

Aus dem
Charite Centrum für Innere Medizin mit Kardiologie, Gastroenterologie, Nephrologie
Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie und Hepatologie
Direktor: Prof. Dr. med. Bertram Wiedenmann

Habilitationsschrift

Neue Ansätze zur Prävention der Entzündungsassoziierten Karzinogenese und zum Verständnis von Chemotherapieresistenz

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Karsten-Henrich Weylandt
geboren am 26. Juli 1973 in Hamburg

Eingereicht: Oktober 2007

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul
1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. W. Lohse
2. Gutachter: Prof. Dr. med. P. R. Galle

Inhaltsverzeichnis:

1.	Zusammenfassung	3
2.	Eigene Ergebnisse	5
2.1	Omega-3 und omega-6 Fettsäuren und ihre Lipidmediatoren	5
2.1.1	Transgene Mäuse mit hohen endogenen omega-3 Fettsäurespiegeln sind vor Kolitis geschützt	11
2.1.2	Omega-3 Fettsäuren lindern die D-GalN/LPS-induzierte Hepatitis durch Suppression von Zytokinen	18
2.1.3	Die Kolitis-assoziierte Kolontumorigenese wird in transgenen Mäusen mit hohen omega-3 Fettsäurespiegeln supprimiert.	25
2.2	CLC-3 und azidische intrazelluläre Kompartimente bei der Chemotherapieresistenz	31
2.2.1	Das humane CLC-3-Protein ist nicht der schwellungsaktivierte Chloridkanal, der bei der Regulation des Zellvolumens beteiligt ist	36
2.2.2	CLC-3 Expression erhöht die Etoposid-Resistenz durch eine gesteigerte Azidifizierung des späten endozytotischen Kompartimentes	44
3.	Diskussion	61
4.	Schlussfolgerungen und Ausblick	68
5.	Verzeichnis der eingebundenen Literatur	70
6.	Literatur	71
7.	Danksagungen	78
8.	Eidesstattliche Erklärung	79

1. Zusammenfassung

Lipide und Lipidmediatoren in Inflammation und Karzinogenese

Mehrfach ungesättigte Omega-6 (n-6) und omega-3 (n-3) Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFA) sind Vorläufer von potenten Lipidmediatoren und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation inflammatorischer Vorgänge. Im Allgemeinen fördern n-6 PUFA die Entzündung, während n-3 PUFA anti-inflammatorische Eigenschaften haben. Für diesen anti-inflammatorischen Effekt sind neu entdeckte Resolvine wichtig, dies sind hochaktive Lipidmediatoren, die sich direkt von n-3 PUFA ableiten.

In den hier vorgestellten Studien benutzten wir die transgene fat-1 Maus, die eine Desaturase des Nematoden *C. elegans* exprimiert und dadurch endogen n-3 PUFA aus n-6 PUFA bilden kann. In diesem Tiermodell untersuchten wir den Effekt eines erhöhten n-3 PUFA Gewebestatus auf eine akute chemisch induzierte Hepatitis, auf eine akute ebenfalls chemisch induzierte Kolitis und auf die Kolontumorigenese.

Unsere Daten zeigen geringer ausgeprägte entzündliche Leberschäden in fat-1 Mäusen mit einem ausgeglichenen n-6/n-3 PUFA Verhältnis. Zudem konnten wir nachweisen, dass ein erhöhter n-3 PUFA Gewebestatus in den transgenen fat-1 Mäusen zur signifikanten Bildung anti-inflammatorischer Resolvine und zur effektiven Verringerung der Entzündung und Gewebeverletzung in dem verwendeten Kolitismodell führt. Die endogene Zunahme von n-3 PUFA und ihrer Stoffwechselprodukte führte zur Suppression der Expression der induzierbaren Stickstoffoxid Synthase (iNOS), der Aktivität des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors Nuclear Factor kappa B (NF κ B) sowie einer geringeren Expression von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin 1 beta (IL-1 β). In einem nächsten Schritt konnten wir zeigen, dass der endogen erhöhte Gehalt an n-3 PUFA in dem transgenen fat-1 Mausmodell die Inzidenz und das Wachstum von Kolontumoren senkt, die durch die Kombination eines entzündlichen Stimulus mit einem Karzinogen induziert werden. Dieser Effekt wurde ebenfalls begleitet von einer niedrigeren NF κ B-Aktivität sowie von einer erhöhten Expression des Transforming Growth Factor beta (TGF- β) im Kolangewebe und einer erniedrigten Expression der iNOS in den Tumoren der fat-1 Tiere.

Zusammengefasst etablieren diese Resultate die transgene fat-1 Maus als neues experimentelles Modell für die Untersuchung der aus n-3 PUFA gebildeten

Lipidmediatoren und liefern neue Hinweise für die hemmende Wirkung von n-3 PUFA auf Entzündung und Karzinogenese im Gastrointestinaltrakt.

Chemotherapieresistenz durch intrazelluläre Chloridkanäle

Chemotherapieresistenz und nachfolgend therapeutisches Versagen der Chemotherapie ist ein klinisch hochrelevantes Problem, das die therapeutischen Möglichkeiten bei metastasierten Tumorerkrankungen limitiert. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Azidifizierung von intrazellulären Organellen Chemotherapieresistenz begünstigen kann, indem die Organellen zu Orten der Medikamenten-Sequestrierung werden.

CIC-3, ein Mitglied der CIC Chloridkanal/Transporter-Familie, wird in intrazellulären Kompartimenten neuronaler Zellen exprimiert und ist bei der Azidifizierung dieser Kompartimente beteiligt. Somit könnte die die CIC-3 Expression eine Chemotherapieresistenz begünstigen.

Diesen Überlegungen folgend konnten wir zeigen, dass CIC-3 auch in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzelllinien exprimiert wird und in endosomal/lysosomalen LAMP-1-positiven Kompartimenten dieser Zellen lokalisiert. Die Überexpression von CIC-3 erhöhte die Azidität der intrazellulären Vesikel und die Resistenz der Zellen gegen das Chemotherapeutikum Etoposid.

Damit liefern diese Resultate die ersten Hinweise für eine Rolle von intrazellulären CIC Proteinen bei der Modulation von Chemotherapieresistenz.

2. Eigene Ergebnisse

2.1 Omega-3 und omega-6 Fettsäuren und ihre Lipidmediatoren

In der menschlichen Ernährung finden sich zwei Arten mehrfach ungesättigter essentieller Fettsäuren, omega-6 und omega-3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren (n-6 und n-3 polyunsaturated fatty acids, PUFA). Die Bezeichnungen leiten sich von der Position der ersten Doppelbindung vom Methyl-Ende her ab. Wie viele andere essentielle Nahrungsbestandteile (Vitamine und Spurelementen) sind diese Fettsäuren für grundlegende zelluläre Funktionen wichtig. Die essentiellen mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind Vorläufer von Lipidmediatoren, die bei einer Vielzahl zellulärer Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind.

Der pro-inflammatorische Effekt vieler Prostaglandine, die sich im Wesentlichen von der n-6 PUFA Arachidonsäure ableiten, ist wissenschaftlich gut etabliert. Jedoch gibt es auch anti-inflammatorische Lipidmediatoren. Dies sind die Lipoxine, die sich ebenfalls von der n-6 PUFA Arachidonsäure herleiten, aber insbesondere auch die Resolvine, die sich aus den n-3 PUFA ableiten. Diese Lipidmediatoren kontrollieren, verhindern und lindern in einer Vielzahl experimenteller Modelle entzündliche Störungen und sind insbesondere auch bei der Auflösung von Entzündungsreaktionen (Resolution) beteiligt (Schwab et al., 2007).

Die heutige westliche Diät hat ein Verhältnis von n-6 zu n-3 PUFA von 15 zu 1. Dies steht in deutlichem Kontrast zu Daten, die nahe legen, dass während der Evolution des Menschen zumeist ein ausgeglichenes n-6 zu n-3 PUFA Verhältnis von 1:1 in der Nahrung vorherrschte (Eaton and Konner, 1985). In Anbetracht der wichtigen Rolle der aus diesen Fettsäuren abgeleiteten Lipidmediatoren könnte dieses Ungleichgewicht von großer Bedeutung für die Pathophysiologie vieler so genannter Zivilisationskrankheiten sein (Simopoulos, 2002).

In der Vergangenheit hat sich die Erforschung von Lipidmediatoren auf die n-6 PUFA Arachidonsäure (AA) als dem klassischen Vorläufer der bioaktiven Prostaglandine und Leukotriene konzentriert. Die Prostaglandin-Signaltransduktionskaskaden sind für viele physiologische Signale bei der Inflammation und Proliferation bis hin zur

Nocizeption, Nierenfunktion, Hämodynamik und Blutgerinnung wesentlich (Moncada et al., 1973; Tilley et al., 2001). Zwei unterschiedliche Isoformen der Cyclooxygenase, COX-1 und COX-2, katalysieren den ersten Schritt in der Prostaglandinsynthese. COX-1 wird konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert, während das Isoenzym COX-2 besonders in akuten Stress-Situationen wie Entzündungen exprimiert wird (Warner and Mitchell, 2004). Die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch klinisch weit verbreitete nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) wie Acetylsalicylsäure (ASS) und anderen Substanzen ist einer der wichtigsten therapeutischen Ansätze in der klinischen Medizin. Diese weit verbreiteten Medikamente sind Hemmer der COX-Enzyme (Roth et al., 1975). Auch die Leukotriene sind wichtige Mediatoren bei pathophysiologischen Vorgängen. Sie werden aus der n-6 PUFA Arachidonsäure durch Lipoxygenasen (LOX) gebildet. In der Pathogenese des Asthmas vermitteln Leukotriene Chemotaxie (Yokomizo et al., 1997) und sind bei der Bronchokonstriktion, bei der Schleimproduktion und bei der Entwicklung submuköser Ödeme beteiligt (Peters-Golden et al., 2005). Zudem scheint Leukotrien B₄ bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmkrankheiten eine Rolle zu spielen (Sharon and Stenson, 1984). Zusammengenommen vermitteln somit die meisten der aus der n-6 PUFA Arachidonsäure gebildeten Lipidmediatoren pro-inflammatorische Signale. Dies wird durch den Gebrauch der Synthesehemmer dieser Substanzen in der klinischen anti-inflammatorischen Therapie eindrucksvoll unterstrichen.

In den letzten Jahren haben nun verschiedene Studien die neu entdeckten anti-inflammatorischen Lipidmediatoren der n-6 PUFA Arachidonsäure (die Lipoxine und die Aspirin-getriggerten Lipoxine) und die ebenfalls potent anti-inflammatorischen Lipidmediatoren der n-3 PUFA Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA), die Resolvine und Protektin D1, charakterisiert. Die wichtigen n-3 und n-6 PUFA und ihre Lipidmediatoren sind in der Abbildung 1 (Weylandt and Kang, 2005) zur besseren Übersicht zusammengestellt.

Siehe **Figure** in

Lancet. 2005 Aug 20-26;366(9486):618-20.

Rethinking lipid mediators.

Weylandt KH, Kang JX.

PMID: 16112288

Abbildung 1.

Schematischer Überblick über Lipidmediatoren. Zu beachten sind insbesondere die aus Arachidonsäure abgeleiteten Lipoxine und aus n-3 PUFA abgeleiteten Resolvine und Protektin (Weylandt and Kang, 2005).

Lipoxine - anti-inflammatorische Lipidmediatoren der Arachidonsäure.

Die in den letzten 23 Jahren von Charles Serhan und Mitarbeitern entdeckten und charakterisierten Lipoxine (LX) (Serhan et al., 1984) werden durch Zell-Zellinteraktionen und die aufeinander folgende Umwandlung der n-6 PUFA Arachidonsäure durch unterschiedliche Lipoxygenasen synthetisiert. Die 5-Lipoxygenase der Leukozyten (5-LO) erzeugt zunächst Leukotrien A4 (LTA4) aus der Arachidonsäure. Das Lipoxin LXA4 wird dann in Thrombozyten durch die Oxygenasetätigkeit der 12-Lipoxygenase (12-LO) gebildet (Parkinson, 2006). Viele Studien zeigen, dass diese Vermittler und ihre stabilen Analoge Entzündungsreaktionen lindern können (Gewirtz, 2005; McMahon and Godson, 2004). Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) hat eine besondere Rolle bei der Entstehung der Lipoxine. Die Acetylierung von COX-2 durch Acetylsalicylsäure (ASS) hemmt das Enzym nicht vollständig, sondern modifiziert die katalysierte Reaktion, so dass die

acetylierte COX-2 als Lipoxygenase wirkt und 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE, einen Lipoxinvorläufer) aus Arachidonsäure synthetisiert. Aus diesem Lipoxinvorläufer bildet die 5-LO dann 15-epi-LXA4 und 15-epi-LXB4, die so genannten Aspirin-getriggerten Lipoxine (ATLs) mit stärkeren entzündungshemmenden Effekten als LXA4 (McMahon and Godson, 2004).

Resolvine - anti-inflammatorische Lipidmediatoren aus omega-3 Fettsäuren.

In den letzten Jahren hat sich der Fokus der Forschung auch auf die aus n-3 PUFA entstehenden Lipidmediatoren gerichtet (Weylandt and Kang, 2005). Von n-3 PUFA abgeleitete Resolvine wurden in den letzten Jahren ebenfalls im Labor von Charles Serhan identifiziert (Serhan et al., 2000; Serhan et al., 2002) und scheinen bei der Auflösung von Entzündungen (Resolution) beteiligt zu sein (Schwab et al., 2007; Serhan, 2005). Docosahexaensäure (DHA), eine n-3 PUFA mit 22 Kohlenstoffatomen, ist der Vorläufer einiger stark entzündungshemmender Mediatoren (Resolvin D1 bis D6 und Neuroprotektin D1/Protektin D1) (Hong et al., 2003; Hong et al., 2007). Resolvin E1 (RvE1) und Resolvin E2 leiten sich aus der Eicosapentaensäure (EPA, einer n-3 PUFA mit 20 Kohlenstoffatomen) ab und zeigten in verschiedenen Kontexten eine starke entzündungshemmende Wirkung (Arita et al., 2005a; Arita et al., 2005b; Lu et al., 2007; Tjonahen et al., 2006).

Resolvin E1 ist der erste von n-3 PUFA abgeleitete Lipidmediator, für den mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor ChemR23 ein spezifischer Rezeptor charakterisiert wurde (Arita et al., 2005a). Vermittelt durch diesen Rezeptor kann Resolvin E1 die Aktivität von NF κ B hemmen und führt bereits in nanomolaren Konzentrationen zur Hemmung inflammatorischer Vorgänge in verschiedenen Entzündungsmodellen (Arita et al., 2005c; Hasturk et al., 2006; Schwab et al., 2007). Zusätzlich zur Bindung an ChemR23 konnte zudem eine Bindung von Resolvin E1 an den Leukotrien B4 Rezeptor BLT1 und eine Resolvin E1-abhängige Unterdrückung der durch LTB4 ausgelösten NF κ B-Aktivierung nachgewiesen werden (Arita et al., 2007).

Lipoxine und Resolvine lindern experimentelle Kolitis.

Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Lipoxinen und ihren ASS-getriggerten Formen sowie stabilen Analogen wurden in Kolitis-Tiermodellen *in vivo* und auch *in vitro* analysiert. In einem intestinalen Zellkulturmodell fand sich eine Suppression der

NF κ B-Aktivität durch ein stabiles Lipoxin A4 Analog (Gewirtz et al., 2002). Diese Erkenntnisse aus *in vitro* Experimenten wurden in Tierexperimenten bestätigt. Orale Einnahme von epi-16-para-fluoro-phenoxy-LXA4, einem oral aktiven Analog von LXA4, führte zur Linderung einer DSS-induzierten Kolitis in Mäusen und zur Herunterregulierung der pro-inflammatorischen Genexpression. Interessant an dieser Studie ist außerdem, dass die parenterale Anwendung des Lipoxinanalogs weniger effektiv war als die orale Anwendung (Gewirtz et al., 2002). Ähnliche Effekte wurden mit einem stabilen ATL (Aspirin-Triggered Lipoxin) -Analog (ZK-192) in dem haptenbasierten Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) Kolitis-Modell beschrieben (Fiorucci et al., 2004). Die anti-inflammatorische Wirksamkeit der Lipoxinanaloge war dabei genauso effektiv wie die Behandlung mit einem Steroid. Diese wirkungsvolle enterale Anwendung deutet auf die Möglichkeit eines lokalen Effektes auf den entzündeten Darm hin und könnte somit auch eine lokale Anwendung der Lipoxinanaloge bei der humanen Krankheit ermöglichen. Der erste Beweis für eine Rolle von Lipoxinen und eines Lipoxinmangels bei der menschlichen entzündlichen Darmkrankheit kommt aus einer Studie an Proben aus Kolektomiepräparaten von Patienten mit Colitis ulcerosa. Die Autoren zeigten eine verringerte Fähigkeit der Lipoxin-Synthesekapazität in der entzündeten Darmmucosa (Mangino et al., 2006). Diese Beobachtung ähnelt Erkenntnissen bei Asthmapatienten, die eine drastische Abnahme der Lipoxin-Synthesekapazität in den peripheren Blutleukozyten von den Patienten mit schwerem Asthma zeigten (Levy et al., 2005).

Auch für das aus der n-3 PUFA EPA gebildete Resolvin E1 (RvE1) fand sich ein protektiver Effekt in einem Kolitis-Modell. Behandlung mit Resolvin E1 erhöhte in einer Studie in Mäusen mit TNBS-Kolitis das Überleben, verringerte den Verlust des Körpergewichts und senkte die histologischen Zeichen der Entzündung. Auf der molekularen Ebene wurde eine Abnahme von IL-12, TNF-alpha und iNOS beobachtet (Arita et al., 2005a).

Kolitis, Hepatitis und Kolontumorigenese im fat-1 Mausmodell.

Die dargestellten Beobachtungen zur anti-inflammatorischen und NF κ B-hemmenden Aktivität des Resolvin E1 waren der Ausgangspunkt für unsere nachfolgend vorgestellten Studien in transgenen fat-1 Mäusen mit einem endogen erhöhten n-3 PUFA Gewebestatus.

Die in den hier vorgestellten Studien verwendeten transgenen fat-1 Mäuse exprimieren das *C. elegans* fat-1 Gen, das eine Fettsäure-Desaturase kodiert. Damit haben sie die Fähigkeit, n-3 PUFA aus n-6 PUFA zu synthetisieren. Dies führt zu einem niedrigen oder ausgeglichenen Verhältnis von n-6/n-3 Fettsäuren in ihren Geweben und Organen, ohne dass spezifische diätetischen Interventionen notwendig sind (Kang et al., 2004). Dieser Ansatz steht somit im Gegensatz zu Fütterungsstudien, die durch unterschiedliche Diäten der verschiedenen Versuchsgruppen zusätzliche variable Faktoren einführen. Der Gebrauch des transgenen fat-1 Modells beseitigt diese Variablen, da nur eine Diät benötigt wird, während die Modifikation des Verhältnisses der n-6 zu n-3 Fettsäuren (die Umwandlung von n-6 zu n-3) in den Geweben der Tiere endogen erfolgt.

In unserer ersten Studie konnten wir nachweisen, dass bereits der erhöhte Gehalt an n-3 PUFA im Darmgewebe zur signifikanten Bildung von anti-inflammatorischen Resolvinen und Protektin führen kann und damit zu einem Schutz vor Kolitis beiträgt (Hudert et al., 2006).

Zudem fand sich ein schützender Effekt durch die endogen erhöhten n-3 PUFA auch bei fat-1 Mäusen mit einer experimentellen akuten Hepatitis (Schmocker et al., 2007).

Da sich in unserer Kolitis-Studie ein hemmender Effekt des endogen erhöhten n-3 PUFA Spiegels auf die NF κ B-Aktivität fand – und NF κ B ein wichtiger Faktor in der Kolontumorigenese ist (Greten et al., 2004) – untersuchten wir dann die Bildung von Kolontumoren in der transgenen fat-1 Maus mit endogen hohen n-3 Fettsäurensiegeln: Auch hier fand sich ein schützender Effekt der endogen erhöhten n-3 PUFA (Nowak et al., 2007).

2.1.1 Transgene Mäuse mit hohen endogenen omega-3 Fettsäurespiegeln sind vor Kolitis geschützt

Hudert CA*, Weylandt KH*, Lu Y, et al. **Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:11276-81. * *First two authors contributed equally*

Neu entdeckte Resolvine sind hochaktive anti-inflammatorische Lipidmediatoren, die sich direkt aus n-3 PUFA ableiten. So hat das aus der n-3 PUFA Eicosapentaensäure (EPA) entstehende Resolvin RvE1 einen entzündungshemmenden Effekt im Kontext der experimentelle TNBS-Kolitis (Arita et al., 2005b). Die Rolle des n-3 PUFA Gewebestatus bei der Bildung dieser anti-inflammatorischen Mediatoren wurde jedoch bisher nicht untersucht. In der hier vorgelegten Studie untersuchten wir die durch Dextran Natriumsulfat (DSS) verursachte Kolitis als gut etabliertes experimentelles Modell entzündlicher Darmkrankheiten (IBD).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein erhöhter n-3 PUFA Gewebestatus in transgenen fat-1 Mäusen zur signifikanten Bildung anti-inflammatorischer Resolvine und zur effektiven Verringerung der Entzündung und Gewebsverletzung bei der DSS-Kolitis führen. Dabei kam es bemerkenswerterweise nicht zur Verringerung der aus n-6 PUFA gebildeten Lipidmediatoren wie LTB4 und PGE2. Parallel fand sich eine Suppression der NF κ B-Aktivität sowie eine geringere Expression von TNF- α und IL-1 β in den fat-1 Tieren. Außerdem fanden sich Zeichen einer verbesserten Mukoprotektion durch gesteigerte Expression von TFF3 und besser aufrechterhaltene Expression von Tollip und ZO-1. Diese Resultate etablieren die transgene fat-1 Maus als experimentelles Modell für die Untersuchung der aus n-3 PUFA gebildeten Lipidmediatoren. Sie betonen zudem den entzündungshemmenden Effekt eines erhöhten n-3 PUFA-Gehaltes in Geweben.

Verweis auf:

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 25;103(30):11276-81. Epub 2006 Jul 17.

Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis.

Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y, Wang J, Hong S, Dignass A, Serhan CN, Kang JX.

Omega-6 (n-6) and omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) are the precursors of potent lipid mediators and play an important role in regulation of inflammation. Generally, n-6 PUFA promote inflammation whereas n-3 PUFA have antiinflammatory properties, traditionally attributed to their ability to inhibit the formation of n-6 PUFA-derived proinflammatory eicosanoids. Newly discovered resolvins and protectins are potent antiinflammatory lipid mediators derived directly from n-3 PUFA with distinct pathways of action. However, the role of the n-3 PUFA tissue status in the formation of these antiinflammatory mediators has not been addressed. Here we show that an increased n-3 PUFA tissue status in transgenic mice that endogenously biosynthesize n-3 PUFA from n-6 PUFA leads to significant formation of antiinflammatory resolvins and effective reduction in inflammation and tissue injury in colitis. The endogenous increase in n-3 PUFA and related products did not decrease n-6 PUFA-derived lipid mediators such as leukotriene B4 and prostaglandin E2. The observed inflammation protection might result from decreased NF-kappaB activity and expression of TNFalpha, inducible NO synthase, and IL-1beta, with enhanced mucoprotection probably because of the higher expression of trefoil factor 3, Toll-interacting protein, and zonula occludens-1. These results thus establish the fat-1 transgenic mouse as a new experimental model for the study of n-3 PUFA-derived lipid mediators. They add insight into the molecular mechanisms of inflammation protection afforded by n-3 PUFA through formation of resolvins and protectins other than inhibition of n-6 PUFA-derived eicosanoid formation.

PMCID: PMC1544078

PMID: 16847262

2.1.2 Omega-3 Fettsäuren lindern die D-GalN/LPS-induzierte Hepatitis durch Suppression von Zytokinen

Schmöcker C*, Weylandt KH*, Kahlke L, et al. **Omega-3 fatty acids alleviate D-GalN/LPS induced acute hepatitis by suppression of cytokines.** *Hepatology* 2007; 45:864-9. * *First two authors contributed equally*

Akute Hepatitiden sind durch eine Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen mit einer erhöhten Produktion von Zytokinen gekennzeichnet, die zu Leberparenchymschäden und Leberfunktionsstörungen führen. Zytokine wie der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) sind wichtige Faktoren bei der Pathogenese von Leberentzündungen (Tilg and Diehl, 2000).

Durch omega-3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren (n-3 PUFA) kann die Aktivierung von NF κ B sowie die Bildung von TNF- α und interleukin-1 β in monozytären Zellen supprimiert werden (Babcock et al., 2002; Endres et al., 1999; Novak et al., 2003).

In der hier vorgestellten Studie induzierten wir die Makrophagen-abhängige akute d-Galactosamin/Lipopolysaccharid (d-GalN/LPS) Hepatitis (Freudenberg et al., 1986; Lehmann et al., 1987; Sass et al., 2002) in der transgenen fat-1 Maus. Unsere Daten zeigen geringer ausgeprägte entzündliche Leberschäden in fat-1 Mäusen, die für ein ausgeglichenes n-6/n-3 PUFA Verhältnis phänotypisiert waren. Diese verringerte entzündliche Aktivität ging mit verringerter hepatischer Genexpression von TNF- α , IL-1 β , IFN- γ und IL-6 in der fat-1 Maus einher. Zudem fand sich eine verringerten Apoptose im Lebergewebe und erniedrigte TNF- α Proteinspiegel im Plasma der fat-1 Mäuse.

Verweis auf:

Hepatology. 2007 Apr;45(4):864-9.

Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines.

Schmöcker C, Weylandt KH, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G, Berg T, Kang JX.

Cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) are key factors in liver inflammation. Supplementation with essential omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) has been demonstrated to lower TNF-alpha and IL-1 production in mononuclear cells. An inflammation-dampening effect has been observed with increased omega-3 fatty acid supplementation in several inflammatory diseases. In this study, we used the transgenic fat-1 mouse, expressing a *Caenorhabditis elegans* desaturase endogenously forming n-3 PUFA from n-6 PUFA, to analyze the effect of an increased n-3 PUFA tissue status in the macrophage-dependent acute D-galactosamine/lipopolysaccharide (D-GalN/LPS) hepatitis model. We show less severe inflammatory liver injury in fat-1 mice with a balanced n-6/n-3 PUFA ratio as evidenced by reduced serum alanine aminotransferase levels and less severe histological liver damage. This decreased inflammatory response was associated with decreased plasma TNF-alpha levels and with reduced hepatic gene expression of TNF-alpha, IL-1beta, IFN-gamma and IL-6 in fat-1 mice, leading to a decreased rate of apoptosis in livers from fat-1 animals, as measured by DAPI-staining. CONCLUSION: The results of this study offer evidence for an inflammation dampening effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the context of liver inflammation.

PMID: 17393517

2.1.3 Die Kolitis-assoziierte Kolontumorigenese wird in transgenen Mäusen mit hohen omega-3 Fettsäurespiegeln supprimiert.

Nowak J*, Weylandt KH*, Habel P, et al. **Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids.**

Carcinogenesis, 2007; 28:1991-5. * *First two authors contributed equally*

Das kolorektale Karzinom (CRC) gehört mit einem Lebenszeitrisiko von etwa 6% zu den häufigsten Malignomen der westlichen Welt. 2002 erkrankten etwa eine Millionen Menschen am CRC mit 500.000 Todesfällen durch das CRC (Saunders and Iveson, 2006). Diese Zahlen verdeutlichen die herausragende medizinische Bedeutung des kolorektalen Karzinoms. Anti-inflammatorische COX-Hemmer können der Entstehung des kolorektalen Karzinoms vorbeugen (Arber et al., 2006; Baron et al., 2003; Bertagnolli et al., 2006; Janne and Mayer, 2000). Außerdem zeigte sich in einer IKK- β Knock-out Maus mit verringerter Aktivität des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B eine deutlich verringerte Kolontumorigenese durch Azoxymethan (AOM) und Dextran Natriumsulfat (DSS) (Greten et al., 2004). Diese Daten deuten auf eine wichtige Rolle von NF κ B-Aktivität und Entzündungsaktivität im Dickdarm für die Tumorigenese hin.

Hier zeigen wir, dass ein endogen erhöhter Gehalt an n-3 PUFA in dem transgenen fat-1 Mausmodell die Inzidenz und das Wachstum von Kolontumoren senkt, die durch die Kombination eines entzündlichen Stimulus (DSS) mit einem Karzinogen (AOM) induziert werden. Dieser Effekt wurde begleitet von einer niedrigeren NF κ B-Aktivität, sowie von einer erhöhten Expression des Transforming Growth Factor beta (TGF- β) im Kolongewebe und einer erniedrigten Expression der induzierbaren Stickstoffoxid Synthase (iNOS) in den Tumoren der fat-1 Tiere.

Unsere Daten liefern somit neue Einblicke in die Mechanismen, durch die n-3 PUFA die Kolontumorigenese unterdrücken können. Diese ersten Resultate unterstützen die Hypothese, dass die Supplementierung mit n-3 PUFA eine Rolle bei der Prävention des kolorektalen Karzinoms spielen könnte.

Verweis auf:

Carcinogenesis. 2007 Sep;28(9):1991-5. Epub 2007 Jul 18.

Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids.

Nowak J, Weylandt KH, Habbel P, Wang J, Dignass A, Glickman JN, Kang JX.

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer deaths in USA. Anti-inflammatory drugs were shown to be effective in the prevention of CRC, supporting a link between inflammation and tumorigenesis in the colon. However, due to their side effects, long-term administration of these drugs for CRC prevention is not feasible. An increased tissue content of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) can dampen colon inflammation in animals as well as in humans. Whether increasing colon tissue n-3 PUFA alone is effective in preventing colon tumorigenesis remains to be investigated. Here we show that endogenously increased tissue levels of n-3 PUFA in the fat-1 transgenic mouse model lower incidence and growth rate of colon tumors induced by inflammation (dextrane sodium sulfate) plus treatment with carcinogen (azoxymethane). This was accompanied by lower activity of nuclear factor kappa B (NF-kappaB), higher expression of transforming growth factor beta in the colons and lower expression of inducible nitric oxide synthase in the tumors of fat-1 animals. Our data provide new insight into the mechanism by which n-3 PUFA suppresses tumorigenesis through dampening of inflammation and NF-kappaB activity. These results support a protective role of n-3 PUFA supplementation in the prevention of CRC.

PMID: 17634405

2.2 CIC-3 und azidische intrazelluläre Kompartimente bei der Chemotherapieresistenz

Mechanismen der Chemotherapieresistenz

Chemotherapie-Schemata sind zurzeit die Mittel der Wahl zur Behandlung disseminierter Tumorerkrankungen. Während das initiale Ansprechen auf die Behandlung oft gut ist, entstehen bei den meisten Tumorerkrankungen im Verlauf Chemotherapie-Resistenzen, die zum Behandlungsversagen und zum Tod führen.

Auf zellulärer Ebene sind verschiedene Mechanismen für die Entwicklung von Chemotherapie-Resistenz verantwortlich. Zum einen kann es zu einer spezifischen Veränderung der Zielproteine der zytotoxischen Substanz kommen. Bei vielen Tumorerkrankungen ist es aber die Steigerung der Expression von ATP-bindenden Kassetten (ATP-binding cassette, ABC) Transportern, die durch einen Medikamenten-Efflux aus den Krebszellen zur Resistenzentwicklung führt (Szakacs et al., 2006). Proteine aus dieser Familie sind auch bei der Sequestrierung von Chemotherapeutika in intrazellulären Membrankompartimenten beteiligt. Auch die Sequestrierung führt zu einer abnehmenden effektiven Medikamentenkonzentration in der Zelle und dadurch zur Entwicklung von Resistenz (Rajagopal and Simon, 2003).

Der pH-Wert in den verschiedenen Kompartimenten des endozytotischen wie des exozytotischen Vesikelweges ist eng geregelt: Dieser gegenüber dem Zytoplasma azidische pH ist Voraussetzung für die korrekte Funktion der intrazellulären Kompartimente (Demaurex, 2002). Mehrere Studien (Altan et al., 1998; Altan et al., 1999; Schindler et al., 1996) haben azidische Kompartimente als Orte der Sequestration von Chemotherapeutika und daraus resultierender Chemotherapieresistenz beschrieben. Durch Störung der Vesikelazidifizierung kann die Sequestration der Chemotherapeutika in die intrazellulären Membrankompartimente verhindert werden (Millot et al., 1997; Schindler et al., 1996). Eine Alkalisierung der azidischen Vesikel durch die Protonenpumpenhemmer Bafilomycin und Concanamycin A konnte in resistenten Mammakarzinom-Zellen den Sequestrationseffekt verhindern (Altan et al., 1998). Ein ähnlicher Effekt wird für Tamoxifen beschrieben (Altan et al., 1999). Auch der gastrische

Protonenpumpenhemmer Omeprazol konnte - wie Bafilomycin A als Hemmer der vakuolären Protonpumpe ($v\text{-H}^+\text{-ATPase}$) - die Zytotoxizität der chemotherapeutischen Medikamente Doxorubicin und Mitoxantron erhöhen (Lee and Tannock, 2006). In vivo Studien an menschlichen Melanom-Xenotransplantaten in immundefizienten Mäusen konnten zeigen, dass die gastralen Protonpumpenhemmer die Sensitivität gegenüber Cisplatin erhöhen (Luciani et al., 2004). Eine weitere Studie mit einem neuen Hemmer der $v\text{-H}^+\text{-ATPase}$ fand eine erhöhte Wirksamkeit einer Topotecan-Chemotherapie bei Kombination beider Substanzen und stützt somit die Hypothese einer Rolle für intrazelluläre säurehaltige Kompartimente bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Chemotherapieresistenz (Petrangolini et al., 2006). Eine Hemmung der vesikulären Protonpumpe könnte somit ein neuer Ansatz zur Erhöhung der Wirksamkeit von Chemotherapien sein.

Intrazelluläre CIC-Proteine

Die oben vorgestellten Studien konzentrierten sich auf die Rolle intrazellulärer Protonpumpen und -transporter für die Chemotherapieresistenz. Gleichzeitig ist aber auch die Präsenz eines Anionen-Shunts in den Membranen der intrazellulären azidischen Kompartimente notwendig. Nur so ist der Ausgleich des elektrogenen Potentials durch den gerichteten Transport von Protonen in die Vesikel, wie ihn die $v\text{-H}^+\text{-ATPasen}$ katalysieren, möglich. Chloridkanäle/Transporter der CIC Familie könnten diesen Anionenshunt ermöglichen (Jentsch et al., 2005). Aus diesem Konzept ergibt sich unsere Hypothese einer Rolle von intrazellulären CIC-Kanälen/Transportern bei der Chemotherapieresistenz durch Sequestrierung in azidischen Kompartimenten.

CIC-3 ist ein Mitglied der CIC Chloridkanal/Transporter-Familie und wird überwiegend in Zellen des Nervensystems exprimiert und lokalisiert in säurehaltige intrazelluläre Kompartimente (Stobrawa et al., 2001; Weylandt et al., 2001). CIC-3 wurde in mehreren Studien als Chlorid-Shunt für die $v\text{-H}^+\text{-ATPasen}$ postuliert, und scheint die Azidifizierung von Endosomen und synaptischen Vesikeln sowie Lysosomen zu unterstützen (Li et al., 2002; Stobrawa et al., 2001). Diese Hypothese wurde in Experimenten bestätigt, die eine direkte Rolle für CIC-3 bei der endosomalen Azidifizierung zeigen konnten (Hara-Chikuma et al., 2005b).

Die intrazelluläre Rolle für CIC-3 passt gut zu den Daten für das homologe Protein CIC-5 und auch die anderen von der Sequenz her eng verwandten CIC-Proteine CIC-4, CIC-6 und CIC-7. Alle diese Proteine sind vornehmlich in intrazellulären Organellen lokalisiert und spielen eine Rolle bei der Chlorid-Homöostase dieser Kompartimente (Jentsch, 2007). Für CIC-5 ist die Rolle in intrazellulären Vesikeln bereits gut etabliert. In CIC-5 ^{-/-} Mäusen konnte in renalen Zellen ein Defekt der Endozytose charakterisiert werden (Piwon et al., 2000). Auch für CIC-7 ist die Funktion in intrazellulären Kompartimenten gut belegt. Im CIC-7 ^{-/-} Mausmodell findet sich eine Osteopetrose (Kornak et al., 2001).

Da CIC-3 in Phäochromozytomzellen exprimiert wird (Salazar et al., 2004), erschien eine Expression von CIC-3 auch in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzellen als wahrscheinlich.

Neuroendokrine Tumoren.

Neuroendokrine Zellen bilden in der Lunge und dem Gastrointestinaltrakt ein Netzwerk verteilter Zellen. Die von ihnen freigesetzten Transmitter wirken dabei endokrin oder parakrin und spielen bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine wichtige Rolle.

Neuroendokrine Tumoren und Karzinome verfügen - bedingt durch ihre sekretorische Aktivität - über ein ausgeprägtes funktionell relevantes System intrazellulärer Membrankompartimente. Historisch gesehen wurde zunächst eine ontogenetische Abstammung der während der Embryonalentwicklung diffus in die verschiedenen Gewebe versprengten neuroendokrinen Zellen vom Neuroektoderm postuliert. Moderne Techniken der Embryologie haben inzwischen allerdings einen endodermalen Ursprung gerade der APUD-Zellen (amine precursor uptake and decarboxylation cells) des GI-Traktes gezeigt (Langley, 1994). Neuroendokrine Zellen werden heute somit anhand gemeinsamer Sekretionsprodukte und zytoplasmatischer Markerproteine definiert, die ontogenetische Klassifikation wurde verlassen. Wichtige morphologische Merkmale dieser Zellen sind azidische Vesikel sowohl des sekretorischen Vesikelpfades als auch des endosomal-lysosomalen Pfades.

Obwohl oft niedrigmaligne, sind neuroendokrine Karzinome zumeist nicht heilbar, da sie häufig bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung metastasiert sind und effektive antiproliferative Ansätze in dieser Situation fehlen (Kulke and Mayer, 1999; Moertel, 1987). Die hochmalignen niedrig differenzierten neuroendokrinen Tumoren sind klinisch meist hochaggressive Tumoren und gerade in Form des kleinzelligen Bronchialkarzinomes (small cell lung cancer, SCLC) ein großes klinisches Problem (Inzidenz bei 15/100000/Jahr).

Das Chemotherapeutikum Etoposid ist, in Verbindung mit einer platinhaltigen Substanz, Standard der Chemotherapiebehandlung von undifferenzierten, hochmalignen neuroendokrinen Tumoren (Fjallskog et al., 2001; Kulke and Mayer, 1999; Moertel, 1987; O'Toole et al., 2004) und des kleinzelligen Lungenkarzinoms (Jain et al., 1996). Bei Diagnosestellung sind diese Tumoren meist bereits disseminiert, so dass die systemische Chemotherapie als einzige sinnvolle Therapieoption verbleibt. Während initial unter der Chemotherapiebehandlung oft ein gutes Ansprechen und bedeutende Tumorgrößenreduktionen erreicht werden, entwickeln die meisten diesen Tumoren rasch Resistenzen gegen die eingesetzten Chemotherapeutika. Wie auch andere Chemotherapeutika hat Etoposid einen basischen pKa von 9.8 und ist somit prädisponiert für die Sequestrierung in intrazellulären azidischen Kompartimenten.

CIC-3 Expression und Etoposid-Resistenz in neuroendokrinen Tumorzelllinien

Nachdem unsere ersten Experimente die vorwiegende intrazelluläre Lokalisation von CIC-3 bestätigen konnten und kein Zusammenhang mit schwellungsaktivierten Strömen feststellbar war (Weylandt et al., 2001), richteten wir unser Interesse auf die Funktion von CIC-3 bei der intrakompartimentalen Azidifizierung.

In Analogie zu neuronalen Zellen und der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 postulierten wir eine Expression von CIC-3 auch in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzelllinien.

Wir prüften in unseren Experimenten dann die Hypothese, dass die Expression von CIC-3 in einer neuroendokrinen Tumorzelllinie die Azidität der intrazellulären

Kompartimente und dadurch die Etoposid-Resistenz der Zellen erhöhen kann. In der Tat zeigten unsere Versuche in einer neuroendokrinen Tumorzelllinie einen Zusammenhang zwischen CIC-3 Expression, Zunahme der intrakompartimentalen Azidität und Etoposid-Resistenz (Weylandt et al., 2007).

2.2.1 Das humane CLC-3-Protein ist nicht der schwellungsaktivierte Chloridkanal, der bei der Regulation des Zellvolumens beteiligt ist.

Weylandt KH, Valverde MA, Nobles M, et al. Human CIC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. J Biol Chem 2001; 276:17461-7.

CIC-3 ist ein Mitglied der größten bekannten Chloridkanalfamilie. Andere Proteine dieser Familie spielen wichtige Rollen in der Muskel- oder Nierenphysiologie. Duan et al. haben CIC-3 als Grundlage des ubiquitär vorhandenen durch Zellschwellung aktivierten Chloridstroms postuliert (Duan et al., 1997). Dieser Strom wurde in der Vergangenheit auch mit dem Multidrug-Resistenzprotein P-Glycoprotein (P-gp) assoziiert (Sardini et al., 2003).

In unserer ersten Studie zu diesem Thema exprimierten wir das humane CIC-3-Protein, um die Frage zu beantworten, ob CIC-3 für den schwellungsaktivierten Chloridstrom verantwortlich ist. Unsere Daten zeigen, dass CIC-3 keine Rolle bei der Volumenregulation spielt und dass die beiden für CIC-3 beschriebenen Proteinvarianten vordringlich intrazellulär exprimiert werden. Proteinblot-Untersuchungen zeigten des Weiteren ein hohes Expressionsniveau von CIC-3 im Zentralen Nervensystem und in der Niere.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, die eine Expression von CIC-3 in endosomalen, lysosomalen und sekretorischen Vesikelkompartimenten nachweisen konnten (Stobrawa et al., 2001). Die spätere Studie einer weiteren Arbeitsgruppe zur pH-Messung intrazellulärer Vesikel konnte dann die Rolle von CIC-3 bei der Azidifizierung intrazellulärer endosomaler Vesikel direkt belegen (Hara-Chikuma et al., 2005b).

Verweis auf:

J Biol Chem. 2001 May 18;276(20):17461-7. Epub 2001 Feb 22.

Human ClC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation.

Weylandt KH, Valverde MA, Nobles M, Raguz S, Amey JS, Diaz M, Nastrucci C, Higgins CF, Sardini A.

Volume regulation is essential for normal cell function. A key component of the cells' response to volume changes is the activation of a channel, which elicits characteristic chloride currents (I(Cl, Swell)). The molecular identity of this channel has been controversial. Most recently, ClC-3, a protein highly homologous to the ClC-4 and ClC-5 channel proteins, has been proposed as being responsible for I(Cl, Swell). Subsequently, however, other reports have suggested that ClC-3 may generate chloride currents with characteristics clearly distinct from I(Cl, Swell). Significantly different tissue distributions for ClC-3 have also been reported, and it has been suggested that two isoforms of ClC-3 may be expressed with differing functions. In this study we generated a series of cell lines expressing variants of ClC-3 to rigorously address the question of whether or not ClC-3 is responsible for I(Cl, Swell). The data demonstrate that ClC-3 is not responsible for I(Cl, Swell) and has no role in regulatory volume decrease, furthermore, ClC-3 is not activated by intracellular calcium and fails to elicit chloride currents under any conditions tested. Expression of ClC-3 was shown to be relatively tissue-specific, with high levels in the central nervous system and kidney, and in contrast to previous reports, is essentially absent from heart. This distribution is also inconsistent with the previous proposed role in cell volume regulation.

PMID: 11278960

2.2.2 CIC-3 Expression erhöht die Etoposid-Resistenz durch eine gesteigerte Azidifizierung des späten endozytotischen Kompartimentes.

