Histochem Cytochem <u>6</u> (3), 1-91
- Wright SR, Boag AH, Valdimarsson G, Hipfner DR, Campling BG, Cole SP, Deeley RG (1998): Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. Clin Cancer Res <u>4</u> (9), 2279-89
- Yamazaki M, Suzuki H, Sugiyama Y (1996): Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. Pharm Res <u>13</u>, 497-513
- Yang C, Frenkel K (2002): Arsenic-mediated cellular signal transduction, transcription factor activation, and aberrant gene expression: implications in carcinogenesis. J Environ Pathol Toxicol Oncol <u>21</u> (4), 331-42
- Yin ZL, Dahlstrom JE, Le Couteur DG, Board PG (2001): Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. J Histochem Cytochem <u>49</u>, 983–987
- Yompakdee C, Bun-ya M, Shikata K, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y (1996): A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of Saccharomyces cerevisiae. Gene <u>171</u>, 41-47

- Yu L, Kalla K, Guthrie E, Vidrine A, Klimecki WT (2003): Genetic variation in genes associated with arsenic metabolism: glutathione s-transferase omega 1-1 and purine Nukleoside phoshorylase polymorhismus in european and indigenous americans. Environ Health Perspect <u>111</u> (11), 1421-1427
- Zeng H, Liu G, Rea PA, Kruh GD (2000): Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. Cancer Res <u>60</u> (17), 4779-4784
- Zhang TC, Cao EH, Li JF, Ma W, Qin JF (1999): Induction of apoptosis and inhibition of human gastric cancer MGC-803 cell growth by arsenic trioxide. Eur J Cancer <u>35</u>, 1258-1263
- Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsaprailis G, Board PG, Liebler DC, Aposhian HV (2001): Human monomehylarsonic acid (MMA) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. Chem Res Toxicol <u>14</u> (8), 1051-1057
- Zakharyan RA, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DM, Aposhian HV (1999): Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMA) is the substrate for MMA methyltransferase of rabbit liver and human hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol <u>158</u> (1), 9-15
- Zaman GJ, Lankelma J, van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, Oude Elferink RP, Baas F, Borst (1995): Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. Proc Natl Acad Sci USA <u>92</u> (17), 7690-7695
- Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Scheper RJ, Baas F, Broxtermann HJ et al. (1994): The human multidrug resistanceassociated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. Proc Natl Acad Sci USA <u>91</u>, 8822-8826
- Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, Knipscheer P, Schellens JH, Schinkel AH, Borst P (2003): Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). Biol Chem <u>278</u> (26), 23538-23544
- Zwelling LA, Bradley MO, Sharkey NA, Anderson T, Kohn KW (1979): Mutagenicity, zytotoxocity and DNA crosslinking in V79 Chinese hamster cells treated with cisand trans Pt(II) diamminedichloride. Mutat Res <u>67</u> (3), 271-280

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Dunkelberg für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten im Zentrum der Umwelt- und Arbeitsmedizin sowie Herrn Prof. Dr. Georg Friedrich Kahl für den zur Verfügung gestellten Laborarbeitsplatz in der Abteilung Toxikologie.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. T. W. Gebel bin ich für die Durchführung meiner Experimente in der Abteilung Allgemeine Hygiene und Umweltmedizin zu Dank verpflichtet. Seine wissenschaftliche Hilfestellung und seine stete Ansprechbarkeit machten seine Betreuung so wertvoll.

Frau PD Dr. rer.nat. Karen Hirsch-Ernst verdanke ich die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente in der Abteilung Toxikologie. Ihr persönliches Engagement und ihre wissenschaftliche Hilfestellung sowie ihr Hinführen zum wissenschaftlichen Arbeiten haben einen wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Frauke Petry, für ihre ausgezeichnete praktische Unterstützung und wertvolle Begleitung, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht fertiggestellt hätte werden können.

Darüberhinaus hatte sie immer ein offenes Ohr für wissenschaftliche Fragestellungen und half mir mit Ihrem zuversichtlichen Zuspruch geduldig weiter.

Frau Susanne Luthin, Frau Petra Birkenkamp, Frau Anja Galinski und Frau Christina Lauterberg möchte ich für ihre Einarbeitung in die angewendeten Labortechniken, ihre stete Hilfsbereitschaft sowie die Durchführung des Neutralrot-Assays danken. Meinen Dank möchte ich auch Frau Sonja Blume, Frau Gudrun Rüdell und Frau Anke Gregus aussprechen, für ihre ausgezeichnete Einarbeitung in die angewendeten Labortechniken, ihre stets zuvorkommende Hilfsbereitschaft sowie die Durchführung der Hybridisierungsarbeiten.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung Hygiene- und Umweltmedizin sowie der Abteilung Toxikologie für die stets freundliche und produktive Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit.