

Aus dem Institut für Umwelttoxikologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktorin: Frau Prof. Heidi Foth



Expression und Funktion von MRP-Proteinen als Xenobiotika- Detoxifikationssystem in humanen Lungenzellen in Kultur

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Abdel Rahman Wageeh Torky
geb. am: 18. 09. 1971

in Kairo/Ägypten

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. H. Foth
2. Prof. Dr. St. Hauptmann
3. Prof. Dr. J. Hengstler (Leipzig)

eingereicht am: 01.02.2005
verteidigt am: 17.06.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009002

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009002>]

Referat und bibliographische Beschreibung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung einer Methode zur Kultivierung normaler humaner Lungenzellen unter in-vivo ähnlichen Bedingungen beschrieben. Im Rahmen der Charakterisierung der Lungenzellkulturen wurde die epitheliale Originalität der gewachsenen Zellen nachgewiesen. Eine immunhistochemische Detektion der Zytokeratinen belegte den epithelialen Charakter der Kultur normaler humaner Lungenzellen. So konnten die Formationen von Zytokeratin 7 und Zytokeratin 8/18 (Marker für respiratorisches Epithel) im Zytosol der kultivierten Zellen demonstriert werden. Eine Gegenprobe mit Antikörpern gegen Vimentin, ein Protein in mesodermalen Zellen, Desmin, ein Protein im Muskelgewebe, und SMA (smooth muscle actin), ein Protein in Fibroblasten, zeigte eine Reinheit der Kultur normaler humaner Lungenzellen von nahezu 100%.

Weiterhin wurde die Expression der verschiedenen MRP-Isoformen in normalen humanen Lungenzellen und humanen Lungentumorzellen (A549) untersucht. Diese Proteine sind in der Lage, durch Efflux und intrazelluläre Umverteilung von Xenobiotika damit auch deren Effekte zu verringern. Mittels Immunfluoreszenz-Technik wurde die Expression und die zelluläre Lokalisation dieser Proteine bestimmt. Die Lungenzellen, kultiviert unter dry-wet Bedingungen, zeigten eine polarisierte Lokalisierung der MRP-Transportproteine. Diese Verteilung der MRP-Transporter in den Lungenzellen führt zu einem bevorzugter Abtransport aufgenommener Substrate in den Lungenkreislauf, was als Teil des Abwehrmechanismus der Lunge aufzufassen ist. Neben der Bestimmung der verwendeten Konzentrationen aller Substanzen mittels MTT kam der MRP1- Funktionsassay unter Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen zum Einsatz. In den Tumorzellen war das detektierte Protein MRP1 funktionell aktiv. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte MRP1 ist eine ausgesprochene Glutathion-S-Konjugat Pumpe. Regulatoren des Glutathion-Pools – Buthionin Sulfoximin (BSO) und N-Acetylcystein (NAC) – beeinflussten die Aktivität des MRP-1 vermittelten Transportes deutlich. Einerseits wurde die MRP-Transportaktivität in NAC-vorbehandelten Zellen gesteigert. Andererseits zeigten BSO-vorbehandelte Zellen verminderten MRP1-vermittelter Transport. In der Therapie von Lungentumoren, wäre es möglich durch eine Kombination der Zytostatika mit MRP1-Funktionshemmerden den Weg der Überwindung der Chemotherapie-Resistenz zu eröffnen.

Torky, Abdel Rahman Wageeh: Expression und Funktion von MRP-Proteinen als Xenobiotika -Detoxifikationssystem in humanen Lungenzellen in Kultur.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2004

1.	Einleitung	
1.1.	Anatomische, physiologische und biochemische Aspekte der Atemwege	1
1.2.	ATP Binding Cassette (ABC) Superfamilie	6
1.3.	Multidrug Resistenz assoziierte Proteine (MRP)-Familie	8
	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	
2.1.	Material	15
2.1.1.	Zellkulturen	15
2.1.2.	Chemikalien und Biochemikalien	15
2.1.3.	Antikörper	16
2.1.4.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
2.2.	Methoden	18
2.2.1.	Sterilisation von Materialien und Lösungen	18
2.2.2.	Splitten und Kultivieren von Tumorzelllinien	18
2.2.3.	Isolierung und Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen und Lungenparenchymzellen	19
2.2.4.	Zellkulturmedien DMEM und AECG	20
2.2.5.	Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen und peripheren Lungenzellen auf Membran-Inserts	20
2.2.6.	Charakterisierung der NHBEZ- und PLZ-Kulturen kultiviert auf Membran-Inserts	22
2.2.7.	Vitalitätstest	22
2.2.8.	Immunochemischer Nachweis von MRPs in Lungenzellkulturen	23
2.2.9.	Laser Scanning Confocal Mikroskopie	24
2.2.10.	Studie zur MDR-1 und MRP-1 abhängigen Transport-Aktivität	25
2.2.11.	Modulation der MRP1-Transportaktivität durch Glutathion-Pool-Regulatoren	27
2.2.12.	Auswertung der durchgeführten Experimente	27
3.	Ergebnisse	
3.1.	Zellkulturen der verwendeten Lungenzellen	28
3.1.1.	Die Kultur normaler humaner Lungenepithelzellen	28
3.1.2.	Kultivierte Lungentumorzellen als Model der MDR1- und MRPs- Expression / Transport-Aktivität	28

3.2.	Vitalitätstest	29
3.3.	Membran-Insert-Kultursystem	31
3.3.1.	Kultivierung von NHBEZ und PLZ auf Membran-Inserts	31
3.3.2.	Charakterisierung der NHBEZ- und PLZ-Kulturen	31
3.4.	Immunfluoreszenz	33
3.4.1.	Zelluläre Verteilung von MRP1-5	33
3.5.	Zelluläre Verteilung von MRP1 und 2 unter verschiedenen Kulturbedingungen mittels Confokal-LASER-Scanning Mikroskopie	36
3.5.1.	Confokal-LASER-Scanning Mikroskopie zur intrazellulären Lokalisierung von MRP1 in NHBEZ	36
3.5.2.	Confokal-LASER-Scanning Mikroskopie zur intrazellulären Lokalisierung von MRP2 in NHBEZ unter verschiedenen Kulturbedingungen	37
3.6.	Untersuchung der MDR1- abhängigen Transportaktivität mittels Fluoreszenz-Imaging	40
3.6.1.	Rhodamin 123 Transport in Lungentumorzelllinien	40
3.6.2.	Rhodamin-123 Spezifität als ein Transport-Substrat für MDR1	42
3.7.	Untersuchung der MRP1- abhängigen Transportaktivität mittels Fluoreszenz-Imaging	43
3.7.1.	CDF Transport in Lungentumorzelllinien	43
3.7.2.	Spezifität und Hemmbarkeit des MRP1-vermittelten Transports	43
3.7.3.	Änderung der CDF Aufnahme durch Glutathion- Pool- Regulatoren	45
4.	Diskussion	49
4.1.	Die Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und peripheren Lungenzellen	49
4.2.	Expression und zelluläre Verteilung von MRP1-5 in humanen Lungenzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen	51
4.3.	MRP1-vermittelte Transportaktivität	56
4.4.	Modulation der MRP1 Transportaktivität durch Glutathion-Pool-Regulatoren	58
5	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	65
7.	Abkürzungsverzeichnis	78
8.	Thesen	79

- 9. Anhang**
- 9.1. Publikationen
- 9.2. Lebenslauf
- 9.3. Erklärung über Promotionsversuche
- 9.4. Selbständigkeitserklärung

1. Einleitung

Lebende Zellen sind von einer Membran umgeben, die ihr Inneres, das Zytoplasma, von dem sie umgebenden Milieu abgrenzt. Transportvorgänge durch diese Zellmembranen spielen eine wesentliche Rolle bei der Kommunikation lebender Zellen mit ihrer Umwelt. Transportmechanismen für die Elimination von toxischen Xenobiotika und ihren Metaboliten aus zellulärer Umgebung sind äußerst wichtig für lebende Organismen. Es ist möglich, dass die Akkumulation dieser Verbindungen eine Vielzahl von regulierenden und anderen (lebenswichtigen) Funktionen beeinflusst und letztlich zum Zelltod führen kann. Spezifische Membran-assoziierte Proteine, bekannt als Effluxpumpen, übernehmen die Aufgabe des Transportes unerwünschter Moleküle aus der Zelle (Moller and Sheikh, 1983; Jenner and Marsden, 1986; Sekine et al., 2000; Kanai und Endou, 2003)

Zu diesen Zwecken stehen spezielle, in die Membran integrierte Proteine zur Verfügung. Vertreter solcher Membran-Proteine stellt die ständig wachsenden Klasse der ABC-Transporter dar, die sich durch ähnlichen Aufbau und die Verwendung von Adenosintriphosphat (ATP) als Energiequelle auszeichnen. Sie sind in allen Organismen, einschließlich des Menschen, anzutreffen. ABC-Transporter sind an einer Vielzahl von Prozessen, wie z.B. der Aufnahme von Nährstoffen oder der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Signalsubstanzen oder toxischen Verbindungen beteiligt. Darüber hinaus besitzen einige dieser Proteine medizinische Relevanz z.B. bei der Pathogenese der Mukoviszidose oder Multiresistenz von Krebszellen (Fath und Kolter, 1993; Dean et al., 2001; Kanai und Endou, 2003; Haimeur et al., 2004).

In der Regel ist die Lunge das Zielorgan von inhalierten Schadstoffen, sie kann aber auch das Zielorgan von Stoffen sein, die über andere Aufnahmewege in die Lunge gelangen. Bezüglich der Wirkung spricht man in beiden Fällen von Lungentoxizität. Der Respirationstrakt kann auch als Eingangspforte für toxische Stoffe dienen, die dann andere Organe schädigen.

Anatomische, physiologische und biochemische Aspekte der Atemwege

Entsprechend einem Vorschlag der „International Standards Organisation“ (ISO) werden für die Atemwege die drei Hauptkompartimente 1) extrathorakal (E) 2) tracheobronchial (TB) 3) alveolär (A) unterschieden. Der extrathorakale Bereich, der manchmal auch als nasopharyngealer Bereich bezeichnet wird, umfasst Nase, Mund, Nasopharynx, Oropharynx und Larynx. Der tracheobronchiale Bereich beinhaltet Trachea, Bronchien und

die terminalen Bronchiolen. Der alveoläre/pulmonale Bereich umfasst die respiratorischen Bronchiolen, die Alveolargänge und die Alveolen. Im Mittel atmet ein Mensch pro Tag ungefähr 10-15 m³ Luft. Dieses Volumen ist abhängig vom Körpergewicht und der körperlichen Aktivität. Über Mund und Nase gelangt die Luft in den Rachen und in die Luftröhre. Die Atemluft wird über die Bronchien zu den Lungenbläschen transportiert, in denen der Gasaustausch von Sauerstoff und Kohlendioxid stattfindet.

Von der Luftröhre bis zu den Lungenbläschen, die Alveolen genannt werden, zählt man beim Mensch durchschnittlich 16-20 Verzweigungen. An der sogenannten Carina teilt sich die Luftröhre in die beiden Hauptbronchien, die zur rechten und zur linken Lunge führen. Nach wenigen Zentimetern teilen sich dann die Hauptbronchien wiederum auf in die verschiedenen Lappenbronchien (**Abb. 1.**).

Die kleinsten Verzweigungen der Bronchien werden Bronchiolen genannt. Die Knorpelspannen, die die großen Bronchien verstärken, werden in den Lappenbronchien durch Knorpelplättchen ersetzt. Die Bronchien werden immer dünnwandiger. In den Bronchiolen, die nur noch 1 mm Durchmesser haben, fehlen die Knorpelverstärkungen ganz. Sie bestehen nur noch aus Muskelfasern, Bindegewebe und Epithel.

Auch die Bronchiolen verzweigen sich weiter. Sie gehen in die sehr feinen Ästchen der Bronchioli respiratorii über, die wiederum direkt in den Bereich der Lunge münden, in dem die eigentliche Atmung stattfindet. Dieser Bereich ist gekennzeichnet durch die Alveolargänge mit den Lungenbläschen. Insgesamt hat ein Mensch ungefähr 300 Millionen Lungenbläschen. Jedes einzelne ist von einem feinen Netz von Blutgefäßen umgeben, die für den Gasaustausch sorgen.

Acht verschiedene Zellarten des Bronchialepithels werden histologisch unterschieden. Sie differieren nicht nur in der Ultrastruktur sondern auch in ihrer Funktion und in ihrer Sensibilität gegenüber inhalativ aufgenommenen Fremdstoffen. Folgende Zellarten sind beschrieben: zilienträgende Flimmerepithelzellen, Basalzellen, Mukogranulomzellen, neuroendokrine Zellen, Bürstenzellen und sekretorische Zellarten wie die mukösen Becherzellen, Clara Zellen und die serösen Zellen (**Abb. 2.**) (Crapo et al., 1982; Clark, 1988; George et al, 1993; Plopper, 1993).

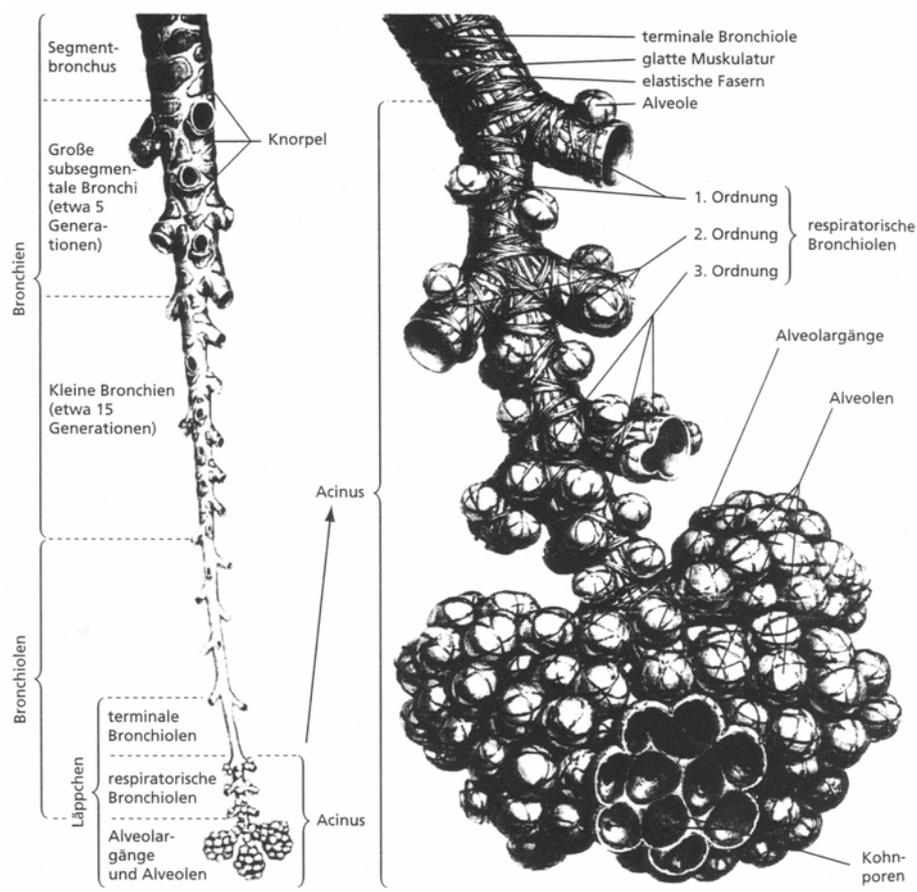


Abb.1. : Bronchien, Bronchiolen, Alveolargänge und Alveolen der Lunge des Menschen (nach Netter 1980). Die Bronchien verzweigen sich etwa 20-mal bis zu den Alveolargängen. Mit Acinus wird eine Einheit aus respiratorischen Bronchiolen und den Alveolargängen bezeichnet.

Den größten Teil des Bronchialepithels bilden die zilientragenden Epithelzellen. Sie finden sich vorrangig im oberen Respirationstrakt. Der apikale Zellpol ist reichlich mit Mitochondrien versorgt, und die apikale Oberfläche wird von einem Zilienrasen bedeckt, in die einige lange Mikrovilli eingesprengt sind. Die Zilien sorgen für einen ständigen Abtransport von Schleim und so für die Reinigung der Atemwege (Ziliäre Clearance). Über die Stoffwechselaktivitäten dieses Zelltypus ist bis jetzt wenig bekannt (Clark, 1988; Crapo et al., 1982; Dahl et al., 1988; Dahl und Lewis 1993). Im ziliären Epithel finden sich verstreut neben den Basalzellen die sogenannten Becherzellen, die Clara-Zellen und die serösen Zellen, die neben den submukös gelegenen Drüsen an der Produktion des Bronchialschleims beteiligt sind. Basalzellen sind kleine abgeflachte Zellen mit einem schmalen Zytoplasmasaum, die fest mit der Basalmembran verwachsen sind und nicht das Bronchiallumen erreichen. Das Zytoplasma ist reichlich mit Intermediärfilamenten gefüllt.

Eine große Zahl an Desmosomen verbindet diese Zellen mit den benachbarten Zellen. Die teilungsfähigen Basalzellen werden funktionell auch als stratum generativum angesehen. Sie liefern Intermediärzellen nach, die sich dann weiter zu Flimmerepithelzellen differenzieren können und somit für den Ersatz abgestoßener Flimmerepithelzellen sorgen. Clara-Zellen sind die nichtzilientragenden Bronchialepithelzellen des distalen Bronchialbaums und werden morphologisch von den zilientragenden Bronchialepithelzellen unterschieden. Sie befinden sich am Übergang von den Bronchiolen zum gasaustauschenden Alveolar-Epithel, den Acini, sowie im höheren Respirationstrakt bis hin zur Nasenschleimhaut. Es sind kuboide, säulenartige Zellen, frei von Zilien, mit langen apikalen Mikrovilli und neurosekretorischen Granula. Im Elektronenmikroskop zeigen sie ein ausgeprägtes agranuläres Endoplasmatisches Retikulum (ER), große Mitochondrien und osmiophile Granula. Immunhistochemische Studien an histologischem Sektionsmaterial und an isolierten Zellen haben belegt, dass Clara-Zellen Cytochrom P-450 Isoenzyme exprimieren und somit über eine Xenobiotika-Stoffwechselaktivität verfügen. Sie werden u.a. zu den Progenitorzellen der chemisch induzierten Tumorgenese gezählt (Belinsky et al., 1991; Clark, 1988; Dahl und Lewis, 1993).

Muköse Becherzellen (Gobletzellen) sind angefüllt mit vielen Granula unterschiedlicher Elektronendichte. Der Nukleus ist im basalen Teil der Zelle zusammengepresst, und die Zellorganellen sind zwischen den Granula im Zytoplasma verstreut. Die sekretorische Zellarten sind zu verschiedenen Anteilen über den Tracheobronchialbaum verteilt. Die Zellen kommen als sezernierende Zellen in Betracht, da ihr Zytoplasma über eine Vielzahl sphärischer, membranverpackter Einschlüsse, die als sekretorische Granula identifiziert wurden, verfügt. In serösen Zellen ist der Kern im basalen Teil der Zelle gelegen. Die Zelle ist hauptsächlich von rauem endoplasmatischem Retikulum, einem prominenten Golgiapparat und elektronendichten Granula ausgefüllt. Bürstenzellen und neuroendokrine Zellen wurden nur in einem geringeren Maße gefunden, (George et al, 1993; Plopper, 1993).

Schleimhaut und Flimmerhärchen schützen vor Infektionen. Die Knorpelspangen und Knorpelplättchen der Bronchien haben die Aufgabe, die Bronchien für die Atemluft offen zu halten. Die "Wand" der Bronchien verfügt außerdem über Muskeln, die sich zusammenziehen können. In diesem Fall verengen sich die Bronchien. So wird durch die Muskelkontraktion die Atmung unterstützt. Alle Bronchien sind mit einer Schleimhaut ausgekleidet, die von feinen Flimmerhärchen bedeckt sind. Diese Härchen sind immer feucht. Einerseits feuchten sie so die eingeatmete Luft an. Andererseits wird durch ihre

Bewegung eingeatmeter Staub, Pollen und Bakterien nach außen befördert. Flimmerhärchen und Schleimhaut sind sehr empfindlich und reagieren auf häufig wiederkehrende Reize wie z. B. Rauchen, Luftschadstoffe und häufige Infektionen. Erst durch exzessive schleimproduktion und Zilienhyperaktivität. Wenn solche Reize länger andauern, kann es zu einem Verlust der Zilienfunktion kommen.

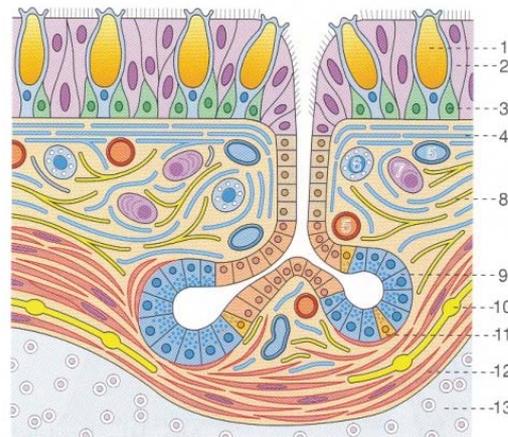


Abb.2. Schematische Darstellung funktionell wesentlicher Anteile der Wand eines Bronchus. Oberflächenepithel mit **1** Becherzellen, **2** Flimmerzellen und **3** Basalzellen; **4** Kollagenfibrillen, **5** Blutgefäße, **6** Mastzelle, **7** Plasmazelle, **8** elastische Fasern, **9** seromuköse Drüse, die auch endokrine Zellen (**11**) enthält, **10** autonomer Nerv, **12** glatte Muskulatur, **13** hyaliner Knorpel.

Der Durchmesser einer menschlichen Alveole beträgt etwa 200 bis 300 μm . Die gesamte Fläche für den Gasaustausch ist ungefähr 100 m^2 , das ist etwa 50-mal mehr als die Oberfläche der Haut. Zur epithelialen Auskleidung der Alveolen tragen vor allem die Alveolar-Typ I-Zellen (oder auch Pneumozyten Typ I) (squamöse Epithelzellen) bei. Sie bedecken die Oberfläche der Alveolen zu 95%, obwohl sie lediglich 4-5% der Zellen der tiefen Lungenabschnitte stellen. Ihr Zytosol ist Teil der Diffusionsstrecke des Gasaustausches von den Alveolen zu den Kapillaren des Blutgefäßsystems. Sie besitzen keine eigenen Mitose- und Proliferationsmöglichkeiten sowie Reparaturmechanismen. Sie können aber durch Typ II-Zellen ersetzt werden, die dann zu Typ-I-Zellen differenzieren. Zwischen diesen Typ I-Zellen befinden sich eingestreut die Alveolar Typ II-Zellen (AII-Zellen), die nur 5% der alveolären Oberfläche bedecken. Es handelt sich dabei um kleine, irreguläre kuboidale Zellen mit einem organellenreichen Zytoplasma. Unter dem Elektronenmikroskop sind auf ihrer Oberfläche zahlreiche kurze Mikrovilli sichtbar.

Wegen ihrer großen Oberfläche sind die Typ-I-Zellen gegenüber einer Schadgasexposition sehr empfindlich.

Der alveoläre Makrophage ist ein Zelltyp der inhalierte Partikel phagozytiert und anschließend aus dem alveolären Bereich zu den mit Zilien versehenen Atemwegen wandern kann.

Die Lunge, als Gasaustauschorgan, wird auf zwei Wegen gegenüber Fremdstoffen exponiert. Über die eingeatmete Luft ist die Lunge der direkten Einwirkung potenziell gefährlicher, meist anthropogener Substanzen ausgesetzt (z. B. Tabakrauch, Mineralstäube, Metalloxide und Gase, wie Ozon oder Phosgen). Andererseits nimmt sie das gesamte Auswurfvolumen des rechten Ventrikels auf und ist damit neben dem Herzen das am stärksten durchblutete Organ. Dadurch hat sie Kontakt zu allen im venösen Blut enthaltenen endogenen und exogenen Substanzen z.B. Ipomeanol (aus kontaminierten Tierfutter), Paraquat durch orale Exposition zu Herbizidlösungen. Eine Schädigung der Lunge kann somit sowohl durch inhalativ als auch durch systemisch verfügbare Verbindungen erfolgen (Mauderly et al., 1984; Quinlan et al., 1994; Heppleston 1991; Halliwell und Gutteridge, 2000). Neben ihrer respiratorischen Funktion erfüllt die Lunge auch eine Reihe metabolischer Funktionen.

Die Lunge besitzt eine komplexe Gewebsarchitektur, welche eine starke Kompartimentierung und Polarisierung aufweist. Es sind insgesamt mehr als vierzig verschiedene Zelltypen beschrieben, doch nur sechs sind bis jetzt als Targetzellen bei einer toxischen pulmonalen Schädigung bekannt. Dies sind Alveolar Typ I-Zellen, Alveolar Typ II-Zellen, Alveolarmakrophagen, Kapillar-Endothelzellen, ziliotragende Bronchialepithelzellen und nichtziliotragende Bronchialepithelzellen. Einige dieser Zelltypen reagieren stärker auf initiiierende Einflüsse, und bilden somit eine Zielpopulation für die Induktion maligner Tumore. Für nur wenige Zelltypen ist eine aktive Beteiligung an der Biotransformation von Xenobiotika nachgewiesen (Dahl et al., 1988; Martin, 1993).

ATP Binding Cassette (ABC) Superfamilie

Die Superfamilie der ABC-Transporter repräsentiert mit 100 Mitgliedern in Bakterien, Hefen, Pflanzen und Säugern die größte Genfamilie transmembraner Exportpumpen. Die phylogenetische Analyse der bekannten humanen ABC-Transporter führte zu einer Klassifizierung in sieben (Subfamilien A bis G) wobei sie nach ihren Ähnlichkeiten in der Aminosäure-Sequenz gruppiert wurden (Higgins, 1992; Childs und Ling, 1994; Dean und

Allikmets, 1995; Dean et al., 2001). (<http://www.med.rug.nl/mdl/humanabc.htm> und <http://www.ucl.ac.uk>) (**Abb. 3.**).

Die meisten Vertreter der ABC Superfamilie besitzen Transportfunktionen, die meist unidirektional sind, wobei sie durch Bindung von ATP an Nukleotid-Bindungsstellen eine Vielzahl unterschiedlicher Xenobiotika durch extra- und intrazelluläre Membranen translozieren (Ambudkar et al., 1999).

Dazu zählen Ionen, Phospholipide, Peptide, Steroide, Polysaccharide, Aminosäuren, organische Anionen, Medikamente und Xenobiotika (Borst et al., 1999; Cole und Deeley, 1998; Hipfner et al., 1999; Higgins, 1992; Klein et al., 1999). In Prokaryonten erfolgt hauptsächlich der Import von essenziellen Substanzen, die nicht durch Diffusion aufgenommen werden können. Demgegenüber wird in Eukaryonten meistens ein Export oder ein vom Zytoplasma in zelluläre Kompartimente (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Peroxisomen) gerichteter Transport realisiert (Ehrmann et al., 1998).

Ein Strukturmerkmal der ABC-Proteine ist der Aufbau aus vier funktionellen Domänen. Dazu gehören zwei zur Membranverankerung dienende hydrophobe und zwei hydrophile, zytoplasmatisch gelegene ATP-bindende Bereiche (Fath und Kolter, 1993).

In den siebziger Jahren wurde, das erste Mitglied der ABC Superfamilie, das MDR1-Gen (MDR = *multidrug resistance*) beschrieben, welches für das sogenannte P-Glykoprotein (P=Permeabilität) kodiert (Juliano und Ling, 1976; Haimeur et al., 2004). Das 170 kDa große Protein befindet sich in der Plasmamembran und ist für die Multidrug-Resistenz im klassischen Sinne zuständig. Der MDR Phänotyp schließt eine Kreuzresistenz gegen Anthrazycline (Doxorubicin, Daunorubicin), Epipodophyllotoxine (Etoposid), Vinca-Alkaloide (Vinblastin, Vincristin), Taxol und andere Gruppen ein. Anfänglich durchgeführte physiologische und pharmazeutische Studien zeigten Hinweise für eine verminderte Anreicherung des Therapeutikums in der Zelle (Litman et al., 2001). Als Ursache dafür wurden ein vermehrter Auswärtstransport (Dano, 1973) bzw. eine verminderte Zellpermeabilität (Ling und Thompson, 1974) diskutiert.

In den frühen neunziger Jahren wurde ein weiterer, für Chemoresistenz wichtiger ABC-Transporter beschrieben (Cole *et al.*, 1992), der sich durch ein etwas anderes Kreuzresistenzmuster unterschied. Es handelte sich hierbei um das MRP (*Multidrug resistance related protein*), welches ebenfalls Anthrazycline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide transportieren kann, jedoch nicht die Spindelgifte Colchicin und Taxol. Die transportierten Substanzen sind in diesem Kontext keine „Substrate“, da sie vom Transporter nicht biochemisch umgewandelt werden. Young und Holland (1999) prägten

daher den Begriff Allocrite für den Transport unveränderter Verbindungen. In den folgenden Jahren wurden weitere Mitglieder der MRP-Familie (ABCC) entdeckt, die heute nach Abschluß des humanen Genomprojekts 13 Mitglieder umfaßt, von denen aber nur 6 bisher näher charakterisiert wurden (Dean *et al.*, 2001; Efferth, 2001; Gottesman, 2002; Haimeur *et al.*, 2004). Für den Menschen wurden bisher 48 Voll- und Halbtransporter beschrieben.

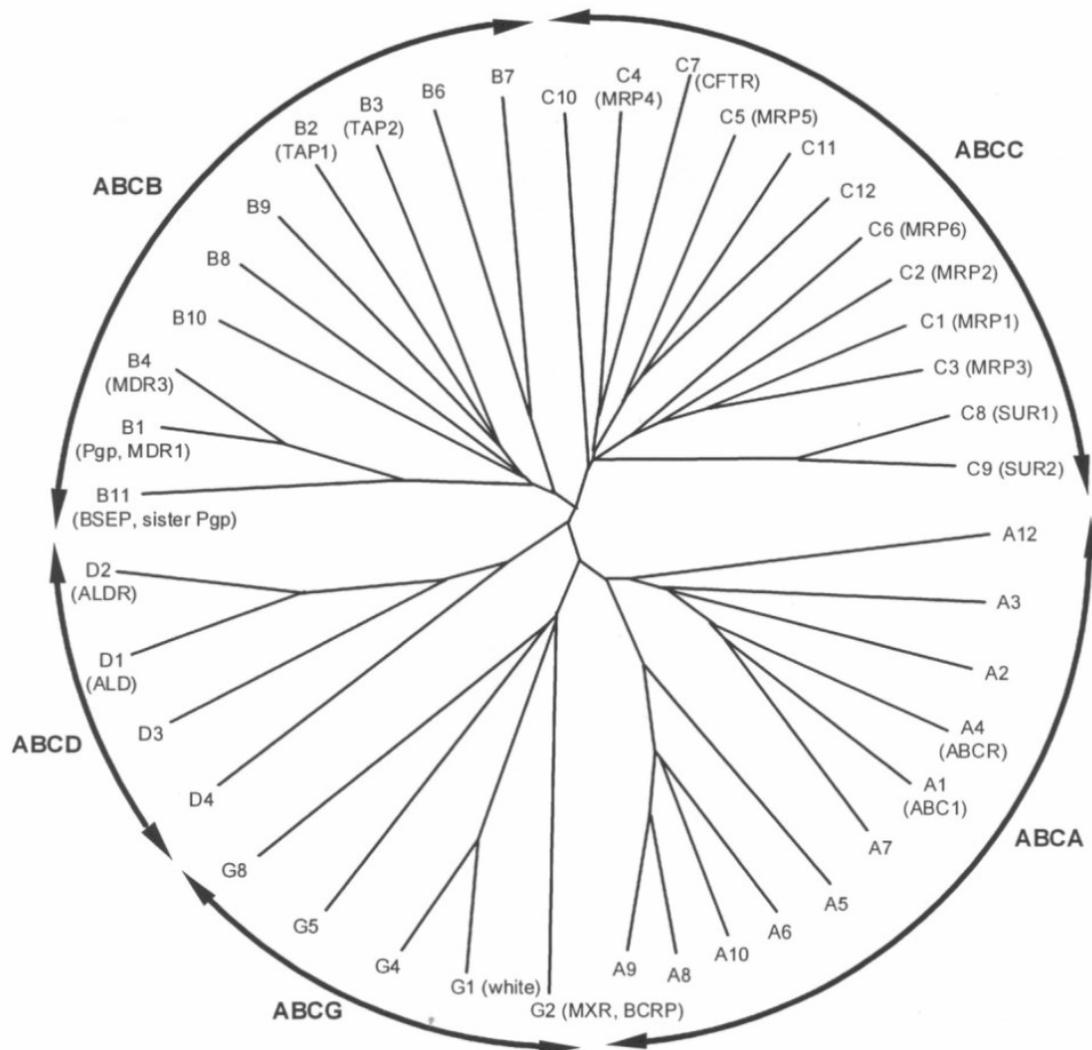


Abb.3. Phylogenetischer Baum der humanen ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Proteine. Nach Sequenz-Homologie werden ABC Proteine in sieben Subfamilien klassifiziert (ABCA bis ABCG).

Multidrug Resistenz assoziierte Proteine (MRP)-Familie

Die Biotransformation von physiologischen Substraten oder künstlich erzeugten Fremdstoffen (Xenobiotika) im menschlichen Organismus ist ein komplexer, enzymatisch gesteuerter Prozess. Das Ziel besteht in der Regel darin, die Ausscheidungsfähigkeit mehr

oder weniger lipophiler Substanzen durch Überführung in hydrophilere Metaboliten zu erhöhen. Dabei kann es entweder zu einer Entgiftung (Detoxifizierung) oder einer metabolischen Aktivierung (Toxifizierung) der betreffenden Substanz kommen.

Nach der Aufnahme von lipophilen Xenobiotika werden diese in der Regel oxidiert (Phase I Metabolismus) und/oder durch Konjugation mit Glutathion, Sulfat oder Glucuronat in eine wasserlösliche Form umgewandelt (Phase II Metabolismus). Die dabei entstehenden Konjugate sind nun hydrophil. Um aus der Zelle zu diffundieren, müssen sie daher mit Hilfe von Transportproteinen aus der Zelle geschleust werden (Phase III Metabolismus) (Bai et al., 2004).

Glutathion-X-Konjugat Pumpen wurden erstmals von Ishikawa beschrieben (Ishikawa, 1992). Cole et al., 1992 entdeckte die erste sogenannte Glutathion-X-Konjugate Pumpe, das Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1), welche *Multidrug Resistance* vermittelte. 1996 wurde der zweite Protein-Transporter der ABCC-Subfamilie identifiziert (Paulusma et al., 1996). Danach folgten die MRP 3-5 (Kool et al., 1997; Allikmets et al., 1996). Die letzten bekannten Mitglieder sind MRP 6-9, welche erst kürzlich entdeckt wurden (Hopper et al., 2001).

Die Topologie der verschiedenen Multidrug Resistance Proteine ist einander ähnlich. Sie bestehen aus Transmembran-Domänen und Nuklotid-Bindungsdomänen, die ATP binden und hydrolysieren. Die Mitglieder der MRP Familie werden in 2 Gruppen geteilt (**Abb. 4.**). Eine Gruppe (MRP1 ähnliche Proteine) umfasst MRP1, 2, 3, 6 und 7. Diese besitzen eine zusätzliche Transmembrandomäne (N-terminale Domäne TMD1 = MSD1). Zur zweiten Gruppe zählen MRP4, 5, 8 und 9, welche kleiner als MRP1 sind und keine MSD1 aufweisen. MSD1 scheint nicht für die Transport-Aktivität notwendig zu sein (Bakos et al., 1998; Borst et al., 2000; Haimeur et al., 2004).

Als MRP1-Genlokus konnte das Chromosom 16 detektiert werden (Krishnamachary und Center, 1993; Slovak et al., 1993). Das Produkt ist ein 190 kD grosses membrangebundenes Protein (Almquist et al., 1995, Krishnamachary et al., 1993). MRP1 ist strukturell dem P-Glykoprotein ähnlich, weist aber zusätzlich eine aminoterminal Extension mit 5 transmembranen Regionen auf. Obwohl die Aminosäurehomologie zum P-Glykoprotein nur 15% beträgt, ist das Zytostatika-Spektrum des MRP1 dem des P-Glykoprotein sehr ähnlich, jedoch nicht identisch, und schließt Substrate wie Doxorubicin, Vincristin, Etoposid und Methotrexat ein (Loe et al., 1998; Borst et al., 2000; Gottesman, 2002).

Eine zweite Isoform des MRP fand man in der kanalikulären Leberplasmamembran mit Hilfe von Immunblots und Immunfluoreszenzmikroskopie sowie Sequenzierung von cDNA-Fragmenten. Dieses Protein erhielt die Bezeichnung MRP2. Nach der Nomenklatur wurde er zur ABC-Transporter-Subfamilie C, der CFTR/MRP-ähnlichen Proteine, mit der Bezeichnung ABCC2 zugeordnet. Das humane Homolog konnte aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu seinem aus der Ratte verwandten Gen, kloniert werden (Müller *et al.* 1994 ; Taniguchi *et al.*, 1996; Büchler *et al.*, 1996).

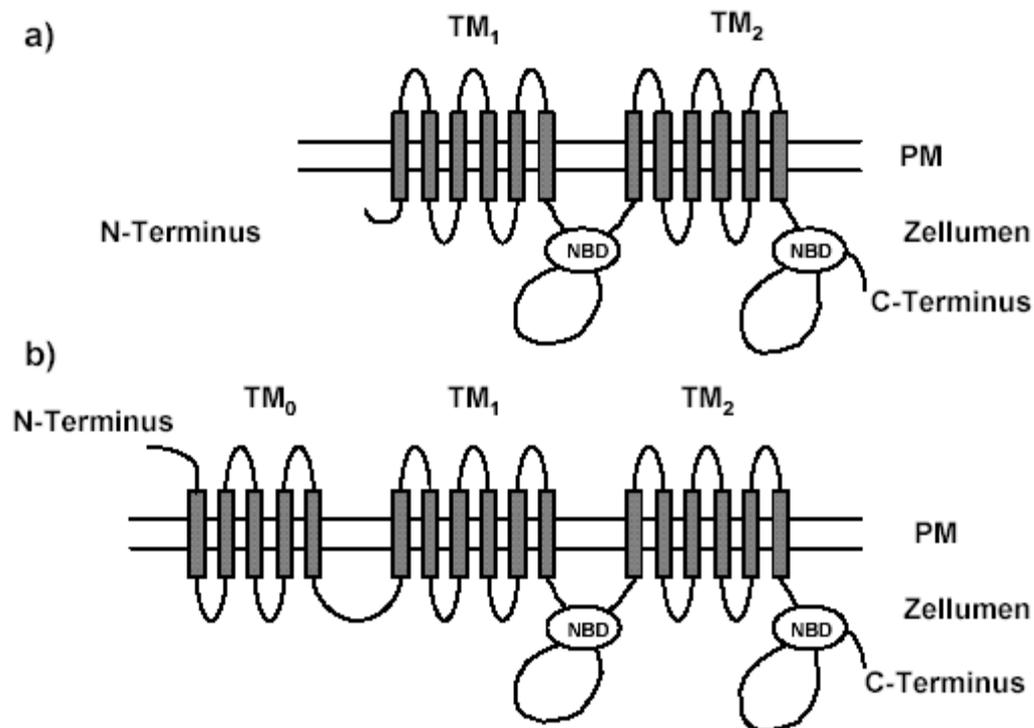


Abb. Dargestellt sind verschiedene Typen von MRP-Transportern in der Plasmamembran (PM). a) mit zwei Transmembrandomänen (TM₁ und TM₂) und zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD), z.B. MRP4, MRP5, ABCC11 und ABCC12 **b)** mit drei Transmembrandomänen (TM₀, TM₁ und TM₂) und zwei NBD, z.B. MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 und MRP7 (nach Haimeur *et al.*, 2004)

Das *MRP2*-Gen konnte anschließend auch für den Menschen und für verschiedene Tierspezies nachgewiesen werden (Keppler und König 1997). Es ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert (Toh *et al.*, 1999; Tsuji *et al.*, 1999). Das Humane Protein besteht aus 1545 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 174 kDa in seiner deglykosilierten Form (Taniguchi *et al.* 1996) und wird hauptsächlich in der apikalen Membran von Hepatozyten exprimiert. Eine geringere Expression wurde auch für die Niere und den Dünndarm beschrieben (Kool *et al.*, 1997). Die biologische Funktion dieses

Transporters besteht in der Ausscheidung von Bilirubin, das beim Abbau des Hämoglobins entsteht (Zimniak, 1993).

MRP2 ist vor allem in der Hepatozytenmembran zu finden und dort am ATP-abhängigen Transport von physiologischen Glutathionkonjugaten (z..B. Bilirubin) in die Gallengänge und sinusoidalen Gefäße beteiligt. Dieser Transport ist zum Teil durch Buthioninsulphoximin (BSO) hemmbar (Versantvoort et al., 1996). Trotz dieser physiologischen Rolle von MRP2, dessen Fehlen zum Dubin-Johnson-Syndrom (angeborene Störung der Bilirubinsekretion in die Gallenkanäle) führt (Paulusma et al., 1997), haben MRP1 und MRP2 ein ähnliches Substratspektrum. Von beiden werden auch Vinca-Alkaloide und Anthracycline transportiert, die an saure Liganden in der Zelle konjugiert wurden. Der Transport dieser Substanzen durch MRP1 und 2 setzt die Anwesenheit von reduziertem GSH voraus.

MRP3 spielt in der Resistenz-Entwicklung gegenüber Etoposid und Teniposid, nicht aber gegenüber anderen Medikamenten eine Rolle. Das MRP3-Gen ist auf Chromosom 17q21.3 lokalisiert. MRP3 Protein ist aus 1527 Aminosäuren zusammengesetzt (Kool et al., 1997; Scheffer et al., 2002b). MRP1 bis -3 transportieren zusätzlich zu den neutralen oder schwach basischen organischen Verbindungen (Co-Transport mit freiem GSH) auch Substanzen, die an GSH, Glukuronsäure oder Sulfat konjugiert wurden (Leier et al., 1994; Muller et al., 1994; Borst et al., 2000).

MRP4 (ABCC4) ist auf Chromosom 13q32.1 lokalisiert und kodiert für 1325 Aminosäuren. MRP4 konnte in vielen Organen einschließlich der Lunge gefunden werden. Auch hier ist wenig über die physiologische Funktion dieses Proteins bekannt. MRP4 ist als Zell-Export-Pumpe für anti-virale Wirkstoffe beschrieben worden (Scheutz et al., 1999; Lee et al., 2000; Lai und Tan, 2002; Reid et al., 2003; Haimeur et al, 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass MRP4 Nucleotide transportiert und dafür Glutathion benötigt (Lai und Tan, 2002).

Partielle cDNA für humanes MRP5 Protein wurde erstmals 1997 beschrieben (Kool et al., 1997). Später wurde die vollständige cDNA von verschiedenen Arbeitsgruppen veröffentlicht. Dieses Protein ist wie MRP1 ubiquitär in sämtlichen Organen verteilt (Belinsky et al., 1998; Kool et al., 1997; Wijnholds et al., 2000b; McAleer et al., 1999; Jedlitschky et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Hirrlinger et al., 2002). Das humane MRP5 ist auf Chromosom 3q27 lokalisiert und besteht aus 1437 Aminosäuren. MRP5 kann ebenfalls GSH-Konjugate transportieren (Wijnholds et al., 2000b; McAleer et al., 1999). Wie MRP4 scheint auch MRP5 als Nucleotid-analoge Pumpe zu wirken (Jedlitschky et al., 2000;

Wielinga et al., 2003). Für MRP5 wurde darüber hinaus Resistenz gegen Metallsalze, wie Cadmiumchlorid oder Kaliumantimonyl-tartrat beschrieben (McAleer et al., 1999).

MRP6 (ABCC6) ist wie MRP1 auf Chromosom 16p13.1 lokalisiert und besteht aus 1503 Aminosäuren. Im Vergleich mit anderen MRP-Isoformen ist wenig über MRP6 bekannt. Dies gilt besonders für seine physiologische Funktion als auch auf sein Potential im Hinblick auf eine mögliche Wirkstoff-Resistenz. Es ist wahrscheinlich, dass MRP6 auf eine besondere Weise MRP1 unterstützt oder sogar unbedingt für dessen Funktion notwendig ist, da es in Zelllinien mit starker Überexpression von MRP1 gefunden wurde. In Leber und Niere wurden die weitaus höchsten Konzentrationen von MRP6 gefunden. In aktuellen Forschungsarbeiten wird MRP6 als ein Transporter von GSH- Konjugaten beschrieben (Belinsky et al., 2002; Haimeur et al, 2004). MRP4 und -6 sind nicht an einer Resistenz gegenüber Antitumor-Medikamenten beteiligt.

MRP7 (ABCC10)-Transkripte, deren Gen auf Chromosom 6p12-21 lokalisiert ist, sind nur gering in verschiedenen humanen Geweben exprimiert. Das Gen codiert ein 158 kDa Protein mit 1492 Aminosäuren und zeigt größere Identität in seiner Protein-Topologie gegenüber MRP1, 2, 3 und 6 (Hopper et al., 2001). Über die Funktion des MRP7 ist bis heute wenig bekannt.

MRP8 (ABCC11) und MRP9 (ABCC12) wurden erstmals durch Computer-gestützte Screening-Tests als die achte und neunte Isoformen identifiziert. Diese Gene sind auf Chromosom 16q12.1 lokalisiert. Da eine signifikante Erhöhung der Expression von MRP8 und 9 mRNA im Brustkrebsgewebe gegenüber Normalgewebe festgestellt wurde, wurde es angenommen, dass MRP8 und 9 Proteine potenzielle molekulare Ziele bei der Brustkrebsbehandlung darstellen könnten. Die strukturelle Merkmale des Gens und der mRNA als auch die Gewebeverteilung müssen noch aufgeklärt werden. Bisher stehen nur spärliche Informationen über die Proteine zur Verfügung, die von ABCC11 und ABCC12 codiert werden (Yabuuchi et al., 2001; Tammur et al., 2001; Bera et al., 2002). Die mögliche Rolle dieser Transporter beim Xenobiotika-Transport ist noch unklar.

Zielsetzung der Arbeit

Die regulierenden Faktoren für MRP Expression und Funktion im Lungenepithel sowie die topographische Verteilung der verschiedenen MRP-Isoformen sind weitgehend unbekannt. In mehreren Untersuchungen wurden die Expression und Regulation von MRP-Proteinen in verschiedenen humanen Geweben untersucht und verschiedene exogene und endogene Faktoren als Induktoren dieser Xenobiotika-Toleranz vermittelnden Proteine erkannt. Die Expression in Lungenzellen ist weniger gut untersucht, was an der Schwierigkeit der Kultivierung und der Zellausbeute humaner Lungenzellen liegen kann. Weiterhin wurden die Experimente an Lungenzellkulturen kaum an unter in vivo-ähnlichen physiologischen Bedingungen einer mehrwöchigen Insertkultur durchgeführt.

Der erste Teil dieser Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der variablen Expression der Multidrug Resistance assoziierte Proteine (MRP) in humanen Lungenzellen leisten. Untersuchungen zu folgenden Punkten wurden durchgeführt.

- Demonstration der Expression und zelluläre Lokalisation der MRP1-5 Isoformen in humanen Lungenzellen in Kultur
- Etablierung einer Methode zur Kultivierung von normalen humanen Bronchial-epithelzellen (NHBEZ) sowie peripheren Lungenzellen (PLZ) in einem System, welches eine feuchte, dem Medium zugewandte und eine trockene, der Luft zugewandte Oberfläche ermöglicht. Dieses System würde Bedingungen aufweisen, welche sich viel näher an den Verhältnissen im menschlichen Körper orientieren als es mit klassischen „untergetauchten“ Kulturen möglich ist. Diese Methode ist eine Spezialmethode für Lungenepithelzellen, welche eine Möglichkeit der Aufrechterhaltung und Wiedergewinnung der Morphologie und lungenspezifischer biochemischer Funktionen bietet.
- Demonstration der intrazellulären Verteilung von MRP1 und 2 in humanen Lungenzellen *in vitro* mittels immun-histochemischer Analyse mit LASER-scanning Mikroskopie unter verschiedenen Kulturbedingungen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Transport-Aktivität des MRP1 sowie der mögliche Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von Glutathion und der MRP-Transportfunktion untersucht. Zur Klärung der oben genannten Fragestellungen sind folgende Untersuchungen notwendig:

- Etablierung eines nicht-invasiven Fluoreszenzassay zur Beobachtung der Transportaktivität von MRP1.

- Glutathion ist ein körpereigenes Tripeptid, bestehend aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutaminsäure. Es spielt in der Steuerung von Oxidation im Gewebe eine zentrale Rolle und wirkt ähnlich wie die Vitamine C und E als Antioxidanz und Neutralisator gegenüber aggressiven freien Radikalen (Siems et al. 1996; Ohlenschläger 1991). Es gibt deutliche Hinweise, dass die MRP1- Transportaktivität in engem Zusammenhang mit dem Glutathion-System der Zelle steht. Deshalb war es ein Ziel der Arbeit den Einfluß von Glutathion auf die Transportaktivität in humanen Lungenzellen zu untersuchen. Dazu wird der Glutathion-Gehalt der Zelle mittels Glutathion-Pool-Regulatoren moduliert wie z.B. durch Buthionin-Sulfoximin (BSO) und N-Acetylcystein (NAC).

a) BSO ist ein hochspezifischer Inhibitor der Gamma-glutamyl-cysteinsynthetase und senkt somit den Glutathionpegel in der Zelle.

b) NAC ist eine Vorstufe in der Bildung von Glutathion, die zur Anhebung des GSH-Gehaltes führt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkulturen

Tumorzelllinien

Die Zelllinien A549, H358 und H322 (humane Lungentumorzellen) wurden von Professor Wiebel, Institut für Toxikologie, Gesellschaft für Strahlenforschung, München zur Verfügung gestellt. Ursprung der A549 Zellen (+p-53) war ein Adenokarzinom der Lunge. Die Zelllinie H358 stammt von einem nicht-kleinzelligen Lungentumor. Dabei handelt es sich um Alveolar-Typ II Zellen, die p-53 negativ sind. Ebenfalls von einem nicht-kleinzelligen Lungentumor stammen die Zellen der Linie H322. Vom Zelltyp her handelt es sich um Clara-Zellen (nicht ziliertes Bronchialepithel) mit einer endogenen Mutation im Tumorsuppressor p-53.

Normale humane Bronchialepithelzell- und Lungenzellkulturen

Zur Gewinnung von humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und von Lungenzellen (PLZ) wurden humane Bronchusresektate und Lungengewebsresektate tumorfreier Regionen von Lungenteilresektionen verwendet. Die Patienten wurden aus Krankenhäusern der Umgebung von Halle an das Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität (Herz-Thorax-Chirurgie, Prof. Silber, Dr. Hofmann) zur Operation aus klinischer Indikation überwiesen. Der Gewebegewinn zum Anlegen der Kulturen erfolgte aus Resektaten, die nach Gesichtspunkten der Tumorchirurgie entfernt wurden (keine gezielte Gewebsentnahme für Versuche). Alter, Geschlecht, Einnahme von Medikamenten, Rauchgewohnheiten, berufliche Exposition und andere Besonderheiten waren keine Ausschlusskriterien. Die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Halle für die Nutzung der Proben zu Forschungszwecken liegt vor.

2.1.2. Chemikalien und Biochemikalien

Zellkulturreagenzien

AECG-Medium

Promo Cell, Heidelberg

DMEM Trockensubstanz

Gibco, Berlin

Fetales Kälberserum	Promo Cell, Heidelberg
Fibronektin	Sigma, Steinheim
Kollagen Typ I Rattenschwanz	Serva, Heidelberg
L15-Leibovitz Puffer	Biochrom, Berlin
PBS Instamed	Biochrom, Berlin
Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin

Chemikalien für die Charakterisierung des MDR1- und MRP1 vermittelten Transports

Rhodamin123 (MDR1-Substrat) wurde von Sigma und 5,6-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF)(MRP1-Substrat) von Molecular probes bezogen.

Chemosensitizer

Der Inhibitor des MRP1-vermittelten Transports, MK571, wurde von Biomol zur Verfügung gestellt. Verapamil wurde von Sigma bezogen.

Glutathion -Pool- Modulatoren

Der Inhibitor der gamma-Glutamylcystein Synthetase Buthionin-Sulfoximin (BSO) und der Glutathion-Precursor N-Acetylcystein (NAC) wurden von Sigma zur Verfügung bezogen

2.1.3. Antikörper

Nachweis von Multidrug resistance Related Proteinen MRP 1-5

Primärantikörper Als Primärantikörper wurden die polyklonalen, affinitätsgereinigten (MRP2-5) Antikörper gegen MRP1-5 (Santa Cruz Biotechnology) eingesetzt. Diese in Kaninchen (MRP1) und in Ziege (MRP2-5) generierten Antikörper sind gegen bestimmte Peptidsequenzen gerichtet. Die Antikörper gegen MRP1 wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit einem, den Aminosäuren 1-70 des N-Terminus des humanen MRP1 korrespondierenden, rekombinanten Protein gewonnen. Die Antikörper gegen MRP2-5 wurden durch Immunisierung von Ziegen mit einem, einer Teilsequenz in der Nähe des N-Terminus der humanen MRP2-5 entsprechenden Peptid, gewonnen.

Sekundärantikörper Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-gekoppelter anti-rabbit IgG-Antikörper (MRP1) oder Cy3-gekoppelte anti-rabbit (MRP1)/anti-goat (MRP2-5) IgG-Antikörper verwendet.

1.1. **Cy3** (Indocarbocynin) wird bei 550 nm maximal angeregt; das Emissions-Maximum liegt bei 570 nm. Damit kann dieser extrem leuchtintensive (100fach stärker als FITC) und photostabile Farbstoff bei der Fluoreszenz-Messung (Zeiss-Fluoreszenzmikroskop mit 100 Watt Lampe) verwendet werden.

FITC(Fluorescein-Isothiocyanat) wird maximal bei 492 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Ein Nachteil von FITC ist seine Eigenschaft auszubleichen (Fading). Das Zeiss- Fluoreszenzmikroskop wurde für die Registrierung der zellulären Fluoreszenz verwendet.

2.1.4. Geräte und Verbrauchs-Materialien

Autoklav	Autoklav 3.021	Schütt, Göttingen
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus-Instrument
Filterpapier	2668/8, 2043b MGL	Amersham, Braunschweig
Mikroskope	Axiovert 25	Zeiss, Jena
	Axioskop 20 mit Fluoreszenz-Lampe 100 Watt	Zeiss, Jena
	Invers-Fluoreszenzmikroskop	Nikon
	Confocal LASER Scanning Mikroskop:TCS-SP Leica Mikroskop	Wetzlar, Deutschland
Kamera	Digital-Kamera	Nikon, Japan
Küvetten	optische Glass-Küvetten 1,5 ml	Hellma
Monochromator	MuLTIScan 2, Xenon Lamp power Supply Mod 35/75, Sperrfilter für Rhodamin 123	Amko LTI
Photometer	Fluoreszenz-Inversmikroskop mit Fluoreszenz-Objektiv; Amplifier AFX-DX	Nikon, Japan
	Photometer DU 7500	Beckman, München
Röhrchen	Polypropylen mit Schraubdeckel 15-50 ml	Sarstedt, Nürnberg
	Eppendorf-Röhrchen 2 ml	Eppendorf, Hamburg

<i>Sterilbank</i>	HERA-safe	Heraeus-Instrument
	HERA-safe H12	Heraeus-Instrument
<i>Sterilfiltration</i>	Filter Sartolab-P-plus (0,2-0,45µm)	Sartorius AG, Göttingen
<i>Waage</i>	Analysenwaage Bp 211D	Sartorius, Göttingen
<i>Wasserbad</i>	GFL 1083	Gesellschaft für Labor- Technik, Burgwedel
<i>Zellkultur</i>	Kulturschalen, Kulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
	Borosilikat „cover-glasses“	Nunc, Wiesbaden
	Einmal-Sterilglasspipette: 1,5 und 10ml	Nunc, Wiesbaden
	Fuchs-Rosenthal-Kammer	Brandt, Deutschland
	CappAero-Pipette 0,5-5000µl	CAPP, Dänemark
<i>Zentifuge</i>	Biofuge fresco	Heraeus-Instrument

2.2. Methoden

2.2.1. Sterilisation von Materialien und Lösungen

Einmalartikel für die Zellpräparation, sowie Zellkultur, wurden steril verpackt gekauft. Hitzebeständige Glas- und Plastikmaterialien, sowie Lösungen, wurden durch 25-minütiges Autoklavieren bei 120°C sterilisiert. Nicht hitzebeständige Lösungen wurden sterilfiltriert. Die eingesetzten Sterilfilter (0,45µm oder 0,2µm Porenweite) richteten sich nach Sterilitätsgrad und Konsistenz der Lösungen.

2.2.2. Splitten und Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzellen wurden in 58 cm² Kulturflaschen im DMEM (Dulbeccos's minimal essential medium) mit 10 % FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 20.000- 30.000 Zellen pro cm². Das Kulturmedium wurde dreimal in der Woche erneuert. Bei Erreichen von 80% konfluentem Wachstum (etwa alle 7-10 Tage) wurden die Zellen abgelöst und subkultiviert,

nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Tumorzellen mit 10ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin / 0,02% EDTA; in PBS) 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50ml Falcon-Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 min bei 4°C, zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und die Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Tumorzellen wurden im 80%-igen subkonfluenten Wachstumsstadium in die Versuche eingesetzt.

PBS: NaCl (139 mM); KCL (2,68 mM); Na₂HPO₄ (8,2 mM);
KH₂PO₄(1,47 mM); pH 7,4

2.2.3. Isolation und Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen und Lungenparenchymzellen

Durch Vorarbeiten von Herrn Thomas Stock (Etablierung der Kultivierungs-Methode und Frau Dr. Dorothee M. Runge (erste Anwendungsversuche), wurde die Methode der Kultivierung normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und peripherer Lungenzellen (PLZ) (modifiziert nach Lechner und La Veck, 1985) im Institut für Umwelttoxikologie etabliert.

Die Bronchus- und Lungen-Resektate stammen von Lungenteilresektionen. Sofern ein Tumor den Resektionsgrund darstellte, wurde nach pathologischer Begutachtung nur gesundes Gewebe distal des tumorösen Bereiches gewählt. Die Organstücke wurden nach der Entnahme mehrmals mit kalter PBS-Lösung gewaschen und gekühlt in L-15-Puffer (als Transportmedium) transportiert. Der Bronchusbaum wurde vom übrigen Lungengewebe mechanisch, mittels Scheren und Pinzetten, unter sterilen Bedingungen getrennt und gesäubert. Der Bronchus und das Lungengewebe wurden in ca. 0,2-0,5 cm² große Stücke geteilt. Die Gewebestücke wurden auf mit Kollagen 2%, Fibronectin 1% und Rinderserumalbumin 0,1% in L15-Medium beschichteten Kulturschalen ausgebracht. Nach einer Antrocknungszeit von 5 Minuten wurde serumfreies Medium hinzugegeben. NHBEZ sowie PLZ wurden in AECG-Medium (0,4% Rinderhypophysenextrakt; 0,5 ng/ml EGF; 5 µg/ml Insulin; 0,5 µg/ml Hydrocortison; 0,5 µg/ml Epinephrin; 6,7 ng/ml Triiodothyronin; 10 µg/ml Transferrin; 0,1 ng/ml Retinolsäure) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Nach 2-3 Wochen zeigte sich eine subkonfluente Kultur mit ca. 80-90% Bedeckung (1. Generation). Die Gewebestücke konnten zum Auswachsen weiterer Generationen mehrmals auf neue Kulturschalen umgesetzt werden, Zell-Monolayer konnten

enzymatisch abgelöst und passagiert werden. Zum Ablösen der Zellen beim Passagieren wurde der Detach-Kit (Promo Cell, Heidelberg) verwendet.

2.2.4. Zellkulturmedien DMEM und AECG

- a) **DMEM:** Dieses für die Tumorzelllinien verwendete Medium enthält als Grundlage Dulbecco's modified Eagle's medium, welchem 3,7g Natrium-Bicarbonat je 1l Medium zugegeben wird. Nach Einstellung auf einen pH-Wert von 7,4 wurde das DMEM steril filtriert und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurden 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) (10,000 I.E./ml) und 10% FKS (v/v) hinzugegeben.
- b) **AECG:** Als Kultivierungsmedium für NHBEZ und PLZ wurde AECG-Medium (Airway Epithelial Cell Growth Medium, Promo Cell) eingesetzt. Zum Grundmedium wurde der mitgelieferte Supplement-Mix unter sterilen Bedingungen hinzugegeben und bei 4°C gelagert.

Supplement-Mix: BPE (0,4%), epidermaler Wachstumsfaktor (0,5 ng/ml), Insulin (5µg/ml), Hydrocortison (0,5 µg/ml), Epinephrin (0,5 µg/ml), Triiodothyronin (6,7 ng/ml), Transferrin (10µg/ml), Retinolsäure (0,1 ng/ml).

Vor Verwendung wurden alle Medien auf 37°C erwärmt.

2.2.5. Kultivierung von NHBEZ und PLZ auf Membran-Inserts

Um den Einfluß von Kulturbedingungen zu untersuchen wurden die Zellen zusätzlich zu klassischen Bedingungen auf Membran-Inserts (petriPERM - Vivascience) ausgesät. Eine Zellkulturschale mit gasdurchlässigem Boden petriPERM ist die Gewebekulturschale mit einem 25 µm dicken gasdurchlässigem Folienboden. Die Zellen wachsen direkt an der Grenze zwischen gasförmiger und flüssiger Phase, wo das Kulturmedium nicht als Diffusionsbarriere wirken kann. Daher ist eine optimale CO₂- und O₂- Versorgung der Zellen möglich. Die Gasdurchlässigkeit des Folienbodens in petriPERM bietet den enormen Vorteil, dass Zellen einerseits direkt mit Sauerstoff versorgt werden und andererseits Stoffwechselprodukte, wie z.B. CO₂, entweichen können. Durch die extrem kurzen Diffusionswege ist ein optimaler Gasaustausch gewährleistet.

Die Inserts besitzen als Boden eine Membran, welche Löcher mit einem Durchmesser von $0,4\ \mu\text{m}$ aufweisen. Diese Inserts gefüllt mit Zell-Medium-Suspension oder Gewebestückchen-Medium werden vorsichtig in eine Medium- gefüllte Kulturschale gestellt, so dass auch Medium von der unteren Seite die Membran umschließt. Nach zwei Tagen sind die Zellen an der Membran bereits festgewachsen, so dass das Medium im Insert entfernt werden kann. Somit weisen die Kulturen eine apikale, der Luft zugewandte Oberfläche auf, während sie durch die Membran (basal) mit Medium versorgt werden (**Abb. 5.**).

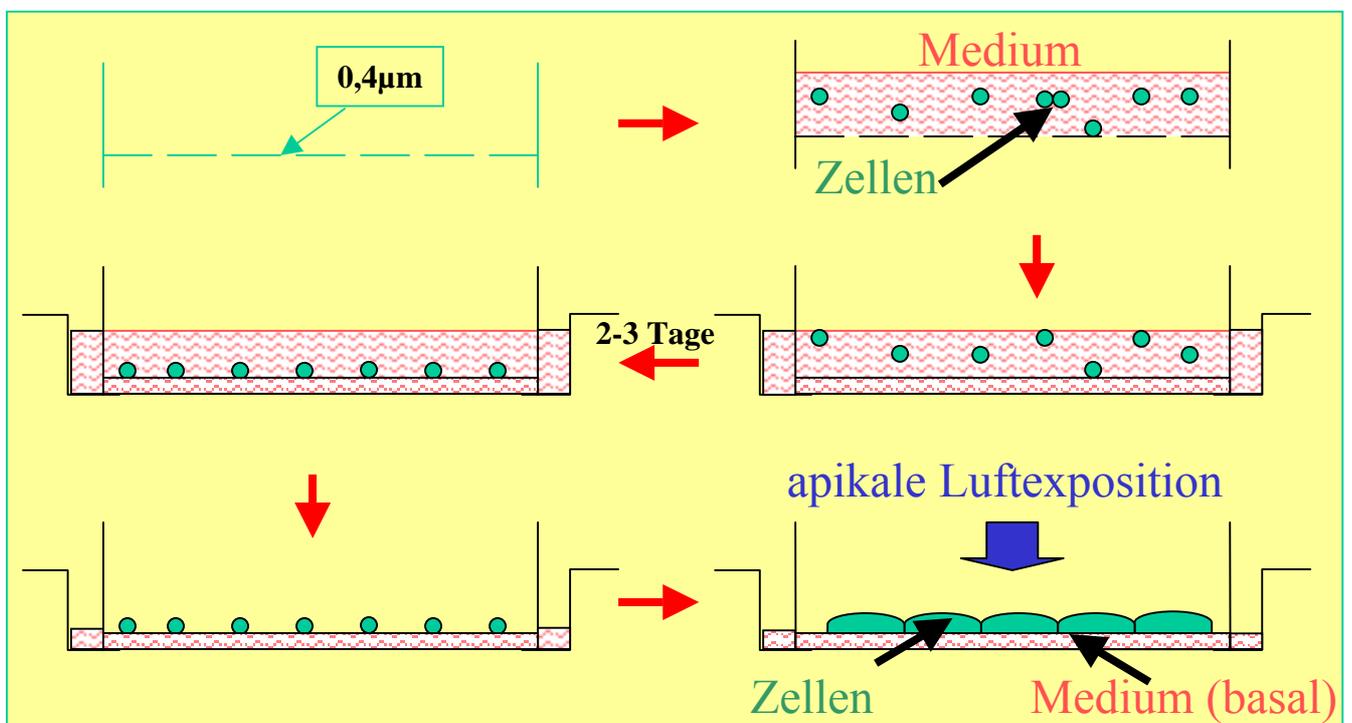
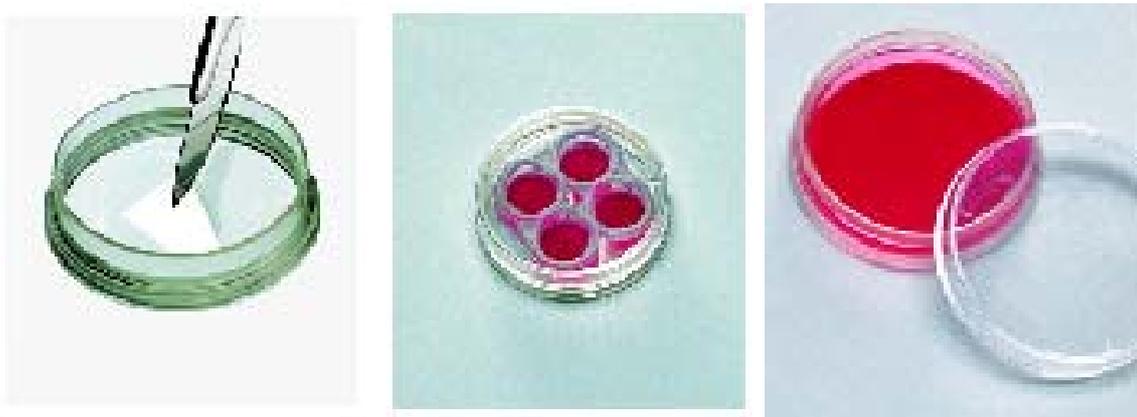


Abb. 5. Schema der Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen auf Membran-Inserts.

2.2.6. Charakterisierung der NHBEZ- und PLZ- Kulturen kultiviert auf Membran-Inserts

Die Charakterisierung der normalen Lungenepithelzellkulturen erfolgte mittels immunohistochemischer Methoden. Dazu wurden die Kulturen mittels Antikörper gegen folgende Antigene untersucht:

- Desmin (ein Protein im glatten Muskelgewebe),
- SMA (ein Protein für Fibroblasten) und
- Vimentin (ein Protein in mesodermalen Zellen).

Die Zytokeratine 7 und 8/18 wurden zum Nachweis des epithelialen Charakters einbezogen (Frau Dr. C. Taege, Institut für Pathologie).

Die Zellen wurden auf Membran-Inserts (Vivascience) kultiviert. Nach Fixierung mit 70% igem Ethanol (5 min), erfolgten die Inkubationen mit den primären (50 min, RT) und den Biotin –gekoppelten sekundären Antikörpern (30 min, RT). Zur Visualisierung wurden die Zellen mit Avidin-Biotin Komplex-Reagenz (30 min, RT) und Aminoethylkarbazol inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hematoxilin-Gegenfärbung. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit PBS gewaschen.

2.2.7. Vitalitätstest

Die Zellen benötigen nach der Aussaat eine gewisse Zeit für die Konditionierung des Kulturmediums und um ihren Stoffwechsel wieder voll zu aktivieren. Man nennt diese Phase, in der kaum Zellteilungen zu beobachten sind, die Anlaufphase (lag-Phase). Nach der Anlaufphase erreicht die Teilungsrate einen gleichmäßigen Wert, und die Kultur geht in eine exponentielle Phase des Wachstums über (log-Phase). Mit dem exponentiellen Wachstum nimmt nicht nur die Anzahl der Zellen zu, sondern nehmen auch die Substrate in dem Nährmedium ständig ab. Der pH-Wert verschiebt sich durch die Anhäufung saurer Metabolite in den sauren Bereich. Das Wachstum der Zellkultur nimmt durch diese Stoffwechselprodukte und durch gegenseitige Beeinflussung der Zellen ab.

Zum Nachweis der Zytotoxizität werden verschiedene Kriterien an den Zellen beurteilt, aufgrund der Aussagen über Zellschädigung oder Zelltod gemacht werden können. Dazu gehören z.B. Zellmorphologie, Zellvitalität, Zellproliferation, Membranschädigungen, Aufnahme bzw. Inkorporation von radiaktiven Substanzen und Stoffwechselektivität (Knox et al., 1986).

In dieser Arbeit diente der MTT-Test als Zellvitalitäts- und Zytotoxizitäts-Indikator nach Exposition zu den verwendeten Testsubstanzen (Carmichael et al., 1987a,b; Gerlier und Thomasset 1986; Moosmann, 1983; Vellonen et al., 2004). Dieser Test basiert auf der Umwandlung des schwach gelben 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromids (MTT) durch zelluläre Dehydrogenasen zum dunkelblauen, wasserunlöslichen Formazan. Die Farbstoffbildung ist zur Aktivität der Dehydrogenasen und zur Überlebensrate der Zellen proportional. Hierbei kann aber nicht zwischen der Gesamtreaktion einer Zellpopulation und der Reaktion einzelner Zellen der Population unterschieden werden. Nach Abnahme des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen mit MTT-Lösung (0,7 mg in PBS) für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dem Entfernen der Überstände und dem zweifachen Spülen mit PBS, folgten das Lösen des gebildeten blauen Formazan aus den Zellen mit einem Gemisch aus Isopropanol/Ameisensäure (19:1). Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde die photometrische Bestimmung des Formazans bei 570 nm gegen Isopropanol/Ameisensäure durchgeführt. Die Versuchsansätze wurden als Dreifachbestimmungen angesetzt. Alle genutzte Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen ausgetestet, um subtoxische Bereiche zu ermitteln (relative Vitalität > 80%).

2.2.8. Immunchemischer Nachweis von MRPs in Lungenzellkulturen

Zum Nachweis von Multidrug Resistance Associated Proteine (MRPs) als zelluläre Proteine in humanen Lungen wurden normale humane Lungenzellen (NHBEZ und PLZ), sowie humane Lungentumorzellen (A549) auf sterilen Deckgläschen kultiviert, die bei NHBEZ Collagen- und Fibronectin- (3 mg Collagen + 1 mg Fibronectin / 100 ml L15-Medium) beschichtet worden waren. Nach 7-14 Tage (Mediumwechsel dreimal in der Woche) wurde die Fixierung durchgeführt. Die Zellen wurden nach Spülen mit PBS zum gewünschten Zeitpunkt für 5 min in -20°C kaltem Methanol inkubiert und nach Methanol-Absaugen anschließend 5 min luftgetrocknet. Die so fixierten Zellen konnten bei -20°C gelagert werden.

Vor Inkubation der Deckgläschen mit den primären polyklonalen Antikörpern wurden die Proben zunächst durch leichtes Schwenken in PBS rehydriert und für 5 min in Permeabilisierungslösung 0,1% Triton-X-100 in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präparate wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann für 20-30 min in Blockpuffer bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Hintergrundreaktionen zu reduzieren. Nach Überführung der Deckgläschen in eine feuchte Kammer wurden diese mit 50-75 µl

antikörperhaltiger Lösung überschichtet und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend kurz in PBS gespült und dann bei Raumtemperatur 4-5 mal unter Schütteln mit PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein 1:300-500 in Blockpuffer verdünnter FITC-gekoppelter anti-rabbit IgG-Antikörper / CY3-gekoppelter anti-goat IgG-Antikörper verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Die Deckgläschen wurden anschließend, wie oben angegeben, erneut mit PBS gewaschen. Alle Proben wurden nach dem Färben bei 4°C bis zur mikroskopischen und mikrographischen (Nikon-Digital Kamera) Auswertung gelagert. Die Auswertung der Proben erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

Als Primärantikörper wurden verwendet:

- Anti-MRP1 200 µg IgG/ml PBS (Santa Cruz Biotechnology),
 1:100 in 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin), 1,5%
 normal goat serum (Blockpuffer) in PBS verdünnt

- Anti MRP2, 3, 4 und 5 200 µg IgG/ml PBS (Santa Cruz Biotechnology),
 1:100 in 0,5% BSA, 1,5% normal rabbit serum
 (Blockpuffer) in PBS

2.2.9. Laser Scanning Confocal Mikroskopie

Laser, Light Amplification by Simulated Emission of Radiation, ist für biologische Anwendungen seit den frühen achtziger Jahren entwickelt worden. Mit Laser können genaue Regionen erreicht werden, und dadurch ist es möglich, Zellen in verschiedenen optischen Schichtebenen abzutasten. Das Verfahren Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM), auch gekennzeichnet als Confocal Scanning Laser Microscopy CSLM oder Abtastung-Lasermikroskopie Confocal, wird jetzt als wertvolles Werkzeug für das Erreichen der hohen Auflösungsbilder und der 3-D Rekonstruktionen einer Vielzahl von biologischen Probestücken, vor allem von Zellen, eingesetzt.

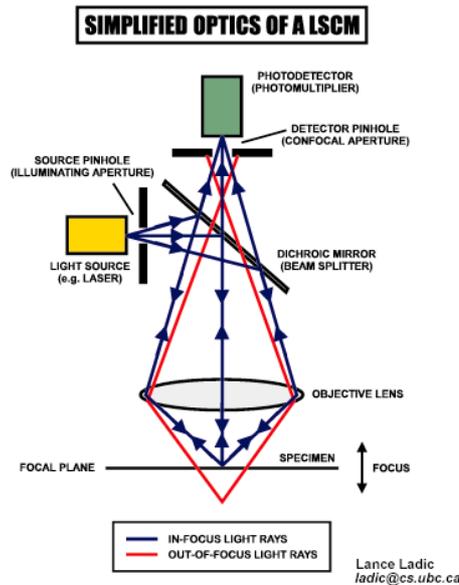


Abb. 6. Confocal-Laser Scanning Mikroskopie

Die Schlüsselgrundregel von Laserabtastungsmikroskopie ist, daß die Probe mit einem fokussierten Punkt des Laserlichts belichtet wird und das Bild aufgebaut wird, indem man den Punkt über dem Gesichtsfeld ablichtet. Dadurch wird eine große Flexibilität in der Strategien zur Erregung von Bildern erreicht. Insbesondere ermöglicht es, optische Abschnittsbilder zu bekommen, in denen Störlicht nicht zum Bild beiträgt, weil es heraus fokussiert werden kann. Optische Abschnittsbelichtung hat eine breite Anwendung in der Mikroskopie bekommen und die Produktion von 3D Projektionsebenen begründet (Abb.6).

Confokal-LASER-Scanning Mikroskopie zur intrazellulären Lokalisierung von MRP1

Wie im Abschnitt Ergebnisse dargestellt ist, waren MRP1 und MRP2 im zwei-dimensionalen Raum im Membranbereich sowie intrazellulär exprimiert. Nun war es von großem Interesse herauszufinden, wie sich die Lokalisierung von MRP1, 2 unter verschiedenen Kulturbedingungen im Raum verhält. Daher präparierten wir NHBEC Zellen, kultiviert auf Borosilikat sowie auf Membranen erneut mit einem Fluoreszenzfarbstoff (CY3) wie unter 2.2.9. beschrieben. Die Expression von MRP1 wurde in diesen Kulturen durch confokale LASER-Scanning-Mikroskopie untersucht. Die zelluläre Verteilung von MRP1 und MRP2 wurde mittels Immunfluoreszenz mit dem Farbstoff Cy3 an NHBEZ bestimmt. Das Fluoreszenzsignal wurde mit TCS-SP Leica Mikroskop (Wetzlar, Deutschland) (Exzitation = 568 nm Argon LASER Line, Emission im Sperrfilterbereich von (576-640 nm) sichtbar gemacht.

2.2.10. Studie zur MDR-1 und MRP-1 abhängigen Transport-Aktivität

Zur Beobachtung der funktionellen Transport-Aktivität von MDR1 wurden Influx- und Effluxstudien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-123 (Rho-123) an vitalen Zellen durchgeführt. Rho-123 ist ein spezifisches Substrat für MDR-1 (Twentyman et al., 1994). Es

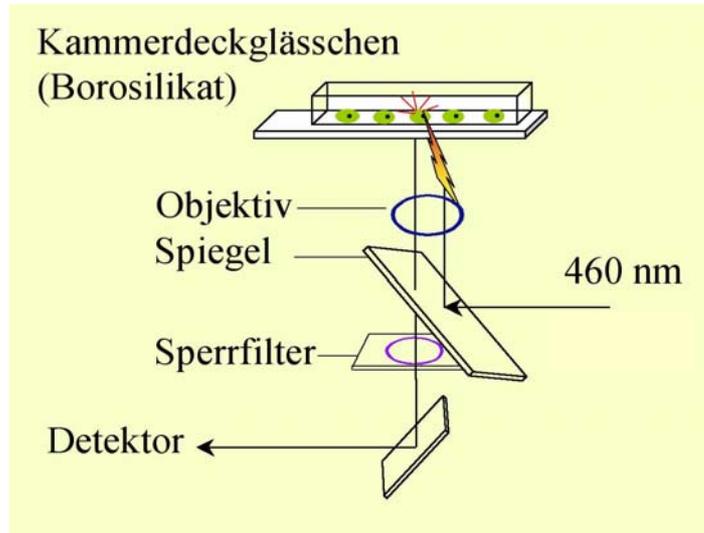


Abb. 7. Funktionsnachweis von MRP-1 mittels Einzelzellfluoreszenzmessung

diffundiert passiv durch die Zellmembran und wird in den MDR-1 positiven Zellen durch aktiven Efflux (MDR-1 Transport) aus der Zelle in den extrazellulären Raum transportiert. Die spezifische Hemmung der MDR-1 Transportaktivität und damit Verminderung der intrazellulären Konzentration von Rho-123 erfolgte mit dem MDR-1-Inhibitor Verapamil (Neyfakh 1988; Lampidis et al., 1985) (10 µg/ml). Der spezifischen Transport von Rho-123 durch MDR-1 wurde durch weitere Studien, die eine spezifische Bindung von Rho-123 an das P-Glykoprotein zeigten, untermauert (Nare et al., 1994). Influx- und Efflux-Studien zeigten eine Korrelation zwischen der MDR-1, und Hemmbarkeit durch Verapamil.

Zur Untersuchung funktionellen Transport-Aktivität von MRP-1 wurde dieselbe Versuchsanordnung wie zur MDR-1-Funktionsprüfung verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff, welcher durch MRP-1 transportiert wird, ist 5,6-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (Courtois et al., 1999) (CDF 4 µg/ml, Molecular probes). Das CDF hat in seiner Eigenschaft als Fluoreszenzfarbstoff ein ähnliches Spektrum wie Rho-123 (Lehmann T. et al, 2001) . Die spezifische Hemmung der MRP-Transportaktivität (Gekeler et al.,1995) erfolgte mit dem MRP1-Inhibitor MK-571 (20µg/ml; Biomol). Die Transportstudien wurden nach Lehman T. et al. (2001) an den Lungentumorzelllinien, kultiviert auf Kammerdeckgläschen mit 0,8 mm dünnem Borosilikatglas-Boden (NUNC), mit der Technik der Einzelzellfluoreszenz-Messung am Fluoreszenz-Inversmikroskop durchgeführt. Mit dem Fluoreszenz-Inversmikroskop,

Amplifier AFX-DX und monochromatischem Licht (Exzitation = 460 nm, Emission im Sperrfilterbereich mit einem Maximum bei 490 nm gemessen) wurde Emission des intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffes mit 30 Messungen pro-Sekunde und 10 sec Messdauer durchgeführt. Der Strahlengang des induzierten Fluoreszenzlichtes in den Zellen erfolgte rückwärts über Borosilikatglas, Immersionsöl, Fluoreszenz-Objektiv, Sperrfilter /Reflektions-spiegel und Amplifier. Die Interpretation der Messergebnisse erfolgte rechnergestützt (GEM, DSCAN-Software Amko LTI[®]), wobei für jeden Messpunkt der Absolutwert und Hintergrund durch *linear* fit ermittelt wurden (**Abb.7.**).

2.2.11. Modulation der MRP1-Transportaktivität durch Glutathion - Pool-Regulatoren

Das Glutathion hat in den letzten Jahren an Interesse gewonnen. Seine wirksame Form ist „reduziertes Glutathion“ (G-SH). Es setzt sich aus den Aminosäuren Glutamin, Cystein und Glycin zusammen. Für die Vitalität und Funktionsfähigkeit der Zelle ist Glutathion unentbehrlich. Buthionin Sulfoximin (BSO) ist ein hochspezifischer Inhibitor der Gamma-glutamylcysteinsynthetase und senkt somit den Glutathiongehalt in der Zelle. N-Acetylcystein (NAC) ist eine Vorstufe in der Bildung von Glutathion welcher zur Anhebung des GSH-Gehaltes in den Zellen führt. Adhärente Zellen wurden 24 Stunden vor der 4-stündigen Inkubation mit dem MRP1 Substrat CDF (4µg/ml), mit NAC oder BSO (4 mmol/ml) bei 37 °C in Anwesenheit oder Abwesenheit vom MRP1-Inhibitor MK571 beimpft. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenz-Signale des intrazellulären CDF wurden wie unter 2.2.10 beschrieben gemessen.

2.2.12. Auswertung der durchgeführten Experimente

Die Experimente wurden, wenn möglich, als Dreifachbestimmung unabhängig geführter Kulturen innerhalb verschiedener Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM) dargestellt.

Die Signifikanz der erhaltenen Daten wurde unter Verwendung der ANOVA-Varianzanalyse, des t-Tests nach Student ermittelt. Bei Darstellung der Ergebnisse wurden als Signifikanzniveau *p<0,05 und ** p<0,01 unterschieden.

3. Ergebnisse

3.1. Zellkulturen der verwendeten Lungenzellen

3.1.1. Die Kultur normaler humaner Lungenepithelzellen

Zur Untersuchung der zellulären Verteilung der MRPs dienten kultivierte Lungenzellen, die unter geeigneten Kulturbedingungen differenzieren (**Abb. 8**). Von Patienten, die sich einem thoraxchirurgischen Eingriff in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität unterzogen haben, konnte Gewebe für die Kultivierung an unserem Institut für Umwelttoxikologie der Universität. gewonnen werden. So ist es gelungen mit den Lungenzell-kulturen ein in-vitro Modell für die Humanlunge zu etablieren. Durch die Schaffung spezifischer Kulturbedingungen, wie die Anwendung serumfreier Medien oder die Beschichtung der Kulturschalenoberfläche mit adhärenzoptimierenden Komponenten, wurden die Kulturen von NHBEZ und PLZ optimiert. Zwei bis drei Wochen nach Aussaat stand ein subkonfluenter Zell-Monolayer zur Verfügung.

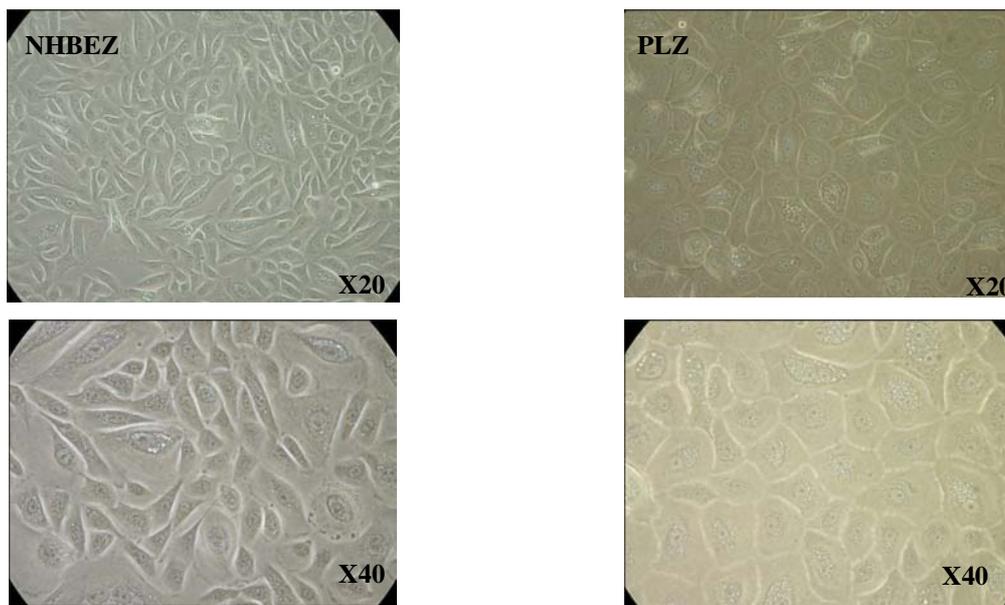


Abb.8. Monolayer der normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und Peripheren Lungenzellen (PLZ) in Phasenkontrastmikroskopie .

3.1.2. Kultivierte Lungentumorzellen als Model der MDR1- und MRPs- Expression / Transport-Aktivität

Als Modell-Kulturen dienten kultivierte Lungentumorzelllinien A549, H358 und H322, die unter geeigneten Kulturbedingungen wachsen (**Abb. 9**).

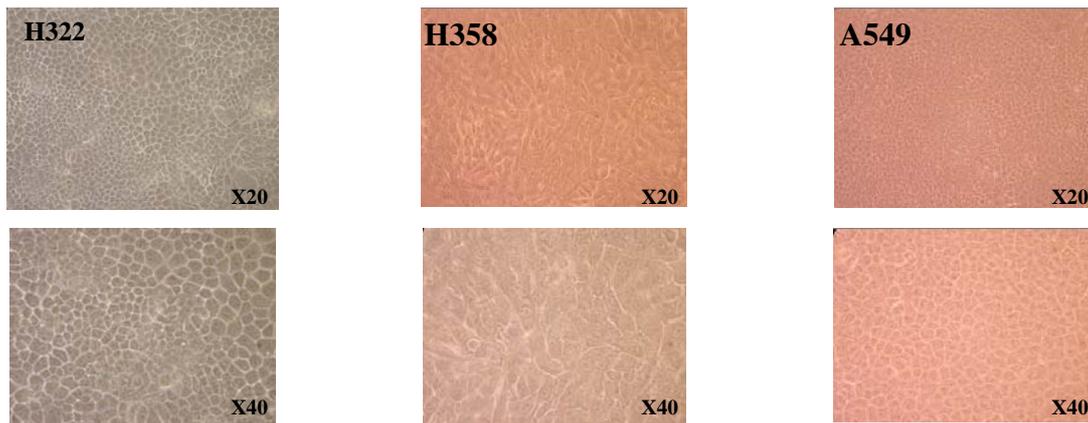


Abb.9. H322: nicht-kleinzelliges Karzinom der Lunge, Clara-Zell ähnlich; H358: nicht-kleinzelliges Karzinom, AII-Zell ähnlich; A549: Adenokarzinom der Lunge.

3.2. Vitalitätstest

Im Rahmen der Experimente zur Transportaktivität wurden die Zellkulturen mit Indikatorfarbstoffen (Rho-123, CDF) oder Inhibitoren des MRP-Transports (Verapamil, MK571) oder Modulatoren des GSH-Gehaltes (BSO, NAC) versetzt. Es war daher notwendig, die Expositionsbedingungen vorab zu klären, um subtoxische Bedingungen sicherzustellen. Alle eingesetzten Substanzen wurden mittels Vitalitätstest getestet, um später in nicht toxischen Konzentrationsbereichen zu arbeiten. Diese Versuche wurden in 24h-Tests durchgeführt. Diese Testzeit überschritt (funktionelle Aktivitätsbestimmung), beziehungsweise entsprach (GSH-Modulation) den später angewandten Inkubationsdauern (**Tab1.**) (**Abb. 10, 11**).

Tab.1.

Substanz	Konzentration/ml	Vitalität bei H322	Vitalität bei H358	Vitalität bei A549
Rho-123	0,5 µg	95,9 ± 1,4	99,9 ± 6,8	95,9 ± 1,4
	1 µg	91,8 ± 5,1	96,2 ± 5,5	91,7 ± 5,1
	1,5µg	59,4 ± 11,2	39,6 ± 7,6	59,3 ± 9,2
CDF	3µg	95,7 ± 2,0	97,2 ± 3,2	97,2 ± 3,08
	4µg	95,6 ± 3,8	95,9 ± 3,1	84 ± 5,9
	5µg	33,5 ± 6,8	29,2 ± 4,1	44,3 ± 10,18
Verapamil	5µg	97,5 ± 3,0	96,7 ± 8,0	98,1 ± 2,2
	10µg	99,4 ± 3,1	95,7 ± 3,5	95,3 ± 3,12
	15µg	59,6 ± 6,6	47,6 ± 5,2	65,4 ± 11,1
MK-571	25µg	98,7 ± 0,3	93 ± 3,6	94 ± 1,31
	30µg	97,9 ± 1,1	92 ± 2,7	94 ± 4,2
	35µg	44,7 ± 5,0	47 ± 2,9	41 ± 6,87
BSO	1mM	92,3 ± 4,7	95 ± 3,3	101,4 ± 1,2
	2mM	99 ± 0,9	93,9 ± 2,0	99,8 ± 1,36
	4mM	85,4 ± 4,6	90,9 ± 3,1	88 ± 4,4
NAC	1mM	97,7 ± 0,6	96,8 ± 1,7	98,4 ± 1,006
	2mM	80,7 ± 0,9	95,3 ± 6,7	96,6 ± 2,35
	4mM	86,7 ± 9,6	90 ± 3,8	91,5 ± 4,13

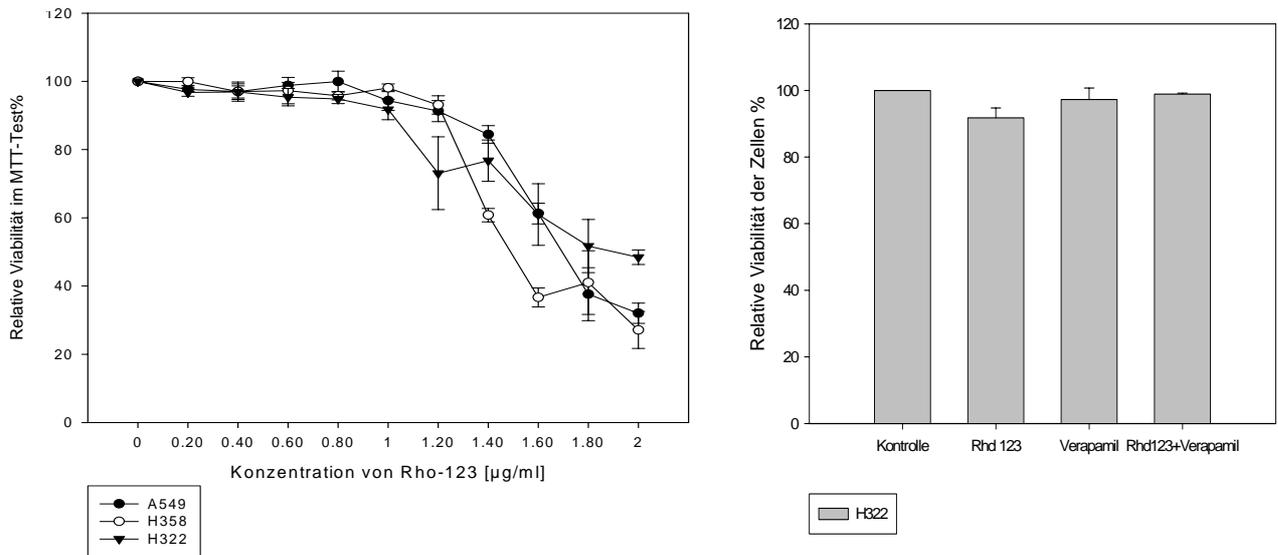


Abb.10. Vitalitätsprüfung des Fluoreszenzfarbstoffs Rho-123 in Lungentumorzellen (A) und Einfluss von MDR-Hemstoffen auf die Vitalitätsprüfung von Rho 123 in H322-Lungentumorzellen. Die Zellen wurden wie in Methoden beschrieben kultiviert. Die Behandlung mit Rho123 erfolgte über 24 h, Verapamil 10 µg/ml wurde parallel mit Rho123 behandelt. Die Vitalität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Gezeigt sind MW \pm SEM, n=3.

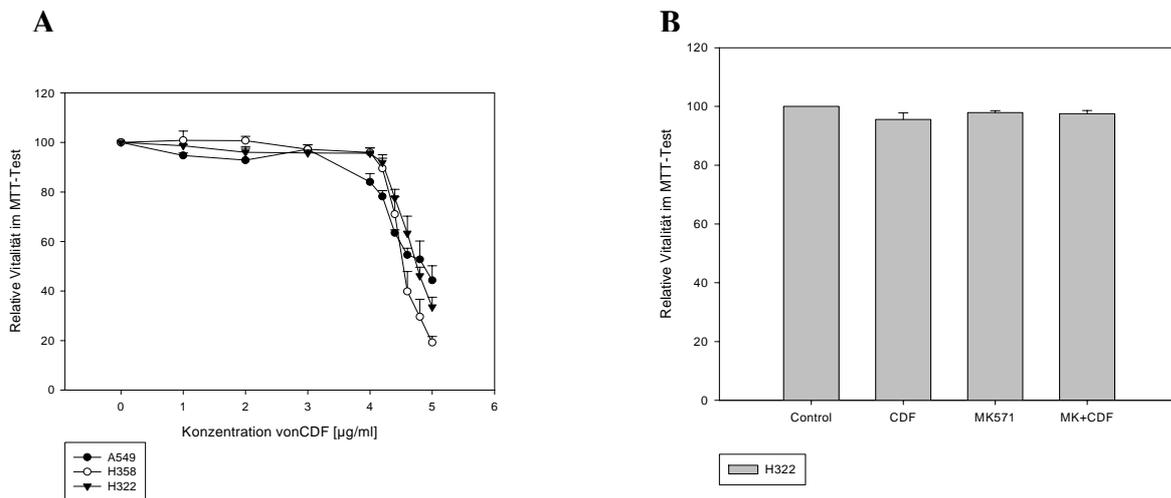


Abb.11. Vitalitätsprüfung des Fluoreszenzfarbstoffs CDF in Lungentumorzellen (A) und Einfluss von MRP1-Hemstoffen auf die Vitalitätsprüfung von CDF in H322-Lungentumorzellen. Die Zellen wurden wie in Methoden beschrieben kultiviert. Die Behandlung mit CDF erfolgte über 24 h, 20 µg/ml MK571 wurde parallel mit CDF dazugegeben. Die Vitalität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Gezeigt sind MW \pm SEM, n = 3.

3.3. Membran-Inserts-Kultursystem

3.3.1. Kultivierung von NHBEZ und PLZ auf Membraninserts

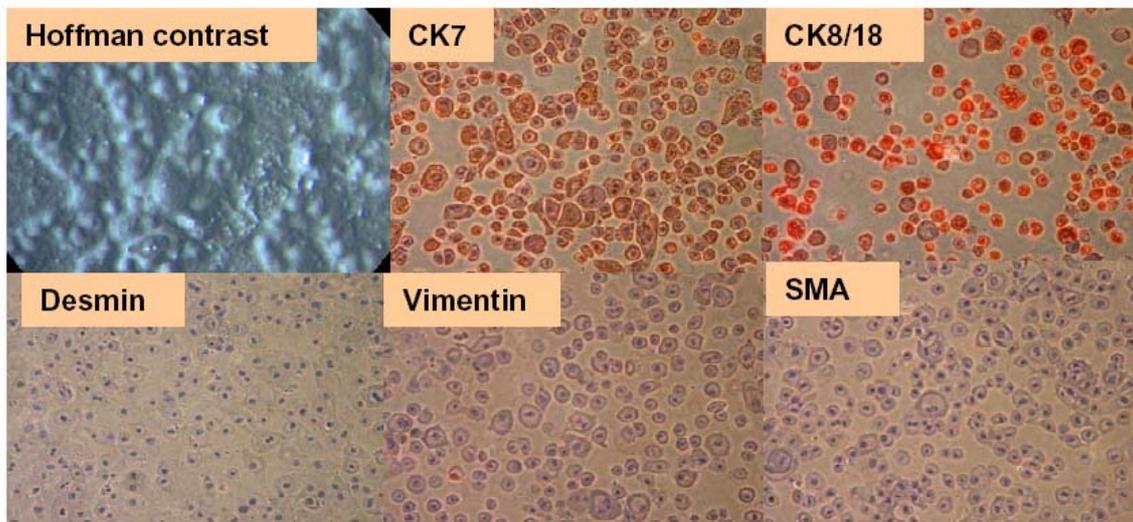
Durch das Auswachsen von Zellen aus den Gewebestücken (1. Generation) oder durch Neuaussaat gesplitteter Zellen bildeten sich auf Filterinserts Inseln subkonfluenter (80-90%) Zellen (1. Passage der 1. Generation). Dreimal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel und die Sichtkontrolle der Kulturen bezüglich Auswachsen der Zellen aus den Resektaten, Wachstum der gesplitteten Zellen sowie Kontamination mit Mikroorganismen und unerwünschter Kowachstum anderer Zellen (z.B. Bindegewebezellen).

Somit stand eine Methode zur Verfügung, primäre Lungenzellen aus Humangewebe zu kultivieren, und unter Erhalten der natürlichen Morphologie sowie ihren lungenspezifischen Funktionen den Ausgangsbedingungen im Patienten so nah wie möglich kommen.

3.3.2. Charakterisierung der NHBEZ- und PLZ- Kulturen

Bei jedem Medienwechsel erfolgte eine mikroskopische Überprüfung der Kulturen. Bereits bei lichtmikroskopischer Sichtung war in den NHBEZ- und PLZ- Kulturen erkennbar, dass es sich um eine einheitliche Zellpopulation mit epitheliale Charakter (Pflasterzellstruktur) handelte. Mit Hilfe immunohistochemischer Arbeitstechniken konnte der epitheliale Charakter der NHBEZ- sowie PLZ- Kultur durch Nachweis von Zytokeratinen belegt werden. **Abb.12.** illustriert dieses Ergebnis. Durch die Detektion von Markern epithelialer Filamentstrukturen des Zytoskelettes, in dieser Arbeit Zytokeratine 7 (CK7) und 8 / 18 (CK8/18) (Moll, 1993), konnte bei positivem Ergebnis für diese Marker der epitheliale Charakter der Zellkultur gezeigt werden. Um eine Verunreinigung der NHBEZ- und PLZ- Kulturen mit Zellen mesenchymalen Ursprunges auszuschließen, wurden Marker für mesenchymale, Intermediarfilamentstrukturen des Zytoskelettes : Desmin (ein Protein im glatten Muskelgewebe), smooth muscle actin (SMA, ein Protein für Fibroblasten) und Vimentin (ein Protein in mesodermalen Zellen) einbezogen. Inkubationen mit Antikörpern gegen diese Antigene waren negativ.

a) PLZ



b) NHBEZ

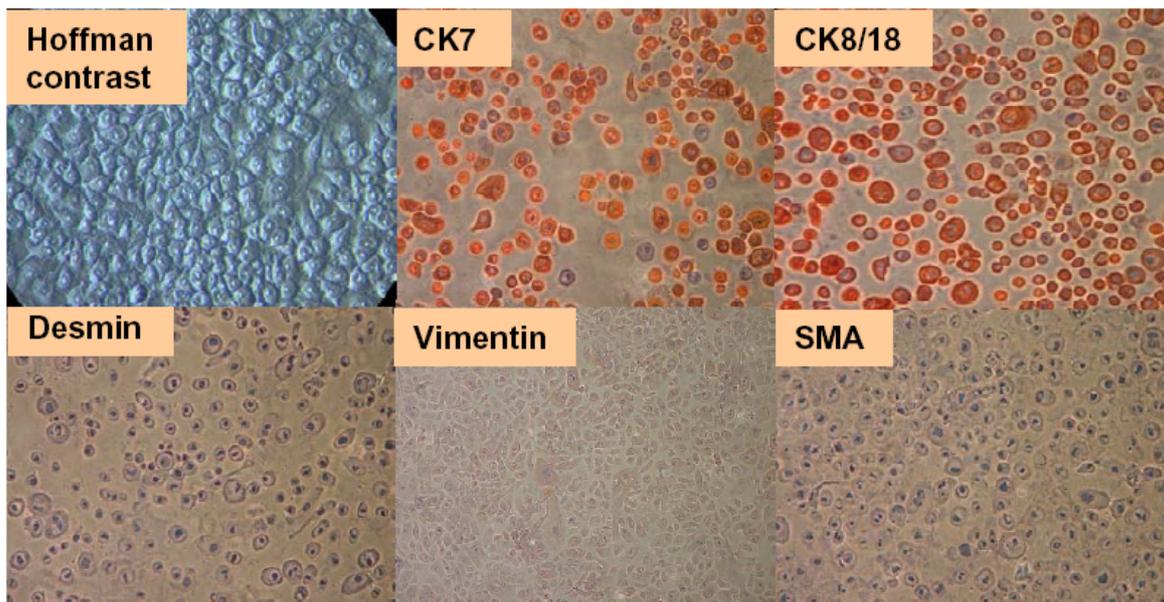


Abb. 12. Charakterisierung von a) PLZ-Kulturen und B) NHBEZ-Kulturen mittels Immun-zytochemie/Hoffman-Kontrast-Aufnahme. Bronchialzellen und periphere Lungenzellen wurden auf Membran-Inserts kultiviert und immunhistochemisch untersucht. Die Hoffman-Kontrast-Bilder zeigen einen epithelialen Monolayer mit Pflasterstruktur polygonaler Zellen. Antikörper gegen die Zytokeratine 7 und 8/18 detektieren epitheliale Strukturen. Der Negativnachweis erfolgte mittels Antikörperfärbung gegen Desmin (Muskelzellen), SMA (smooth muscle actin) und Vimentin (Mesoderm)

3.4. Immunofluoreszenz

3.4.1. Zelluläre Verteilung von MRP1-5

In immunohistochemischen Analysen konnte die MRP1-5 Expression in NHBEZ, PLZ und der Tumorzelllinie A549 nachgewiesen werden (**Abb. 13, 14 und 15**). Um erste Erfahrungen mit der histochemischen Lokalisation der verschiedenen MRP-Isoformen in der Zelle durch Fluoreszenzdetektion zu gewinnen, wurden die ersten Experimente dazu an Zellen der Tumorzelllinie A549 durchgeführt. Alle untersuchten MRP-Isoformen (MRP1 – 5) wurden ausschließlich in der Zellmembran exprimiert gefunden. Eine Aufhebung differenzierter Lokalisation der verschiedenen Isomere in der degenerierten Tumorzelle ist wahrscheinlich. So wurden im nächsten Schritt primäre Bronchialzellen (NHBEZ) untersucht. In diesen normalen Zellen zeigte sich die Exprimierung der untersuchten MRP-Isoformen deutlich differenzierter. So wurden MRP2, 4 und 5 intrazellulär, mit höherer Dichte in intrazellulären Membranen von Vesikeln gefunden, während MRP1 und 3 ausschließlich in der Zellmembran exprimiert erscheinen. Interessant war es nun, die Verteilung der MRP-Isomere in primären peripheren Lungenzellen (PLC) im Vergleich zu den Bronchialzellen zu untersuchen. Es zeigte sich eine Übereinstimmung in der Lokalisation der MRP Isomere zwischen beiden Zelltypen. In den untersuchten Lungenzellen wurden MRP1, 3 und 5 in der Zellmembran und MRP2 und 4 intrazellulär exprimiert gefunden. Eine quantitative Aussage ist mit dieser Analysenmethode nicht zu treffen, da eine Sicherstellung gleichmäßig intensiver Fluoreszenzsignale zwischen verschiedenen Proben nicht möglich ist. Durch das Mitführen von Standardproben als interner Standard wäre zumindest eine semi-quantitative Beurteilung möglich. Die hier verwendete Methode gestattet allerdings den unmittelbaren Vergleich benachbarter Zellen auf einem Kulturträger.

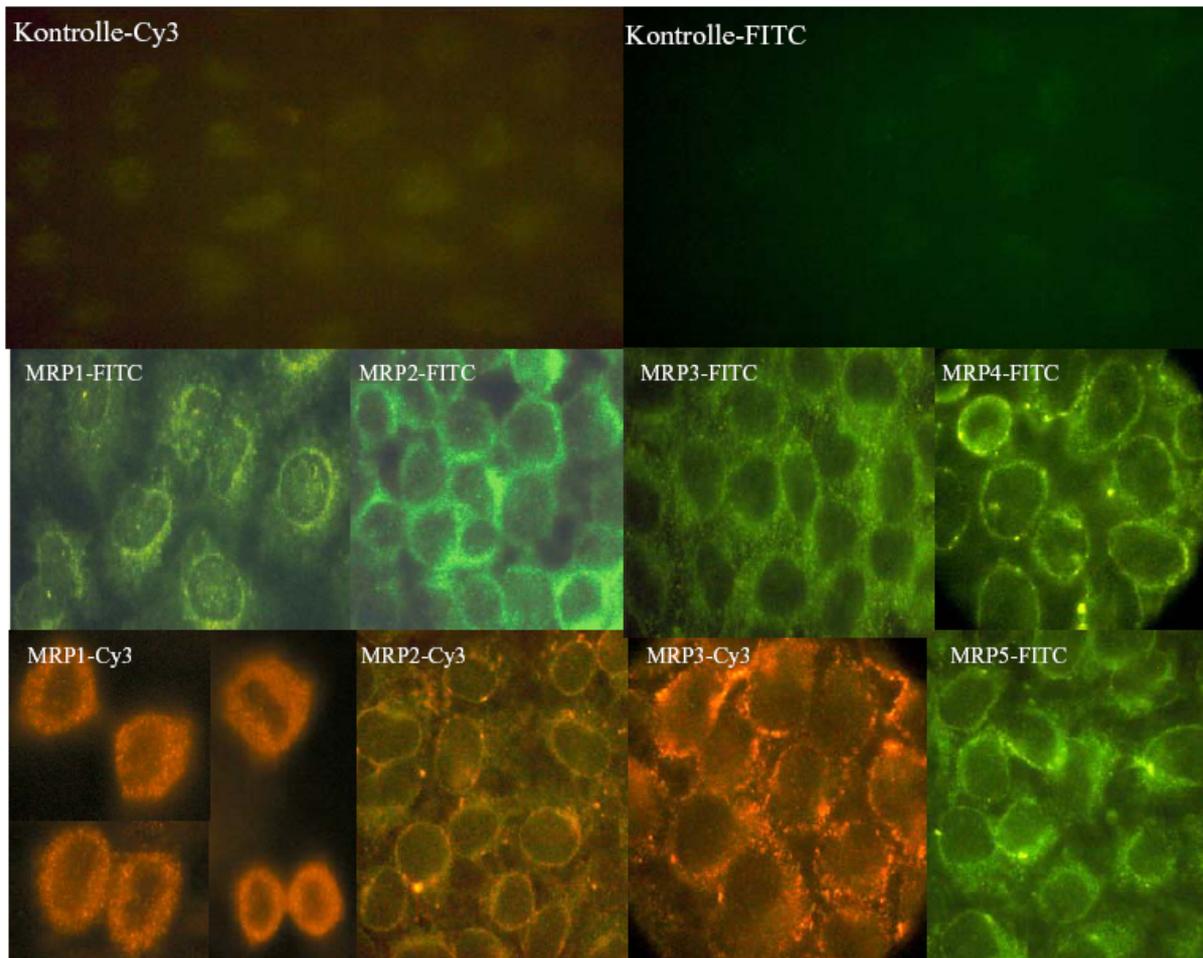


Abb. 13. Immunzytochemischer Nachweis und zelluläre Verteilung von MRP1-5 in kultivierten A549-Zellen. A549-Zellen wurden auf Deckgläschen vorkultiviert. Fixierung der Zellen erfolgte mittels Methanol (-20°C). Als primärer Antikörper wurde ein polyklonaler Antikörper gegen humane MRP1-5 aus Kaninchen (MRP1) oder Ziege (MRP2-5) eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein 1:300-500 in Blockpuffer verdünnter, FITC-gekoppelter, anti-rabbit IgG-Antikörper / CY3-gekoppelter anti-goat IgG-Antikörper verwendet. Die Auswertung der Proben erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei 490 nm (FITC)/550 nm (Cy3) und 520 nm (FITC)/570 nm (Cy3).

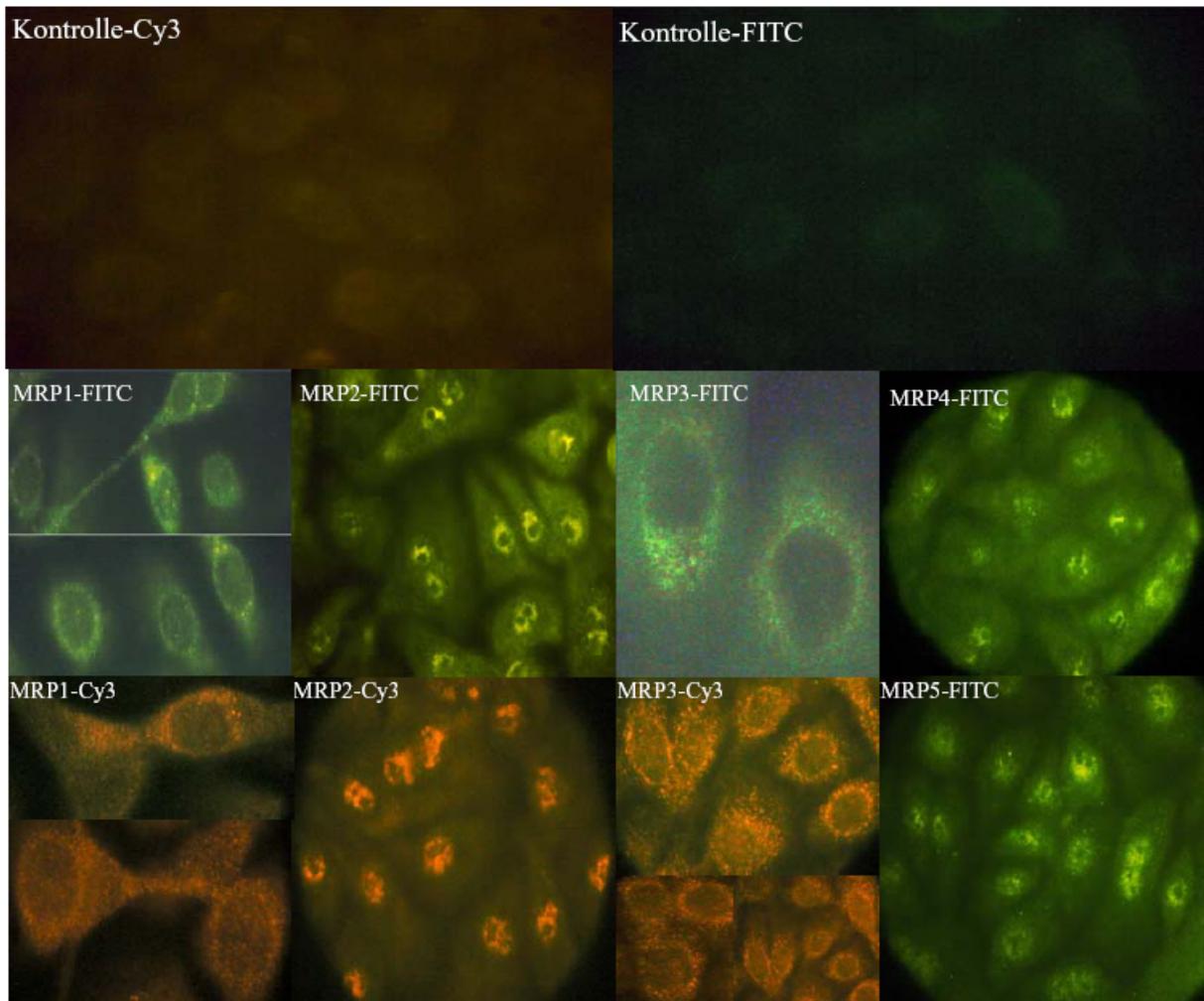


Abb. 14. Immunzytochemischer Nachweis und zelluläre Verteilung von MRP1-5 in kultivierten normalen humanen Bronchialepithelzellen. NHBEZ wurden auf Kollagenbeschichteten Deckgläschen vorkultiviert. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte wie unter Abb.13. und Material & Methoden beschrieben.

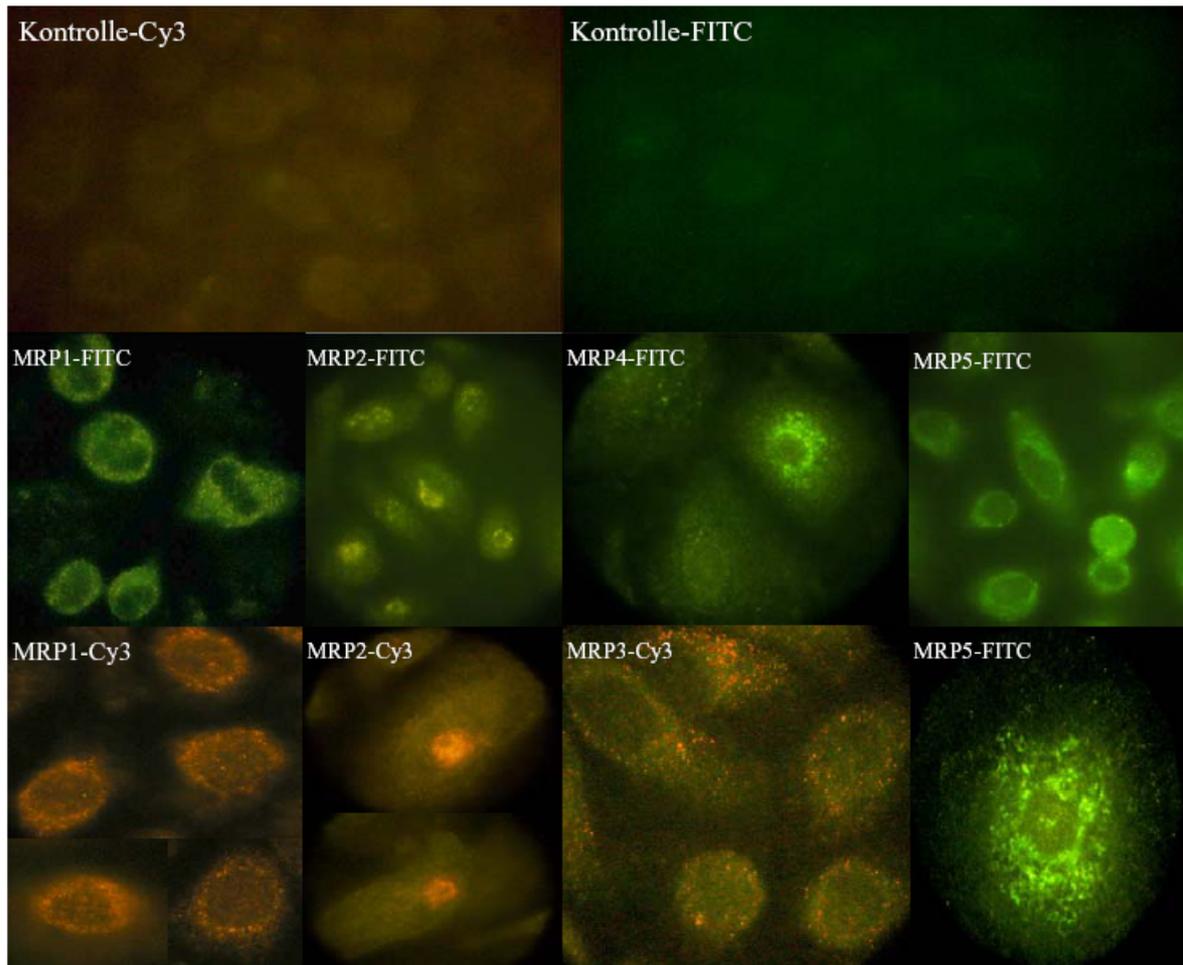


Abb. 15. Immunzytochemischer Nachweis und zelluläre Verteilung von MRP1-5 in kultivierten normalen humanen peripheren Lungenzellen. Periphere Lungenzellen wurden auf Deckgläschen vorkultiviert. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte wie unter Abb.13. und Material & Methoden beschrieben.

3.5. Zelluläre Verteilung von MRP1 und 2 unter verschiedenen Kulturbedingungen mittels Confokal-LASER-Scanning Mikroskopie

3.5.1. Intrazelluläre Lokalisierung von MRP1 in NHBEZ

Wie unter 3.4. dargestellt war MRP1 im zwei dimensionalen Raum im Membranbereich der Zellen exprimiert. Es war daher von großem Interesse abzuklären, wie sich diese Lokalisierung unter verschiedenen Kulturbedingungen der Zellen verändert.

Daher wurden NHBEZ auf Borosilikatdeckgläschen unter klassischen Untertauchbedingungen als auch auf Filterinserts (dry-wet) kultiviert. Anschließend wurden diese

Kulturen immunhistochemisch angefärbt und in einer konfokalen LASER-Scanning-Mikroskopie ausgewertet.

Bei den Zellen, welche auf Borosilikatdeckgläschen kultiviert wurden, konnten MRP1-Transporteine sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Zellmembran-Region von Bronchiallungenzellen nachgewiesen werden.

Die gleichen Untersuchungen wurden anschließend an Bronchialzell-Kulturen vorgenommen, welche unter den mehr „in vivo“-nahen Bedingungen mittels Membraninserts geführt wurden. Im Gegensatz zu den auf Borosilikatdeckgläschen kultivierten Zellen zeigten diese Zellen eine deutliche Polarisierung der Expression von MRP1. In beiden Kulturverfahren wurden die Bronchialepithelzellen zunächst für 3-4 Wochen nach Gewebeentnahme in Explantkultur gezogen und danach für 2-3 Wochen als 1:1 Split als erste Passage entweder auf Borosilikatdeckgläschen oder Polystyrol-Membran-Inserts weiterkultiviert.

Es wurde eine starke Expression dieses Proteins auf der basolateralen, dem Medium zugewandten Seite gezeigt. Im apikalen Bereich war MRP1 aber nicht mehr nachweisbar (**Abb.16**). Dieses Ergebnis belegt, dass primäre Bronchialepithelzellen in Kultur zur Ausprägung einer polarisierten Zellkultur angeregt werden können.

3.5.2. Intrazelluläre Lokalisierung von MRP2 in NHBEZ unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Die Laser-Confocal-Untersuchungen zeigten, dass MRP2 unter den „dry - wet“-Bedingungen des Insert-Kultur-Systems in der gesamten Zellmembran - apikal als auch basolateral - exprimiert ist. Hingegen wird unter klassischen Bedingungen MRP2 intrazellulär exprimiert (**Abb. 17**). Somit ist zu schlussfolgern, dass auch für MRP2 eine adaptive Antwort auf Zellkulturbedingungen stattfindet. Unter dry-wet Bedingungen findet eine Verteilung/Insertion von MRP2 in die Zellmembran statt, die unter einfachen Kulturbedingungen ausbleibt.

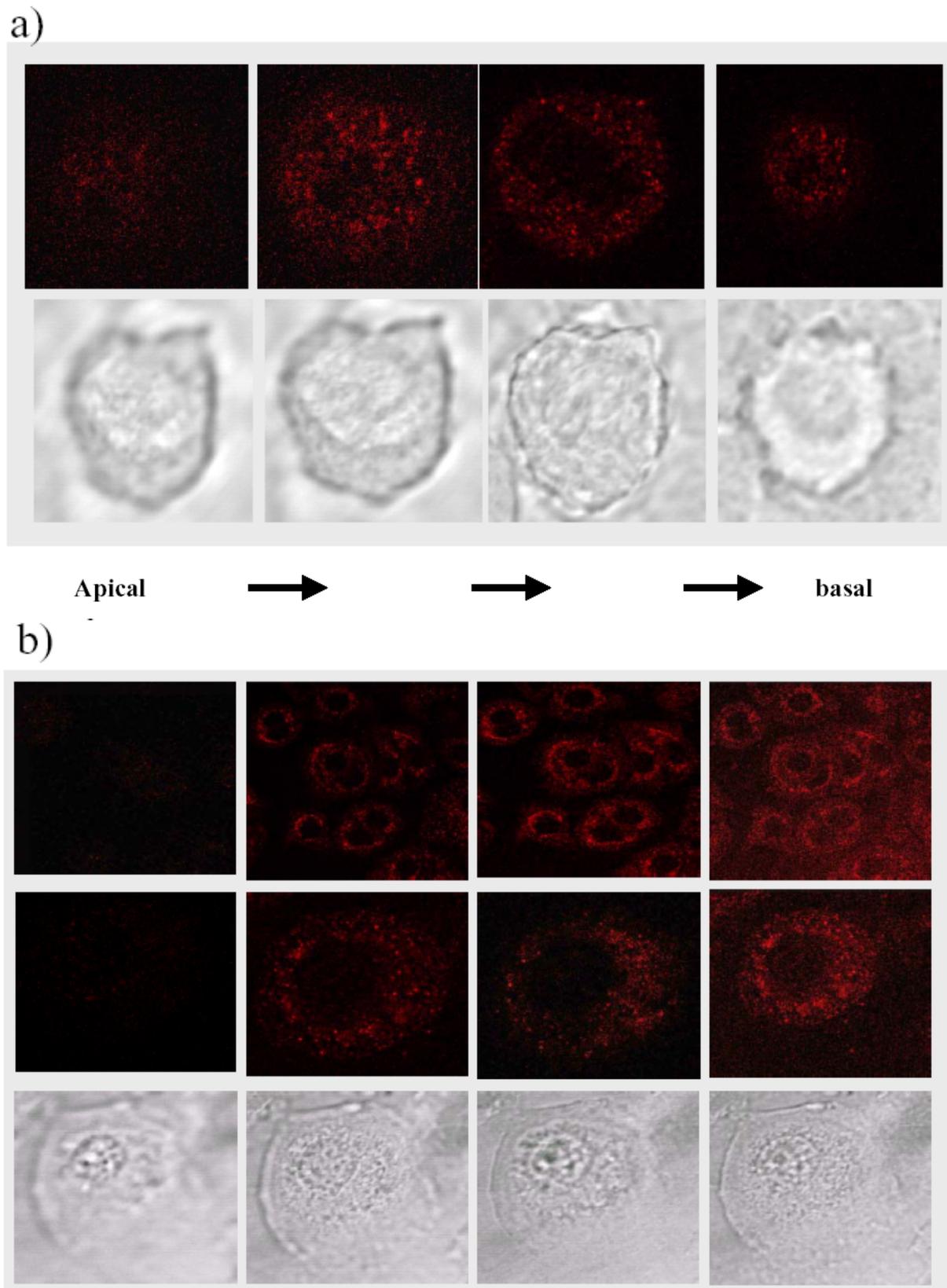
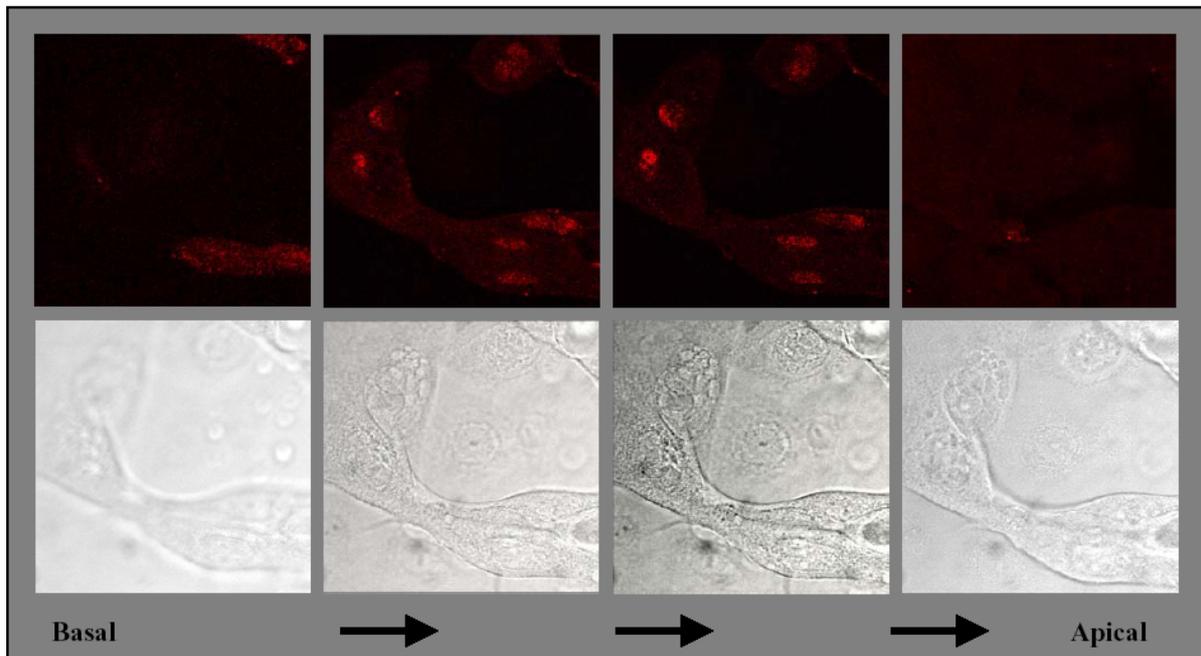


Abb.16. Immunzytochemischer Nachweis und zelluläre Verteilung von MRP1 in kultivierten normalen humanen Bronchialepithelzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen. NHBEZ wurden auf a) Kollagenbeschichteten Deckgläschen oder auf b) Membran-Inserts (dry-wet) vorkultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mittels Methanol (-20°C). Als primärer Antikörper wurde ein polyklonaler Antikörper gegen humanes MRP1 aus Kaninchen eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein 1:300-500 in Blockpuffer verdünnter CY3-gekoppelter anti-goat IgG-Antikörper verwendet. Die Auswertung der Proben erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels confokaler LASER-scanning-Mikroskopie.

a)



b)

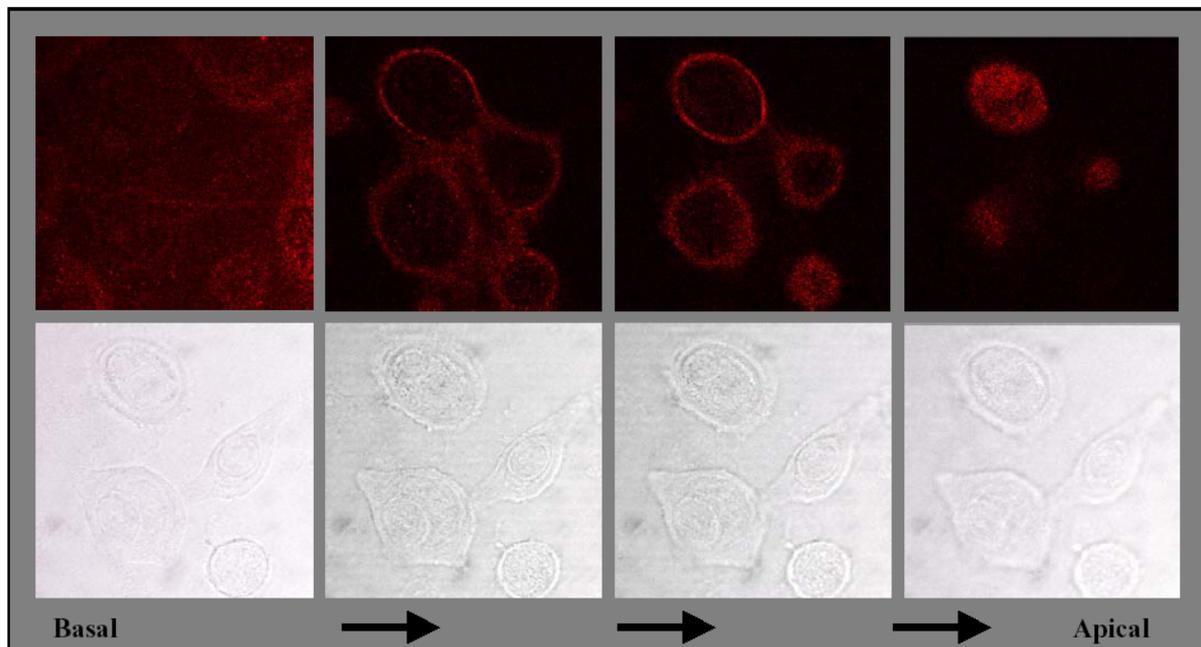


Abb.17. Immunzytochemischer Nachweis und zelluläre Verteilung von MRP2 in kultivierten normalen humanen Bronchialepithelzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen. NHBEZ wurden auf a) Kollagen-beschichteten Deckgläschen oder auf b) Membran-Inserts (dry-wet) vorkultiviert. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte wie unter Abb.16 und Material & Methoden beschrieben.

3.6. Untersuchung der MDR1- abhängigen Transportaktivität mittels Fluoreszenz-Imaging

3.6.1. Rhodamin 123 Transport in Lungentumorzelllinien

Um die funktionelle Aktivität von MRP1 in humanen Lungentumorzelllinien (A549, H358 und H322) zu untersuchen, wurde zunächst die für MDR1 beschriebene Methode etabliert. Dazu wurde eine für adhärenz gewachsene Zellen geeignete Methode (Einzelzellfluometrie) zur Bestimmung der MDR1-abhängigen Transportaktivität nach Lehmann et al., 2001 verwendet. Zur Messung der funktionellen Aktivität von MDR1 wurden Influx- und Effluxstudien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-123 (Rho-123) durchgeführt. Rho-123 ist ein spezifisches Transport-Substrat für MDR-1, das von Neyfakh (1988) erstmals beschrieben wurde. Es diffundiert passiv durch die Zellmembran, reichert sich in Mitochondrien lebender Zellen an und wird in den MDR-1 positiven Zellen durch aktiven Efflux aus der Zelle in den Extrazellulärraum transportiert. Nare et al., 1994 konnten anhand von Photoaffinitätsmarkierungsstudien mittels eines Azidosalicylsäurederivats von Rho-123 zeigen, dass Rho-123 direkt und spezifisch an P-Glykoproteine bindet. Diese Bindung kann durch Verapamil als Hemmstoff gehemmt werden (Tsuruo et al., 1981, Cornwell et al., 1987). In dieser Arbeit erfolgte die spezifische Hemmung der MDR-1 Transportaktivität mit dem MDR-1 Inhibitor Verapamil (10 µg/ml).

Nach Behandlung der Zellen mit Rho-123-haltigen Lösungen (1 µg/ml) wurden die zuvor 5-7 Tage auf Borosilikat-Deckgläschen kultivierten Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde mittels PBS die überschüssige Lösung abgewaschen. Dann wurden die Zellen mit frischem Puffer versetzt und sofort nach Null, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h Inkubationszeit einem quantitativen Fluoreszenz-Imaging unterzogen. Dabei wurde von jeweils 8-10 Zellen das Signal registriert und als mittlere Fluoreszenz pro Zelle notiert. Dabei zeigte sich eine schnelle und starke Steigerung der intrazellulären Konzentration von Rho-123 in den ersten 2 Stunden. In den folgenden 2 Stunden ist der Anstieg schwächer, bis das Plateau schließlich nach 4 Stunden erreicht wird (**Abb. 18**).

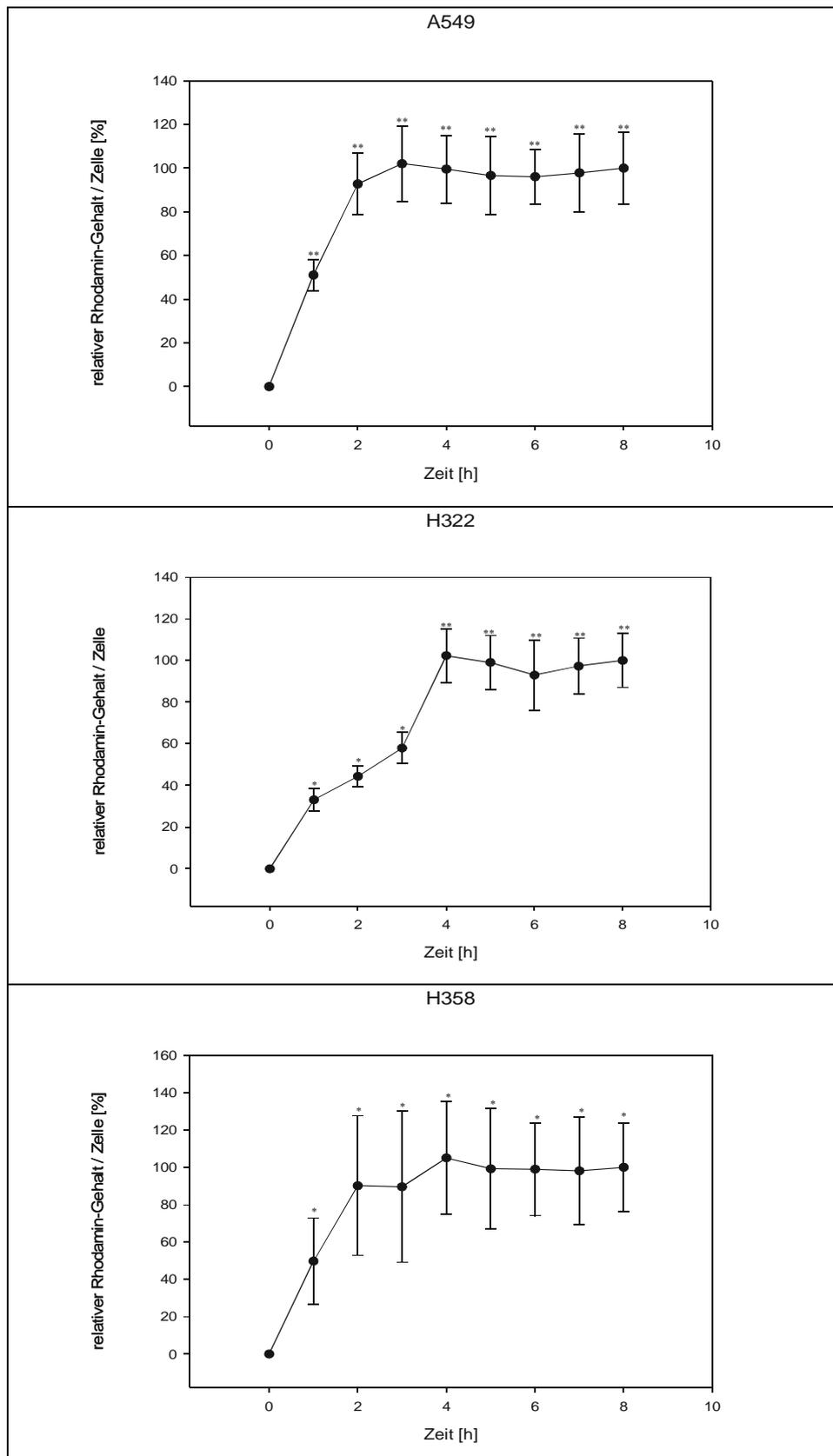


Abb. 18. Rhodamin 123-Transport in humanen Tumorzellen. Dargestellt sind relative Rho-123-Gehalte. Rho-123-Aufnahme-Efflux-Kinetik nach 1-8 Stunden in Kultur. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Rho-123-haltigem Medium inkubiert (1 µg/ml). Alle Einzelversuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Gezeigt sind $MW \pm SE$, $n = 3$, Signifikanzniveau: * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$; t-Test für gepaarte Werte. Die 8-h Werte wurden gleich 100% gesetzt.

3.6.2. Rhodamin-123 Spezifität als ein Transport-Substrat für MDR1.

In Versuchen von Twentyman et al., 1994 wurde berichtet dass, auch das MRP-Protein mit dem Efflux von Rho-123 in Verbindung gebracht werden kann.

Um zu bestätigen, dass es sich beim Efflux von Rho-123 in kultivierten humanen Lungentumorzellen tatsächlich um einen MDR1-vermittelten Prozess handelte, und um eine Beteiligung des MRP-Protein am Rho-123 Efflux auszuschließen, wurden die vorkultivierte Zellen für 4 h mit Rho-123 in Kombination mit dem etablierten funktionellen Inhibitor der MDR1-Transportaktivität Verapamil (10 µg/ml) sowie mit dem spezifischen MRP1 Inhibitor MK 571 (20µg/ml) (Gekeler et al.,1995) inkubiert. MK571 ist ein Inhibitor des Leukotrien-Transportes. Da MRP1 in diesem Transport wesentlich eingebunden ist, wird MK571 als Hemmstoff und Indikator für MRP angesehen.

Nach 4-stündiger Behandlung durch gleichzeitige Inkubation mit Rho-123 und Verapamil kam es zu einer signifikanten Retention des Farbstoffes. Dies entspricht einer funktionellen Hemmung des P-Glykoprotein (Abb.19.). Demgegenüber konnte der Leukotrienrezeptor Antagonist MK 571 in den vorliegenden Experimenten nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Rho 123-Konzentration führen und daher ist es nicht wahrscheinlich, dass Rho123 ein geeigneter Indikatorfarbstoff für die Messung von MRP1 ist .

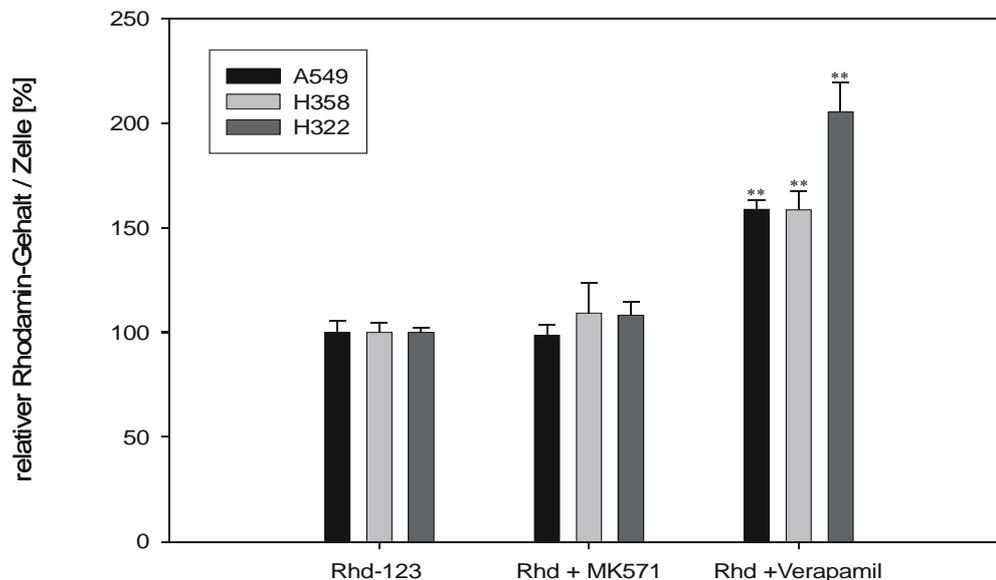


Abb.19. Hemmung der MDR1-abhängigen Transportaktivität kultivierter humaner Tumorzellen durch verschiedene Chemosensitizer. Für 5-7 d vorkultivierte Zellen wurden 4h lang mit Rho-123 1µg/ml (**K**) oder mit Rho 123 in Kombination mit Verapamil (10 µg/ml) oder mit dem spezifischen MRP1 Inhibitor MK 571 (20µg/ml) inkubiert. Gezeigt sind MW \pm SD von 3 Zellpräparationen. Die (**K**) Mittelwerte wurden gleich 100% gesetzt. * = P < 0,05, ** = P<0, 01 ; t-Test für gepaarte Werte.

3.7. Untersuchung der MRP1- abhängigen Transportaktivität mittels Fluoreszenz- Imaging

3.7.1. CDF Transport in Lungentumorzelllinien

Zur Untersuchung der Funktionellen Aktivität von MRP1 wurde dieselbe Versuchsanordnung wie zur MDR-1-Funktionsprüfung verwendet allerdings mit einem anderen Substrat.

Der Fluoreszenzfarbstoff, welcher durch MRP-1 transportiert wird, ist 5,6-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) (Rychlik et al., 2000).

Die Substanz CDF als Fluoreszenzfarbstoff zeigt ein ähnliches Spektrum und hat daher ähnliche Eigenschaften als Fluoreszenzfarbstoff wie Rho123. Die spezifische Hemmung der MRP-Transportaktivität erfolgte mit dem MRP1 Inhibitor MK-571 (20µg/ml) (Lehman et al., 2001).

Zur Bestimmung der MRP1-abhängigen Transportaktivität wurden die Zellen (A549, H358 und H322) auf Borosilikatdeckgläschen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Die anschließende Inkubation der Zellen mit 4 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs CDF erfolgte im Zellinkubator. Bei Versuchen zur Hemmung des MRP1-vermittelten Transports wurden die Zellen parallel mit CDF und verschiedenen Inhibitoren (MK571 und Verapamil) inkubiert. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die Zellen nach Absaugen des CDF-haltigen Mediums zunächst 4-5 mal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen zur Messung der Aufnahme von CDF in Lungenzellen eingesetzt wurden.

Wie in **Abb. 20** erkennbar ist steigt die intrazelluläre Konzentration von CDF in den ersten 2 Stunden zunächst stark an, während sie in den folgenden 2 Stunden schwächer ansteigt, bis ein Plateau erreicht wird. Daher ist es auch hier möglich, durch Vorinkubation der Zellen mit CDF über 4-6 h ein Gleichgewicht aufzubauen, welches der Ausgangspunkt für Efflux-Messungen ist.

3.7.2. Spezifität und Hemmbarkeit des MRP1-vermittelten Transports

Aus ähnlichen Gründen, wie unter 3.2.2. beschrieben, wurden die Zellen (A549, H358 und H322) auf Borosilikatdeckgläschen kultiviert und anschließend mit 4 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs CDF im Zellinkubator inkubiert. Bei Versuchen zur Hemmung des MRP1-vermittelten Transports wurden die Zellen gleichzeitig mit CDF und verschiedenen Inhibitoren (MK571 und Verapamil) inkubiert. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die

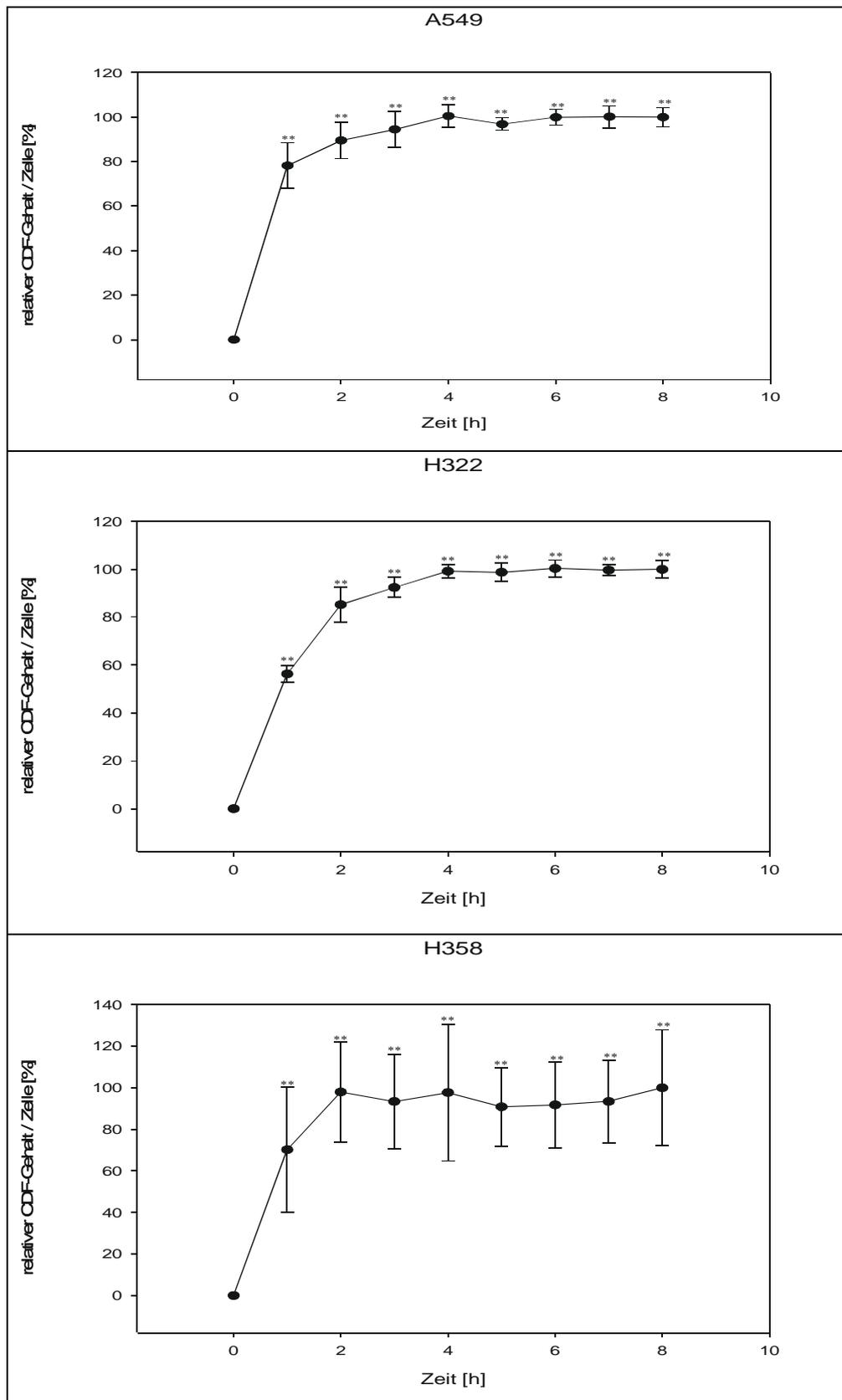


Abb.20. Nachweis der MRP1 Transport-Funktion durch 5,6-Carboxy-2,7'-dichlorofluorescein (CDF) Transport in Tumorzellen. Einzelzellfluoreszenz-Messung. Adhärenz Zellen wurden mit 4 μ g/ml CDF inkubiert. MRP1-abhängige CDF-Gehalt Gezeigt sind MW \pm SE, n = 3, Signifikanzniveau: * = P < 0,05, ** = P < 0,01 ; t-Test für gepaarte Werte. Die 8-h Werte wurden gleich 100% gesetzt.

Zellen nach Absaugen des CDF- und Inhibitoren-haltigen Mediums zunächst 4-5 mal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen zur Messung der Aufnahme von CDF genutzt wurden. Diese Vorgänge mussten sehr schnell durchgeführt werden, um keine Verschiebungen des CDF-Gehaltes durch das Spülen zu erzeugen. Die Tumorzellen, die in Anwesenheit von 20 µg/ml MK571 mit CDF inkubiert worden waren, wiesen höhere Farbstoffspiegel auf als die ohne Inhibitoren mit CDF inkubierte Zellen **Abb.21**, was für einen verminderten Efflux von CDF sprach.

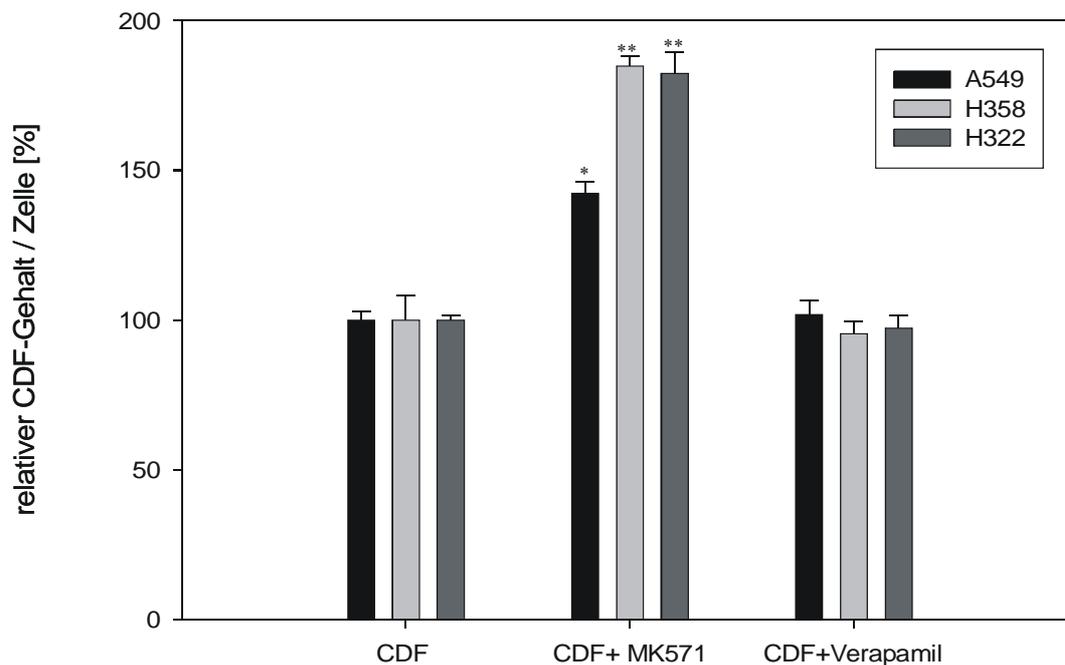


Abb. 21. Hemmung der MRP1-abhängigen Transportaktivität kultivierter humanen Tumorzellen durch verschiedene Chemosensitizer. Für 5-7 d vorkultivierte Zellen wurden 4 h lang mit CDF 4 µg/ml (**K**) oder mit CDF in Kombination mit MK 571 (20 µg/ml) oder mit CDF in Kombination mit dem spezifischen MDR1 Inhibitor Verapamil (10 µg/ml) inkubiert. Gezeigt sind MW. \pm SD von 3 Zellpräparationen. Die (**K**) Mittelwerte wurden gleich 100% gesetzt. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$; t-Test für gepaarte Werte.