Weylandt KH*, Nebrig M*, Jansen-Rosseck N, et al. **CIC-3 expression enhances etoposide resistance by increasing acidification of the late endocytic compartment.** *Mol Cancer Ther* 2007; 6:979-86. * *First two authors contributed equally*

Vordaten haben gezeigt, dass CIC-3, ein Mitglied der CIC Chloridkanal und Transporter-Familie, vorwiegend in intrazellulären Kompartimenten exprimiert wird. CIC-3 findet sich besonders in neuronalen Geweben und Zellen (Stobrawa et al., 2001; Weylandt et al., 2001) und ist bei der Azidifizierung dieser Kompartimente beteiligt (Hara-Chikuma et al., 2005b). Die Azidifizierung der intrazellulären Organellen könnte eine Chemotherapieresistenz fördern, indem die intrazellulären Organellen zu Orten der Chemotherapie-Sequestrierung werden. Wir postulierten eine Rolle für CIC-3 bei der Chemotherapieresistenz und eine Expression von CIC-3 nicht nur in neuronalen Zellen, sondern auch in sekretorisch aktiven neuroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes.

Die hier vorgestellte Studie zeigt, dass CIC-3 in den gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzelllinien BON, LCC-18 und QGP-1 exprimiert wird. Das überexprimierte Protein lokalisiert in intrazellulären Kompartimenten der BON-Zellen, die mit dem späten endosomal/lysosomalen Marker LAMP-1 angefärbt werden können. Die Überexpression von CIC-3 erhöht die Azidität der intrazellulären Vesikel und die Resistenz der Zellen gegen das Chemotherapeutikum Etoposid. Die Hemmung der intravesikulären Azidifizierung durch Hemmung der vakuolären H⁺-ATPase erhöht dagegen die Etoposid-Sensitivität. Diese Studie liefert somit die ersten Hinweise für die Rolle eines intrazellulären CIC Proteins bei der Modulation von Chemotherapieresistenz.

Verweis auf:

Mol Cancer Ther. 2007 Mar;6(3):979-86.

CIC-3 expression enhances etoposide resistance by increasing acidification of the late endocytic compartment.

Weylandt KH, Nebrig M, Jansen-Rosseck N, Amey JS, Carmena D, Wiedenmann B, Higgins CF, Sardini A.

Resistance to anticancer drugs and consequent failure of chemotherapy is a complex problem severely limiting therapeutic options in metastatic cancer. Many studies have shown a role for drug efflux pumps of the ATP-binding cassette transporters family in the development of drug resistance. CIC-3, a member of the CLC family of chloride channels and transporters, is expressed in intracellular compartments of neuronal cells and involved in vesicular acidification. It has previously been suggested that acidification of intracellular organelles can promote drug resistance by increasing drug sequestration. Therefore, we hypothesized a role for CIC-3 in drug resistance. Here, we show that CIC-3 is expressed in neuroendocrine tumor cell lines, such as BON, LCC-18, and QGP-1, and localized in intracellular vesicles co-labeled with the late endosomal/lysosomal marker LAMP-1. CIC-3 overexpression increased the acidity of intracellular vesicles, as assessed by acridine orange staining, and enhanced resistance to the chemotherapeutic drug etoposide by almost doubling the IC(50) in either BON or HEK293 cell lines. Prevention of organellar acidification, by inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase, reduced etoposide resistance. No expression of common multidrug resistance transporters, such as P-glycoprotein or multidrug-related protein-1, was detected in either the BON parental cell line or the derivative clone overexpressing CIC-3. The probable mechanism of enhanced etoposide resistance can be attributed to the increase of vesicular acidification as consequence of CIC-3 overexpression. This study therefore provides first evidence for a role of intracellular CLC proteins in the modulation of cancer drug resistance.

Erratum in Mol Cancer Ther. 2008 Jul;7(7):2261.

PMID: 17363491

3. Diskussion

Omega-3 Fettsäuren und Resolvine bei Inflammation und Tumorigenese

Die Supplementierung mit essentiellen n-3 PUFA hat sich in verschiedenen Studien als entzündungshemmend gezeigt. Auch bei verschiedenen Tumorerkrankungen wird ein schützender Effekt für n-3 PUFA postuliert. Allerdings sind die Feststellungen dieser diätmodifizierenden Studien im Tiermodell und auch im Menschen teilweise heterogen. Insbesondere im Kontext der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde in manchen humanen Studien ein schützender Effekt von n-3 PUFA beobachtet (Belluzzi et al., 1996; Stenson et al., 1992), der sich in anderen Versuchskonstellationen nicht wiederholen ließ (Endres et al., 1999). Der supprimierende Effekt dieser Fettsäuren auf die Kolonkarzinogenese und das Tumorwachstum hat sich bisher im Tiermodell – und mehr noch in vitro bei der Untersuchung von Kolonkarzinomzelllinien – darstellen lassen, auch hier sind die Daten aus den Beobachtungen in humanen Populationen nicht eindeutig (Chapkin et al., 2007a). Bei anderen gastroenterologischen Erkrankungen ist das Bild noch unvollständiger: Eine vorhergehende Studie in einem Hepatitismodell zeigte einen nachteiligen Effekt der Supplementierung mit der 18-carbon n-3 PUFA alpha-Linolensäure (Watanabe and Okuyama, 1991). In verschiedenen tierexperimentellen Pankreatitis-Studien zeigte sich dagegen ein protektiver Effekt der n-3 PUFA (Alhan et al., 2006; Foitzik et al., 2002).

Die hier vorgestellten Studien verwenden in diesem Kontext erstmalig das transgene fat-1 Mausmodell, in dem die langkettigen n-3 PUFA endogen durch Desaturierung von n-6 PUFA gebildet werden und somit diätetische Interventionen nicht notwendig sind. Diese Modell wurde vor einigen Jahren von Jing X. Kang am Massachusetts General Hospital etabliert (Kang et al., 2004) und steht uns für die Untersuchung gastroenterologischer Krankheitsmodelle und Fragestellungen zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist die gleich bleibende Präsenz von hohen Spiegeln langkettiger n-3 PUFA in den verschiedenen Körpergeweben mit einem fast ausgeglichenen n-6/n-3 PUFA Verhältnis.

Unsere Studie der D-GalN/LPS-induzierten Hepatitis in transgenen fat-1 Mäusen konnte zeigen, dass die induzierte akute Hepatitis in Mäusen mit ausgeglichenem

AA/EPA-Verhältnis deutlich milder verläuft als in Wildtyp-Mäusen. Gerade in Hinblick auf die Vorstudie von Watanabe et al (Watanabe and Okuyama, 1991) könnte es hier von Bedeutung sein, dass auch ausreichende Arachidonsäuremengen in den Lebern der Tiere vorhanden sind. In den hier untersuchten Tieren fanden sich nur geringe und nicht signifikante Unterschiede des Lebergewebe-Gehaltes an Arachidonsäure (AA, 20:4 n-6) zwischen transgenen fat-1 und Wildtyp Mäusen. Ob sich der beobachtete Effekt für höhere oder niedrigere n-6/n-3 PUFA Verhältnisse oder einen niedrigeren Arachidonsäuregehalt im Lebergewebe ändert, ist eine Fragestellung für zukünftige Studien. Eine weitere in der Zukunft zu untersuchende Fragestellung ist zudem die Messung der in der Leber gebildeten Lipidmediatoren und die Rolle von Lipidmediator-Gleichgewichten in der Leber.

Eine direkte Analyse der Lipidmediator-Zusammensetzung im Zielgewebe führten wir zunächst nur in den Kolongeweben aus fat-1 Mäusen mit akuter DSS-Kolitis durch. Die Resultate dieser Studie etablieren erstmalig die Bildung verschiedener aus n-3 PUFA abgeleiteter Lipidmediatoren im Kontext einer akuten Kolitis. Zudem legen diese Daten einen Zusammenhang des deutlichen anti-inflammatorischen Effektes der erhöhten n-3 PUFA Gewebespiegel mit der Bildung von Resolvinen und Protektin nahe.

Die bisher am weitesten verbreitete Ansicht zur Wirkung der n-3 PUFA nimmt eine Verdrängung der n-6 PUFA Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden und nachfolgend somit eine kompetitive Hemmung der Bildung von pro-inflammatorischen Eicosanoiden der Arachidonsäure (wie beispielsweise LTB₄ und PGE₂) durch die n-3 PUFA an (James et al., 2000). In vitro Studien haben zudem einen inhibitorischen Effekt insbesondere der Docosahexaensäure (DHA) auf die COX-2 gezeigt. Allerdings fanden wir in allen hier vorgestellten Studien nur geringe und nicht signifikante Unterschiede des Gewebegehaltes an Arachidonsäure (AA, 20:4 n-6) zwischen den verwendeten transgenen fat-1 und wildtyp Mäusen. Dies spricht gegen eine Verdrängung der Arachidonsäure zugunsten von n-3 PUFA in den fat-1 Mäusen.

Auch die Analyse der aus der Arachidonsäure gebildeten Lipidmediatoren ergab ähnliche Resultate. Im Darmgewebe der Mäuse mit akuter DSS-Kolitis fanden sich

keine signifikanten Unterschiede von LTB₄ und PGE₂ zwischen den fat-1 transgenen und den wildtyp-Mäusen. Diese Beobachtung ist ein noch stärkeres Argument gegen die Hypothese der Verdrängung der Arachidonsäure und auch gegen einen Effekt der n-3 PUFA durch generelle Hemmung des COX-Metabolismus. Auch 15-HETE - als Zwischenprodukt bei der Synthese der anti-inflammatorischen aus Arachidonsäure gebildeten Lipoxine - unterschied sich zwischen dem Darmgewebe der fat-1 Mäuse und der wildtyp Mäuse nicht signifikant. Somit scheint auch dieser Lipidmediator in unserem Modell keine wichtige protektive Rolle zu spielen.

Ganz anders stellte sich die Situation für die aus den n-3 PUFA Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 n-3 PUFA) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6 n-3 PUFA) gebildeten Lipidmediatoren dar:

Zum einen fanden sich die dem PGE₂ und dem LTB₄ entsprechenden Metabolite der EPA, das Prostaglandin E₃ (PGE₃) und das Leukotrien B₅ (LTB₅) nur in den fat-1 Mäusen in signifikanten Mengen. Somit könnten bereits diese Substanzen an einer Hemmung der Entzündung beteiligt sein.

Zum anderen zeigen diese Daten die Bildung von Lipoxin-ähnlichen Lipidmediatoren aus den n-3 PUFA im Kolongewebe der fat-1 Mäuse. Diese Substanzen lassen sich in den wildtyp-Mäusen nicht nachweisen. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Resolvine (Resolvin E₁ aus EPA und Resolvin D₃ sowie das Protektin D₁ aus DHA), die erst kürzlich beschrieben wurden und mit einer starken anti-inflammatorischen Aktivität assoziiert sind (Schwab et al., 2007).

Ähnlich wie die Aspirin-getriggerten Lipoxine der Arachidonsäure wurden auch die Resolvine der n-3 PUFA zunächst in Koinkubationsexperimenten mit Aspirin charakterisiert (Serhan et al., 2000; Serhan et al., 2002). Ein weiterer Syntheseweg wurde über mikrobielle P450 Oxidasen beschrieben (Arita et al., 2005b). Während diese Beobachtungen die biologische Relevanz dieser Substanzen unter physiologischen Bedingungen in Säugern in Frage stellen könnten, liefern unsere Daten einen wichtigen Beweis der Bedeutung auch in einem Umfeld ohne die Präsenz pharmakologischer Substanzen: Auch ohne eine begleitende Aspirin-Behandlung fanden sich in den Darmgeweben der fat-1 Mäuse mit DSS-Kolitis relevante Mengen der biologisch wirksamen Resolvine und dem Protektin D₁ (RvE₁, RvD₃ und PD₁/NPD₁).

Die aus den n-3 PUFA EPA und DHA synthetisierten Resolvine und Protektin D1 sind starke anti-inflammatorische Mediatoren (Arita et al., 2005c; Hasturk et al., 2006; Serhan et al., 2004; Serhan et al., 2006). Dies wurde zuletzt in einer aktuellen Studie in einem Peritonitis-Modell gezeigt (Schwab et al., 2007). Diese Substanzen können bereits in sehr niedrigen Konzentrationen entzündliche Zytokine wie TNF- α und IL-6 supprimieren (Ariel et al., 2005; Bannenberg et al., 2005). Der diesem Effekt zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist insbesondere für das Resolvin E1 gut erforscht. Resolvin E1 ist der erste aus n-3 PUFA abgeleitete Lipidmediator, für den ein spezifischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor charakterisiert werden konnte: Das ChemR23 genannte G-Protein kann Resolvin E1 binden und führt dann zu einer Hemmung der NF κ B Aktivierung (Arita et al., 2005c). Zusätzlich bindet Resolvin E1 zudem an den Leukotrien B4-Rezeptor BLT1 und kann auf diesem Wege auch die LTB4-vermittelte NF κ B-Aktivierung hemmen (Arita et al., 2007).

Die Resultate zur molekularen Wirkung von Resolvin E1 schaffen eine wichtige Verbindung zu den Beobachtungen von uns (Hudert et al., 2006; Schmocker et al., 2007) und anderen (Bhattacharya et al., 2006) in der fat-1 Maus. Wir fanden bereits in nicht mit DSS behandelten fat-1 Mäusen eine geringere NF κ B-Aktivität als in den wildtyp-Mäusen. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass der erhöhte Gewebespiegel an n-3 PUFA durch die Bildung von Resolvin E1 zu einer Hemmung der NF κ B-Aktivierung im Kolon und damit zu einer Suppression der entzündlichen Aktivität führen kann.

Im Kolon scheint es eine enge Verbindung zwischen Tumorigenese und der NF κ B Aktivität zu geben (Greten et al., 2004). So führte die selektive Suppression der NF κ B-Aktivität durch knock-out von IKK β in intestinalen Epithelzellen zu einer Steigerung der Apoptose geschädigter Zellen in der frühen Phase des murinen AOM/DSS Kolonkarzinogenese-Modells. Als Spätfolge dieses Effektes war dann eine verringerte Tumorzinzidenz in den Därmen der Tiere zu beobachten. Die ebenfalls in der obigen Studie durchgeführte selektive Deletion von IKK β in myeloiden Zellen senkte dagegen das Tumorzwachstum durch eine Senkung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine in der Kolonmucosa.

Unsere Experimente mit dem AOM/DSS Kolonkarzinogenesemodell in der fat-1 Maus zeigten ebenfalls eine Senkung der Tumorinzidenz sowie eine Hemmung des Tumorwachstums in diesen Mäusen. Zusammen mit der beobachteten Hemmung der NF κ B-Aktivität in der fat-1 Maus und den obigen Ausführungen über die Wirkung von Resolvin E1 auf die NF κ B-Aktivität erscheint ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhtem Gewebegehalt an n-3 PUFA und erniedrigter Tumorigenese durch Bildung von Resolvinen plausibel. Die beobachtete Hemmung der Kolontumorigenese und der Tumorwachstumsrate durch den erhöhten n-3 PUFA Gewebestatus könnte sich somit aus dem hemmenden Effekt dieser Fettsäuren und ihrer Lipidmediatoren auf die NF κ B-Aktivität herleiten.

CIC-3 und Chemotherapieresistenz

Viele solide Tumoren haben ein azidisches extrazelluläres Klima, das sich vermutlich aus dem glykolytischen und anaeroben Metabolismus der Tumorzellen herleitet. Dieses führt auch zur intrazellulären Säurebildung und erhöhten Ausscheidung von Protonen aus dem Intrazellulärraum, um die zytoplasmatische Azidose zu verhindern (Vaupel et al., 1989).

Mehrere Studien haben eine Verbindung zwischen der endosomalen und lysosomalen Azidität und Chemotherapieresistenz hergestellt und vorgeschlagen, dass schwach basische Medikamente in azidischen intrazellulären Membrankompartimenten sequestriert werden können (Raghunand et al., 1999). Bisher haben sich jedoch alle diese Studien auf die Rolle der vesikulären Protonpumpe konzentriert und die Bedeutung vesikulärer Protonenpumpen für die Entstehung der Chemotherapieresistenz etablieren können. Die Modulation der pH-abhängigen Resistenzmechanismen durch Targeting der vakuolären H⁺-ATPase könnte ein neuer Ansatz zur Steigerung der therapeutischen Wirksamkeit von Antitumormitteln sein (Izumi et al., 2003; Luciani et al., 2004; McSheehy et al., 2003; Ouar et al., 2003; Petrangolini et al., 2006).

Verschiedene Proteine der CIC Chloridkanal/Transporter-Familie lokalisieren in intrazellulären Membrankompartimenten. Für CIC-5 wird eine Rolle bei der Azidifizierung intrazellulärer endozytotischer Kompartimente beschrieben (Gunther et al., 1998; Hara-Chikuma et al., 2005a; Kasper et al., 2005; Piwon et al., 2000). Auch

CIC-7 lokalisiert in intrazellulären Membrankompartimenten. CIC-7 knock-out Mäuse zeigten eine verringerte Knochenresorption und einen Osteopetrose-Phänotyp (Kornak et al., 2001). Dieser Phänotyp ähnelt somit dem Effekt von SB242784, einem potenten selektiven Hemmer der vesikulären Protonenpumpe in Osteoklasten, der die Knochenresorption in vitro (Nadler et al., 1998) und in vivo hemmt (Visentin et al., 2000).

Diese Beobachtungen stützen die Hypothese einer Rolle für intrazellulären Chloridkanäle/Transporter als alternative Ziele für die Modulation der intrazellulären und intrakompartimentalen pH-Regulation und Funktion und eröffnen die Möglichkeit einer Rolle für CIC-Proteine auch bei der Chemotherapieresistenz. Unsere Studien beschäftigten sich zunächst mit der bereits 1997 postulierten Rolle von CIC-3 als schwellungsaktivierten Chloridkanal (Duan et al., 1997). Diese Kanalaktivität war bereits zuvor für einige Zeit mit dem ABC-Transporter P-Glycoprotein, dem wichtigsten Chemotherapie-Resistenztransporter assoziiert worden (Sardini et al., 2003). Unsere Daten konnten diese Hypothese nicht bestätigen (Weylandt et al., 2001). Wir fanden eine Lokalisation des überexprimierten CIC-3-GFP Proteins im späten endozytischen Kompartiment. Dies steht im Einklang mit vorhergehenden Daten, die die Expression von CIC-3 in intrazellulären Membrankompartimenten zeigen konnten (Hara-Chikuma et al., 2005b; Li et al., 2002; Stobrawa et al., 2001). Einige dieser Studien konnten zudem eine Beteiligung von CIC-3 bei der Azidifizierung der intrazellulären Membrankompartimente zeigen und belegten damit für CIC-3 eine ähnliche Funktion, wie sie für CIC-5 und CIC-7 beschrieben wird.

CIC-3 wird besonders in Transmitter-sezernierenden Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert und könnte bei der Bildung synaptischer Vesikel beteiligt sein (Stobrawa et al., 2001). In Analogie zu diesen Beobachtungen fanden wir eine Expression des Proteins in sekretorisch aktiven neuroendokrinen Tumorzelllinien des Gastrointestinaltraktes.

Wir konnten in einer dieser Zelllinien eine Zunahme der Chemotherapieresistenz durch Überexpression von CIC-3-GFP zeigen. Die beobachtete Zunahme der Etoposid-Resistenz durch Überexpression von CIC-3 in der BON-Zelllinie begründet sich vermutlich durch die Sequestrierung des Medikamentes in einem säurehaltigen

Kompartiment, da die Hemmung der v-H⁺ATPase durch Concanamycin A die Resistenz verringert. Der beobachtete Effekt, eine ungefähre Verdopplung der IC₅₀ durch Überexpression von CIC-3, ist mit dem sensibilisierenden Effekt von Concanamycin A vergleichbar: Concanamycin A kann dabei die IC₅₀ auf die Hälfte verringern. Ein Effekt in einer ähnlichen Größenordnung konnte auch in einer resistenten Zelllinie aus proximalen Tubuluszellen für die Sensitivität gegenüber Daunomycin ermittelt werden (Ouar et al., 2003). Diese Beobachtungen unterstützen die biologische Relevanz unserer Resultate, die erstmalig eine Rolle für ein CIC Protein bei der Vermittlung von Chemotherapieresistenz zeigen.

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die hier vorgestellten Arbeiten nähern sich in experimentellen Ansätzen zwei Fragen der Tumormedizin an; zum einen geht es dabei um die Prävention der Tumorentstehung, zum anderen um die Frage der Chemotherapieresistenz bei der Behandlung maligner Erkrankungen.

Omega-3 Fettsäuren in Inflammation und Karzinogenese

Die hier vorgestellten Studien zeigen in dem transgenen fat-1 Mausmodell eine Milderung des hepatozellulären Schadens und der Leberentzündung und eine Suppression der entzündlichen Gewebsreaktion einer induzierten Kolitis durch den erhöhten Gehalt an n-3 PUFA im Gewebe. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Darmgewebe mit einem erhöhten n-3 PUFA Gehalt signifikante Mengen der anti-inflammatorischen aus n-3 Fettsäuren synthetisierten Lipidmediatoren (Resolvine und Protektin) bilden kann: Damit sind diese Daten die ersten, die einen direkten Zusammenhang zwischen Gewebespiegeln an n-3 PUFA und der Bildung von Resolvinen sowie Protektin demonstrieren konnten.

Zudem deuten die Beobachtungen der erniedrigten Kolontumorigenese und die auch in der akuten Kolitis beobachteten niedrigeren NF κ B-Aktivität in den fat-1 Mäusen darauf hin, dass eine Ergänzung der Ernährung mit n-3 PUFA ein Mittel der kolorektalen Karzinom-Prävention werden könnte. Damit würde sich hier eine Alternative zum Gebrauch der anti-inflammatorischen COX-Hemmer ergeben: Besonders die selektiven Cox-2 Hemmer sind im Langzeitgebrauch mit signifikanten kardiovaskulären Nebenwirkungen behaftet. Dagegen haben n-3 PUFA auch kardioprotektive Effekte (Wang et al., 2006); so dass eine Nahrungsergänzung mit n-3 PUFA als praktikabler Ansatz zur Prävention von Darmkrebs erscheint (Chapkin et al., 2007b).

CIC-3 und Etoposid-Resistenz

Chemotherapie-Resistenz wurde in der Vergangenheit meist durch ABC-Transporterproteine begründet. Erst in den letzten Jahren auch wurde auch die Rolle der intravesikulären Protonenpumpen in diesem Kontext aufgezeigt.

Unsere Studie identifiziert nun eine weitere Proteinfamilie als potentiellen Vermittler von Resistenzphänomenen. Die Daten unserer Studie etablieren eine Rolle für CIC-3, einem intrazellulären Chloridkanal/Transporter der CIC Proteinfamilie, bei der intrakompartimentalen Azidifizierung und daraus folgender erhöhter Chemotherapieresistenz. Dies konnten wir am Beispiel der Etoposid-Resistenz einer gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzelllinie zeigen.

Andere Proteine der CIC Familie könnten einen ähnlichen Effekt vermitteln. Weitere Studien sind nun notwendig, um diese Erkenntnisse auch hinsichtlich anderer Proteine der CIC Familie sowie in *in vivo* Modellen der Chemotherapieresistenz zu bewerten. Zudem sollte untersucht werden, ob intrazelluläre CIC Proteine ein (pharmakologisches) Ziel zur Modulation der Chemotherapiesensitivität von Tumoren sein könnten.

5. Verzeichnis der eingebundenen Literatur

Hudert CA*, **Weylandt KH***, Lu Y, et al. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:11276-81. * *First two authors contributed equally*

Schmöcker C*, **Weylandt KH***, Kahlke L, et al. Omega-3 fatty acids alleviate D-GalN/LPS induced acute hepatitis by suppression of cytokines. **Hepatology** 2007; 45:864-9. * *First two authors contributed equally*

Nowak J*, **Weylandt KH***, Habbel P, et al. Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous *n*-3 fatty acids. **Carcinogenesis** 2007; 28:1991-5. * *First two authors contributed equally*

Weylandt KH, Valverde MA, Nobles M, et al. Human ClC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. **J Biol Chem** 2001; 276:17461-7.

Weylandt KH*, Nebrig M*, Jansen-Rosseck N, et al. ClC-3 expression enhances etoposide resistance by increasing acidification of the late endocytic compartment. **Mol Cancer Ther** 2007; 6:979-86. * *First two authors contributed equally*

6. Literatur

- Alhan, E., Turkyilmaz, S., Ercin, C., Kaklikkaya, N. and Kural, B.V. (2006) Effects of omega-3 fatty acids on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Eur Surg Res*, **38**, 314-321.
- Altan, N., Chen, Y., Schindler, M. and Simon, S.M. (1998) Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *J Exp Med*, **187**, 1583-1598.
- Altan, N., Chen, Y., Schindler, M. and Simon, S.M. (1999) Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4432-4437.
- Arber, N., Eagle, C.J., Spicak, J., Racz, I., Dite, P., Hajer, J., Zavoral, M., Lechuga, M.J., Gerletti, P., Tang, J., Rosenstein, R.B., Macdonald, K., Bhadra, P., Fowler, R., Wittes, J., Zauber, A.G., Solomon, S.D. and Levin, B. (2006) Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med*, **355**, 885-895.
- Ariel, A., Li, P.L., Wang, W., Tang, W.X., Fredman, G., Hong, S., Gotlinger, K.H. and Serhan, C.N. (2005) The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering. *J Biol Chem*, **280**, 43079-43086.
- Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., Yang, R., Petasis, N.A. and Serhan, C.N. (2005a) Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med*, **201**, 713-722.
- Arita, M., Clish, C.B. and Serhan, C.N. (2005b) The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 149-157.
- Arita, M., Ohira, T., Sun, Y.P., Elangovan, S., Chiang, N. and Serhan, C.N. (2007) Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol*, **178**, 3912-3917.
- Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J.N., Petasis, N.A., Blumberg, R.S. and Serhan, C.N. (2005c) Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7671-7676.
- Babcock, T.A., Helton, W.S., Hong, D. and Espat, N.J. (2002) Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF-alpha production. *Surg Infect (Larchmt)*, **3**, 145-149.
- Bannenberg, G.L., Chiang, N., Ariel, A., Arita, M., Tjonahen, E., Gotlinger, K.H., Hong, S. and Serhan, C.N. (2005) Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol*, **174**, 4345-4355.
- Baron, J.A., Cole, B.F., Sandler, R.S., Haile, R.W., Ahnen, D., Bresalier, R., McKeown-Eyssen, G., Summers, R.W., Rothstein, R., Burke, C.A., Snover, D.C., Church, T.R., Allen, J.I., Beach, M., Beck, G.J., Bond, J.H., Byers, T., Greenberg, E.R., Mandel, J.S., Marcon, N., Mott, L.A., Pearson, L., Saibil, F. and van Stolk, R.U. (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med*, **348**, 891-899.

- Belluzzi, A., Brignola, C., Campieri, M., Pera, A., Boschi, S. and Miglioli, M. (1996) Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med*, **334**, 1557-1560.
- Bertagnolli, M.M., Eagle, C.J., Zauber, A.G., Redston, M., Solomon, S.D., Kim, K., Tang, J., Rosenstein, R.B., Wittes, J., Corle, D., Hess, T.M., Woloj, G.M., Boissierie, F., Anderson, W.F., Viner, J.L., Bagheri, D., Burn, J., Chung, D.C., Dewar, T., Foley, T.R., Hoffman, N., Macrae, F., Pruitt, R.E., Saltzman, J.R., Salzberg, B., Sylwestrowicz, T., Gordon, G.B. and Hawk, E.T. (2006) Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med*, **355**, 873-884.
- Bhattacharya, A., Chandrasekar, B., Rahman, M.M., Banu, J., Kang, J.X. and Fernandes, G. (2006) Inhibition of inflammatory response in transgenic fat-1 mice on a calorie-restricted diet. *Biochem Biophys Res Commun*, **349**, 925-930.
- Chapkin, R.S., Davidson, L.A., Ly, L., Weeks, B.R., Lupton, J.R. and McMurray, D.N. (2007a) Immunomodulatory Effects of (n-3) Fatty Acids: Putative Link to Inflammation and Colon Cancer. *J Nutr*, **137**, 200S-204S.
- Chapkin, R.S., McMurray, D.N. and Lupton, J.R. (2007b) Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Curr Opin Gastroenterol*, **23**, 48-54.
- Demaurex, N. (2002) pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci*, **17**, 1-5.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J.R. and Horowitz, B. (1997) Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature*, **390**, 417-421.
- Eaton, S.B. and Konner, M. (1985) Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N Engl J Med*, **312**, 283-289.
- Endres, S., Lorenz, R. and Loeschke, K. (1999) Lipid treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **2**, 117-120.
- Fiorucci, S., Wallace, J.L., Mencarelli, A., Distrutti, E., Rizzo, G., Farneti, S., Morelli, A., Tseng, J.L., Suramanyam, B., Guilford, W.J. and Parkinson, J.F. (2004) A beta-oxidation-resistant lipoxin A4 analog treats hapten-induced colitis by attenuating inflammation and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15736-15741.
- Fjallskog, M.L., Granberg, D.P., Welin, S.L., Eriksson, C., Oberg, K.E., Janson, E.T. and Eriksson, B.K. (2001) Treatment with cisplatin and etoposide in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer*, **92**, 1101-1107.
- Foitzik, T., Eibl, G., Schneider, P., Wenger, F.A., Jacobi, C.A. and Buhr, H.J. (2002) Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **26**, 351-356.
- Freudenberg, M.A., Keppler, D. and Galanos, C. (1986) Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. *Infect Immun*, **51**, 891-895.
- Gewirtz, A. (2005) Lipoxin analogs: novel anti-inflammatory mediators. *Curr Opin Investig Drugs*, **6**, 1112-1115.
- Gewirtz, A.T., Collier-Hyams, L.S., Young, A.N., Kucharzik, T., Guilford, W.J., Parkinson, J.F., Williams, I.R., Neish, A.S. and Madara, J.L. (2002) Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Immunol*, **168**, 5260-5267.

- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F. and Karin, M. (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, **118**, 285-296.
- Gunther, W., Luchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. and Jentsch, T.J. (1998) CIC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8075-8080.
- Hara-Chikuma, M., Wang, Y., Guggino, S.E., Guggino, W.B. and Verkman, A.S. (2005a) Impaired acidification in early endosomes of CIC-5 deficient proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 941-946.
- Hara-Chikuma, M., Yang, B., Sonawane, N.D., Sasaki, S., Uchida, S. and Verkman, A.S. (2005b) CIC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation. *J Biol Chem*, **280**, 1241-1247.
- Hasturk, H., Kantarci, A., Ohira, T., Arita, M., Ebrahimi, N., Chiang, N., Petasis, N.A., Levy, B.D., Serhan, C.N. and Van Dyke, T.E. (2006) RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *Faseb J*, **20**, 401-403.
- Hong, S., Gronert, K., Devchand, P.R., Moussignac, R.L. and Serhan, C.N. (2003) Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem*, **278**, 14677-14687.
- Hong, S., Lu, Y., Yang, R., Gotlinger, K.H., Petasis, N.A. and Serhan, C.N. (2007) Resolvin D1, protectin D1, and related docosahexaenoic acid-derived products: Analysis via electrospray/low energy tandem mass spectrometry based on spectra and fragmentation mechanisms. *J Am Soc Mass Spectrom*, **18**, 128-144.
- Hudert, C.A., Weylandt, K.H., Lu, Y., Wang, J., Hong, S., Dignass, A., Serhan, C.N. and Kang, J.X. (2006) Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11276-11281.
- Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Ise, T., Murakami, T., Yoshida, T., Nomoto, M. and Kohno, K. (2003) Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*, **29**, 541-549.
- Jain, N., Lam, Y.M., Pym, J. and Campling, B.G. (1996) Mechanisms of resistance of human small cell lung cancer lines selected in VP-16 and cisplatin. *Cancer*, **77**, 1797-1808.
- James, M.J., Gibson, R.A. and Cleland, L.G. (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*, **71**, 343S-348S.
- Janne, P.A. and Mayer, R.J. (2000) Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med*, **342**, 1960-1968.
- Jentsch, T.J. (2007) Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters. *J Physiol*, **578**, 633-640.
- Jentsch, T.J., Poet, M., Fuhrmann, J.C. and Zdebik, A.A. (2005) Physiological functions of CLC Cl⁻ channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu Rev Physiol*, **67**, 779-807.
- Kang, J.X., Wang, J., Wu, L. and Kang, Z.B. (2004) Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature*, **427**, 504.
- Kasper, D., Planells-Cases, R., Fuhrmann, J.C., Scheel, O., Zeitz, O., Ruether, K., Schmitt, A., Poet, M., Steinfeld, R., Schweizer, M., Kornak, U. and Jentsch, T.J. (2005) Loss of the chloride channel CIC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *Embo J*, **24**, 1079-1091.

- Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. and Jentsch, T.J. (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, **104**, 205-215.
- Kulke, M.H. and Mayer, R.J. (1999) Carcinoid tumors. *N Engl J Med*, **340**, 858-868.
- Langley, K. (1994) The neuroendocrine concept today. *Ann N Y Acad Sci*, **733**, 1-17.
- Lee, C.M. and Tannock, I.F. (2006) Inhibition of endosomal sequestration of basic anticancer drugs: influence on cytotoxicity and tissue penetration. *Br J Cancer*.
- Lehmann, V., Freudenberg, M.A. and Galanos, C. (1987) Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J Exp Med*, **165**, 657-663.
- Levy, B.D., Bonnans, C., Silverman, E.S., Palmer, L.J., Marigowda, G. and Israel, E. (2005) Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, **172**, 824-830.
- Li, X., Wang, T., Zhao, Z. and Weinman, S.A. (2002) The ClC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C1483-1491.
- Lu, Y., Hong, S., Yang, R., Uddin, J., Gotlinger, K.H., Petasis, N.A. and Serhan, C.N. (2007) Identification of endogenous resolvin E1 and other lipid mediators derived from eicosapentaenoic acid via electrospray low-energy tandem mass spectrometry: spectra and fragmentation mechanisms. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **21**, 7-22.
- Luciani, F., Spada, M., De Milito, A., Molinari, A., Rivoltini, L., Montinaro, A., Marra, M., Lugini, L., Logozzi, M., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Parmiani, G., Arancia, G., Belardelli, F. and Fais, S. (2004) Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 1702-1713.
- Mangino, M.J., Brounts, L., Harms, B. and Heise, C. (2006) Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **79**, 84-92.
- McMahon, B. and Godson, C. (2004) Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*, **286**, F189-201.
- McSheehy, P.M., Troy, H., Kelland, L.R., Judson, I.R., Leach, M.O. and Griffiths, J.R. (2003) Increased tumour extracellular pH induced by Bafilomycin A1 inhibits tumour growth and mitosis in vivo and alters 5-fluorouracil pharmacokinetics. *Eur J Cancer*, **39**, 532-540.
- Millot, C., Millot, J.M., Morjani, H., Desplaces, A. and Manfait, M. (1997) Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorometry. *J Histochem Cytochem*, **45**, 1255-1264.
- Moertel, C.G. (1987) Karnofsky memorial lecture. An odyssey in the land of small tumors. *J Clin Oncol*, **5**, 1502-1522.
- Moncada, S., Ferreira, S.H. and Vane, J.R. (1973) Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature*, **246**, 217-219.
- Nadler, G., Morvan, M., Delimoge, I., Belfiore, P., Zocchetti, A., James, I., Zembryki, D., Lee-Ryckzewski, E., Parini, C., Consolandi, E., Gagliardi, S. and Farina, C. (1998) (2Z,4E)-5-(5,6-dichloro-2-indolyl)-2-methoxy-N-(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yl)-2,4-pentadienamide, a novel, potent and selective inhibitor of the osteoclast V-ATPase. *Bioorg Med Chem Lett*, **8**, 3621-3626.
- Novak, T.E., Babcock, T.A., Jho, D.H., Helton, W.S. and Espot, N.J. (2003) NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **284**, L84-89.

- Nowak, J., Weylandt, K.H., Habel, P., Wang, J., Dignass, A., Glickman, J.N. and Kang, J.X. (2007) Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids. *Carcinogenesis*, **28**, 1991-1995.
- O'Toole, D., Hentic, O., Corcos, O. and Ruzsniwski, P. (2004) Chemotherapy for gastro-enteropancreatic endocrine tumours. *Neuroendocrinology*, **80 Suppl 1**, 79-84.
- Ouar, Z., Bens, M., Vignes, C., Paulais, M., Pringel, C., Fleury, J., Cluzeaud, F., Lacave, R. and Vandewalle, A. (2003) Inhibitors of vacuolar H⁺-ATPase impair the preferential accumulation of daunomycin in lysosomes and reverse the resistance to anthracyclines in drug-resistant renal epithelial cells. *Biochem J*, **370**, 185-193.
- Parkinson, J.F. (2006) Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. *Inflamm Allergy Drug Targets*, **5**, 91-106.
- Peters-Golden, M., Canetti, C., Mancuso, P. and Coffey, M.J. (2005) Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol*, **174**, 589-594.
- Petrangolini, G., Supino, R., Pratesi, G., Dal Bo, L., Tortoreto, M., Croce, A.C., Misiano, P., Belfiore, P., Farina, C. and Zunino, F. (2006) Effect of a novel vacuolar-H⁺-ATPase inhibitor on cell and tumor response to camptothecins. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Piwon, N., Gunther, W., Schwake, M., Bosl, M.R. and Jentsch, T.J. (2000) CIC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*, **408**, 369-373.
- Raghunand, N., Martinez-Zaguilan, R., Wright, S.H. and Gillies, R.J. (1999) pH and drug resistance. II. Turnover of acidic vesicles and resistance to weakly basic chemotherapeutic drugs. *Biochem Pharmacol*, **57**, 1047-1058.
- Rajagopal, A. and Simon, S.M. (2003) Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell*, **14**, 3389-3399.
- Roth, G.J., Stanford, N. and Majerus, P.W. (1975) Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 3073-3076.
- Salazar, G., Love, R., Styers, M.L., Werner, E., Peden, A., Rodriguez, S., Gearing, M., Wainer, B.H. and Faundez, V. (2004) AP-3-dependent mechanisms control the targeting of a chloride channel (CIC-3) in neuronal and non-neuronal cells. *J Biol Chem*, **279**, 25430-25439.
- Sardini, A., Amey, J.S., Weylandt, K.H., Nobles, M., Valverde, M.A. and Higgins, C.F. (2003) Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. *Biochim Biophys Acta*, **1618**, 153-162.
- Sass, G., Heinlein, S., Agli, A., Bang, R., Schumann, J. and Tiegs, G. (2002) Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine*, **19**, 115-120.
- Saunders, M. and Iveson, T. (2006) Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Br J Cancer*, **95**, 131-138.
- Schindler, M., Grabski, S., Hoff, E. and Simon, S.M. (1996) Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr). *Biochemistry*, **35**, 2811-2817.
- Schmocker, C., Weylandt, K.H., Kahlke, L., Wang, J., Lobeck, H., Tiegs, G., Berg, T. and Kang, J.X. (2007) Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology*, **45**, 864-869.

- Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M. and Serhan, C.N. (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*, **447**, 869-874.
- Serhan, C.N. (2005) Novel omega -- 3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol Ther*, **105**, 7-21.
- Serhan, C.N., Arita, M., Hong, S. and Gotlinger, K. (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids*, **39**, 1125-1132.
- Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill L, A., Perretti, M., Rossi, A.G. and Wallace, J.L. (2006) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *Faseb J*.
- Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N. and Gronert, K. (2000) Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*, **192**, 1197-1204.
- Serhan, C.N., Hamberg, M. and Samuelsson, B. (1984) Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5335-5339.
- Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G. and Moussignac, R.L. (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, **196**, 1025-1037.
- Sharon, P. and Stenson, W.F. (1984) Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **86**, 453-460.
- Simopoulos, A.P. (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, **56**, 365-379.
- Stenson, W.F., Cort, D., Rodgers, J., Burakoff, R., DeSchryver-Kecsckemeti, K., Gramlich, T.L. and Beeken, W. (1992) Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann Intern Med*, **116**, 609-614.
- Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Bosl, M.R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R. and Jentsch, T.J. (2001) Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron*, **29**, 185-196.
- Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. and Gottesman, M.M. (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 219-234.
- Tilg, H. and Diehl, A.M. (2000) Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, **343**, 1467-1476.
- Tilley, S.L., Coffman, T.M. and Koller, B.H. (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*, **108**, 15-23.
- Tjonahen, E., Oh, S.F., Siegelman, J., Elangovan, S., Percarpio, K.B., Hong, S., Arita, M. and Serhan, C.N. (2006) Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. *Chem Biol*, **13**, 1193-1202.
- Vaupel, P., Kallinowski, F. and Okunieff, P. (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*, **49**, 6449-6465.

- Visentin, L., Dodds, R.A., Valente, M., Misiano, P., Bradbeer, J.N., Oneta, S., Liang, X., Gowen, M. and Farina, C. (2000) A selective inhibitor of the osteoclastic V-H(+)-ATPase prevents bone loss in both thyroparathyroidectomized and ovariectomized rats. *J Clin Invest*, **106**, 309-318.
- Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M., Kupelnick, B., Jordan, H.S. and Lau, J. (2006) n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr*, **84**, 5-17.
- Warner, T.D. and Mitchell, J.A. (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J*, **18**, 790-804.
- Watanabe, S. and Okuyama, H. (1991) Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on endotoxin-induced hepatitis in mice. *Lipids*, **26**, 467-471.
- Weylandt, K.H. and Kang, J.X. (2005) Rethinking lipid mediators. *Lancet*, **366**, 618-620.
- Weylandt, K.H., Nebrig, M., Jansen-Rosseck, N., Amey, J.S., Carmena, D., Wiedenmann, B., Higgins, C.F. and Sardini, A. (2007) CIC-3 expression enhances etoposide resistance by increasing acidification of the late endocytic compartment. *Mol Cancer Ther*, **6**, 979-986.
- Weylandt, K.H., Valverde, M.A., Nobles, M., Raguz, S., Amey, J.S., Diaz, M., Nastrucci, C., Higgins, C.F. and Sardini, A. (2001) Human CIC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. *J Biol Chem*, **276**, 17461-17467.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y. and Shimizu, T. (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*, **387**, 620-624.

7. Danksagungen

Very special thanks go to my close friend Professor Jing X. Kang at the Massachusetts General Hospital in Boston for our exciting collaborations, which made most of the projects discussed here possible. I started to work with Jing in 1995 in the laboratory of Professor Alexander Leaf at the Massachusetts General Hospital, who is a great mentor and friend to both Jing and me.

Also I wish to thank Professor Charles N. Serhan at the Brigham and Women's Hospital in Boston, whose great work is a wonderful inspiration. Together with Jing Kang's insights, his mentorship has led me into the exciting field of fatty acid and lipid mediator research.

At the Clinical Sciences Centre in London I am very grateful to Dr. Alessandro Sardini, with whom I developed the hypotheses and experiments regarding the role of CIC-3. Professor Chris Higgins, the director of the Clinical Sciences Centre in London and also my thesis supervisor in Oxford, supported us throughout the years and believed in our project.

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Klinikdirektor Professor Bertram Wiedenmann an der Charité in Berlin. Er hat mir in den letzten Jahren viel Vertrauen entgegengebracht und mir die Freiheit für meine eigenen Projekte und Ideen gelassen – und mir dabei auch noch die Möglichkeit einer breiten internistischen Ausbildung eröffnet. Die Oberärzte unserer Klinik, Professor Axel Dignass, PD Dr. Thomas Berg und besonders auch PD Dr. Daniel Baumgart waren mir wichtiger Rückhalt gerade in den schwierigen Phasen der letzten Jahre.

Mein allerherzlichster Dank aber geht an meine Studenten der letzten Jahre. Mit ihnen habe ich die meisten hier vorgestellten Studien in den letzten Jahren durchgeführt. Sie alle, besonders aber Christian Hudert, Christoph Schmöcker, Johannes Nowak, Piet Habbel, Maxim Nebrig und Nils Jansen-Rosseck haben mir mit ihrer intellektuellen Neugier und enthusiastischen Arbeit in unseren Projekten die größte Freude bereitet. Die vielen Diskussionen mit ihnen, mit Jing Kang und Charles Serhan in Boston sowie Alex Sardini in London machten die letzten Jahre zu einer sehr spannenden Zeit.

Zudem danke ich sehr herzlich meiner Familie, insbesondere Jana und meinen Eltern sowie meiner Schwester, für ihren Enthusiasmus und ihre Unterstützung.

8. Eidesstattliche Erklärung

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein anderes Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 26.01.2009

.....
Datum

.....
Unterschrift