3.7.3. Änderung der CDF Aufnahme durch Glutathion- Pool- Regulatoren

Die Tumorzellen (A549, H358 und H322) wurden 24 Stunden mit NAC oder BSO in Konzentration von 4 µM vorbehandelt und anschließend 4 Stunden mit CDF in An- oder Abwesenheit von MK 571 inkubiert. In NAC-vorbehandelten Zellen war die CDF-Konzentration vermindert. Dies ist ein Hinweis für eine gesteigerte MRP-Aktivität. In einem

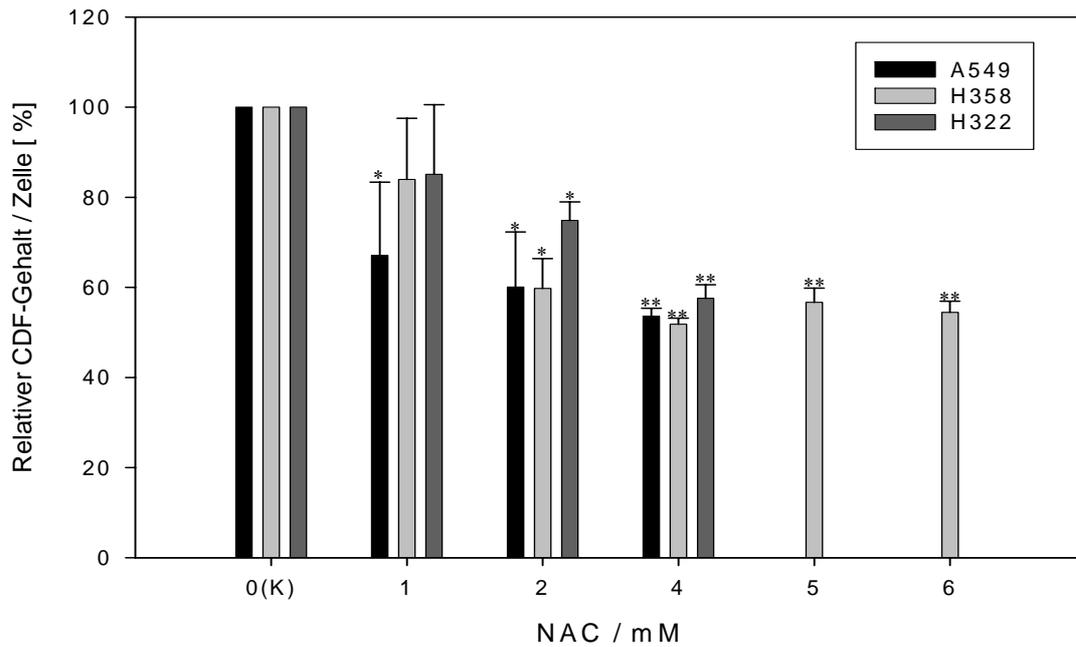


Abb. 22. Stimulation der MRP1-abhängigen Transportaktivität in humanen Tumor Zelllinien. Nach Behandlung mit verschiedenen NAC-Konzentrationen für 24h wurden die Zellen (H322, H358 und A549) 4h mit CDF (4µg/ml) inkubiert. Der relative intrazelluläre Gehalt von CDF wurde bestimmt. Die Mittelwerte der Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$; t-Test für gepaarte Werte.

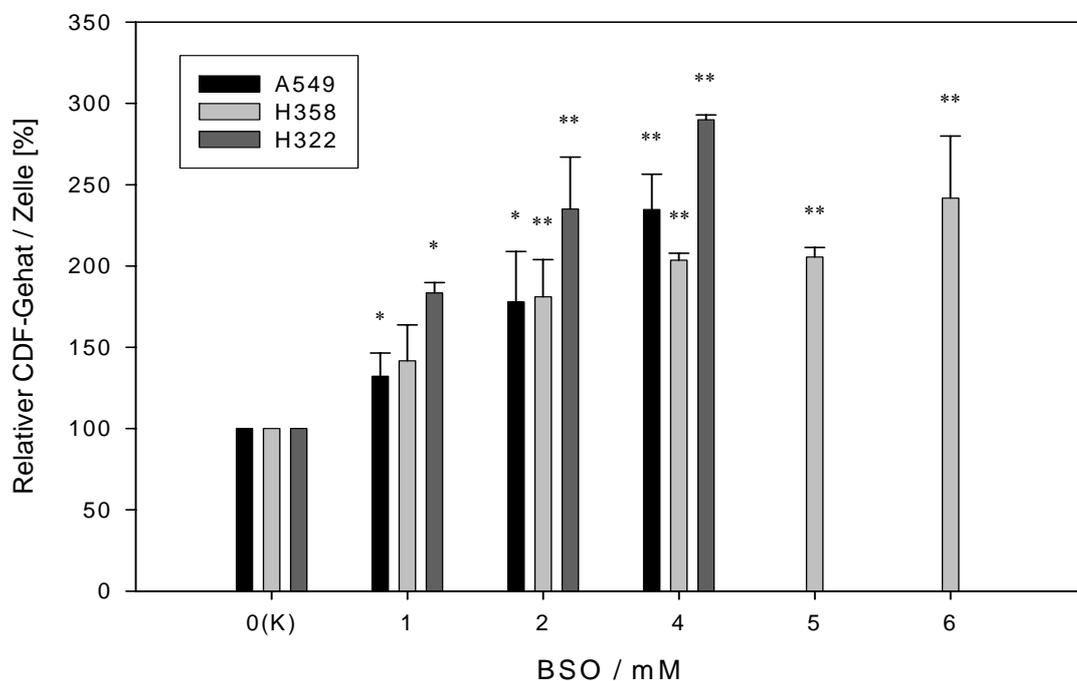


Abb.23. Hemmung der MRP1-abhängigen Transportaktivität in humanen Tumor Zelllinien. Nach Behandlung mit verschiedenen BSO-Konzentrationen für 24h wurden die Zellen (H322, H358 und A549) 4h mit CDF (4µg/ml) inkubiert. Der relative intrazelluläre Gehalt von CDF wurde bestimmt. Die Mittelwerte der Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$; t-Test für gepaarte Werte.

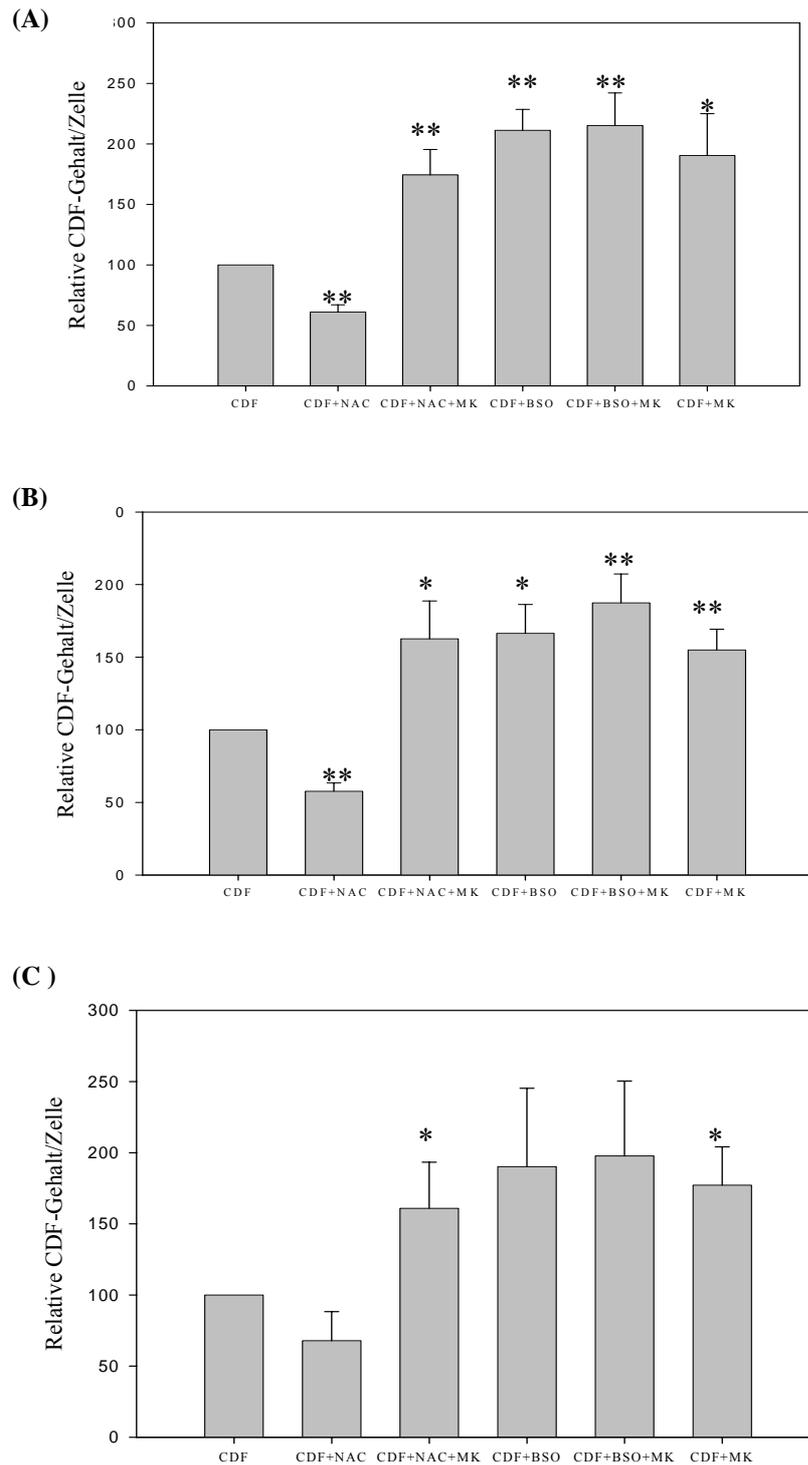


Abb.24. MRP1 Funktionsnachweis an GSH-Modulatoren behandelten Tumorzelllinien (A) A549, (B) H358, (C) H322. Die Zellen wurden 24h mit N-Acetyl Cystein (NAC) oder Buthionin-Sulfoximin (BSO) und anschließend 4h mit CDF in An- oder Abwesenheit von MK571 inkubiert. Der relative intrazelluläre Gehalt von CDF wurde bestimmt. Die Mittelwerte der Kontrollwerte (nur CDF) wurden gleich 100% gesetzt. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$; t-Test für gepaarte Werte.

solchen Ansatz wirkte MK571 steigernd auf den Farbstoff-Gehalt in den Zellen, was als Hemmung der NAC-gesteigerten MRP Aktivität zu interpretieren ist. Andererseits führte Glutathion-Synthese-Inhibitor BSO zur Erhöhung der intrazellulärer Konzentration von CDF durch die Erniedrigung des Glutathion-Pegels (Stehfest et al., 2002; Stehfest et al., 2003), was eine verminderte MRP1-Aktivität reflektiert (**Abb.22, 23, 24.**).

4. Diskussion

Aufgrund der Struktur und der Morphologie des Respirationstrakt ist das Atemsystem einem hohen Risiko der Exposition gegenüber luftgetragenen Xenobiotika ausgesetzt. Ein Teil der Lungenläsionen ist auf Grundlage der Eigenschaften von inhalierten toxischen Verbindungen, den toxiko-pathologischen Veränderungen im Gewebe und den speziellen Abwehrmechanismen der Lunge entstanden. Ein bedeutendes Konzept bei der Entwicklung sicherer Expositionsgrenzwerte gegenüber luftgetragenen Schadstoffen ist Schutzmechanismen zuzuschreiben, wie der Ausschleusung von toxischen Substanzen aus den Zellen in die Extrazellularräume, welche einen ersten Schritt in der Detoxifikation darstellen.

„Multidrug Resistance Related Proteine“ (MRP), welche zur Sub-Familie C der ABC-Transporter-Superfamilie gehören, sind in der Lage, Xeno- und Endobiotika zu transportieren. Jedes dieser Transportproteine weist eine eigene Substrat-Spezifität auf, obwohl bestimmte Substrate von zwei oder mehr dieser Proteine transportiert werden können. Trotz dieser Unterschiede in der Substratspezifität verbunden mit den Unterschieden in Gewebeverteilung und Membranlokalisierung sind jedem einzelnen dieser Efflux-Transporter ganz spezielle physiologische Funktion zuzuweisen. Die Lokalisation der verschiedenen MRP Isoformen innerhalb der Zelle könnte eine neue interessante Dimension hinsichtlich ihrer Funktion und Regulierung eröffnen.

4.1. Die Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und peripheren Lungenzellen (PLZ)

Normale humane Bronchialepithelzell-Kulturen (NHBEZ) können aus Biopsiematerial histologisch normaler Gewebe gewonnen werden (Franklin et al., 1996). Devereux et al. 1986 zeigten, dass Kulturen tumorfreier Resektatproben von Tumorpatienten vergleichbare Enzymaktivitäten (z.B. CYP450-Monooxygenasen) wie Kulturen von Proben aus gesunden Spendern aufwiesen.

Die Kultivierung der Humanlungenzellen von Resektionsmaterial aus operativen Eingriffen an der Lunge, die eine Lob- oder Pneumektomie erforderlich machen, wurden im serumfreien Medium erfolgreich durchgeführt. Mit den Kulturen der normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und peripheren Lungenzellen (PLZ) konnten gute Modelle für respiratorische Epithelien entwickelt und in Experimente eingebracht werden.

Über substantielle morphologische (Re) Differenzierungen von Nagetier-, Hund- und Humantrachealepithelzellen in Kultursystemen mit Luft-flüssig-Grenzflächen (Biphasen-Membrankultursysteme), die die physiologische Bedingungen in der Lunge nachahmen, ist berichtet worden. Unter trocken-nass Bedingungen kultivierte Hunde-Trachealepithelzellen weisen, verglichen mit unter Standardbedingungen kultivierten Kontrollen, einen veränderten Natriumtransport auf (Johnson et al., 1993). Funktionen des Lungenepithels wie der Ionentransport durch selektive Natriumkanäle wurden unter trocken-nass Bedingungen verändert. Die experimentelle Versorgung des Kultursystems mit Testverbindungen (Steroiden, Medikamenten) wurde über das flüssige Kompartiment moduliert (Jain et al., 2001; Jiang et al., 2001). Permeabilitätsparameter wurden in Transwell-Membrankulturen besser konserviert (Roum et al., 2001).

Zell-spezifische Funktionen gehen in Kulturen auf rigiden Oberflächen der Trägermembran mit fortlaufender Generationszeit verloren. Eine phänotypische Differenzierung der NHBEZ zum Zilienbesatz konnte elektronmikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Die wesentliche Ursache für das Fehlen eines Zilienbesatzes unter serumfreier Kultivierung scheint in den monophasischen Kulturbedingungen begründet. Verschiedene Arbeitsgruppen machten die Erfahrung, dass die getauchte, also monophasische Kultur der NHBEZ mit einem Verlust ihres Zilienbesatzes einhergeht. Die sich entwickelnden Monolayer verlieren vollständig und irreversibel ihren Zilienbesatz (Adler et al., 1990; Gruenert et al., 1995; Jorissen et al., 1991; Lee et al., 1984; Moller et al., 1987; Van Scott et al., 1988; Wu et al., 1985; Zeitlin et al., 1988). Die Wahl geeigneter Kulturbedingungen ermöglicht es, die Initiation von Ziliogenese und Zilienwachstum für bis zu vier Wochen in NHBEZ-Kulturen zu beobachten (de Jong et al., 1994). Gray et al. 1996 subkultivierten serumfrei kommerziell erhältliche NHBEZ in einer Luft-Medium-Grenzschicht.

Die Ziliogenese wurde im Tierversuch *in vivo* bei Replantationsversuchen und *in vitro* in biphasischen Kammern, also bei der Kultivierung der Tracheobronchialzellen in einer Luft-Medium-Grenzschicht, bei Hamster- und Meerschwein-Trachealepithelzellen beobachtet (Whitcutt et al., 1988).

Mit speziellen Techniken lassen sich für Lungenepithelzellen *in vivo*-nahe Kulturbedingungen realisieren. So war es möglich, Zellen auf porösen Filterinserts zu kultivieren. Die Zellen werden durch das Filtermaterial (basal) hindurch mit Medium versorgt, die Oberseite (apikal) der Kultur wird der Umgebungsluft (Brutschrank) ausgesetzt und kann gezielt mit Gasen inkubiert werden.

Die Kulturen bestanden aus Zellen mit 100% iger epithelialer Charakteristik, die durch immunhistochemische Anfärbung gegen Zytokeratine sowie Gegenfärbung von Vimentin, SMA (smooth muscle actin) und Desmin eindeutig charakterisiert werden konnte. Kulturen derselben Zellen, wie in Lehmann et al., 2001 beschrieben, zeigten unter serumfreien klassischen Untertauchenbedingungen um etwa 90-95 % (NHBEZ) oder nur eine 60-70% (PLZ) epitheliale Charakteristika. Die so entwickelten Kulturen wiesen eine Konservierung und sogar Wiedererlangung von AII-Zell-typischen Parametern auf. Es kommt unter diesen Bedingungen zu einer Umkehr der Dedifferenzierungsvorgänge (Lamellar-Körperchen, tubuläres Myelin), zur Wiedererlangung der biochemischen Funktion z.B. Surfactant-Produktion. Diese Methode bietet auch die Möglichkeit Transportprozesse an einer Luft-Flüssigkeits-Grenze ähnlich dem alveolären Epithel zu untersuchen (Mathias et al., 1995; Kohsa et al., 1996; Dobbs et al., 1997).

4.2. Expression und zelluläre Verteilung von MRP1-5 in humanen Lungen-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Als ein bedeutender zellulärer entgiftender Faktor ist die subzelluläre Lokalisierung von MRP1 in polarisierten epithelialen Zellen von Interesse. MRP1 ist in allen analysierten humanen Organen exprimiert. In der Lunge, den Hoden, der Niere und den peripheren mononukleären Blutzellen wurden sogar relativ hohe Spiegel gefunden (Cole et al. 1992, Flens et al. 1996), wobei jedoch die genaue physiologische Funktion noch nicht geklärt wurde. Die MRP1-Expression kann innerhalb von Geweben variieren und unter bestimmten Umständen auf spezifische Zellenarten beschränkt sein. Zum Beispiel ist MRP1 in hohem Ausmaß in testikulären Leydig-Zellen aber auch in Sertoli-Zellen zu finden. Deshalb wird angenommen, dass es in die Regulierung von Östrogen-Metaboliten-Spiegeln eingebunden ist, um einen niedrigen Pegel zu halten (Flens et al. 1996, Stride et al. 1996, Qian et al. 2001, Haimeur et al., 2004). Die Niere der Ratte, des Schweins und des Menschen exprimieren ebenfalls MRP1, wobei vermutet wurde, dass MRP1 eine exkretorische Funktion zum Schutz dieser zellulären Schichten vor Zytotoxinen ausübt (Evers et al., 1996; Van Aubel RA, 2000; Scheffer et al., 2000; Pei et al., 2002).

Ebenso wird mrp1 in spezifischen Gehirnzelltypen (z.B Chorioideaplexus) von knockout-Mäusen exprimiert. Mrp1 ist ebenfalls in der Lage die Gewebeverteilung einiger Medikamente zu beeinflussen (zu limitieren), und trägt zur Blut-Gehirnrückenmark-flüssigkeitsbarriere (Arzneimittel-Permeabilitätsbarriere) bei (Wijnholds et al., 2000a).

MRP1 ist im menschlichen Intestinum exprimiert, wobei die höchste Expression von MRP1 in den Paneth Zellen gefunden wurden, die sich in den Krypten befinden. MRP1 ist ebenfalls in proliferativen Darmzellen exprimiert, was erneut dafür spricht, dass MRP1 dazu beiträgt, diese Zellschicht vor von Xenobiotika verursachten (induzierten) Schaden zu schützen, indem es eine selektive Barriere bildet, die den Zugang von Toxinen und anderen Xenobiotika, einschließlich oral verabreichten Medikamenten, einschränkt (Prime-Chapman et al., 2004; Haimeur et al., 2004). Darüber hinaus ist MRP1 in humanen Alveolarmakrophagen, Bronchialepithelzellen und hyperplastischen reaktiven Typ-II-Pneumozyten exprimiert, wobei eine starke MRP1 Immun-Reaktivität in reaktiven Typ-II-Pneumozyten nachgewiesen wurde (Flens et al. 1996, Wright et al. 1998, Scheffer et al. 2002a and Brechot et al. 1998).

In polarisierten Epithelzellen ist MRP1 in basolateralen statt in apikalen Membranen zu finden, wo sich auch andere Transporter wie P-Glycoprotein, MRP2 und BCRP/ABCG2 befinden (Flens et al., 1996; Haimeur et al., 2004).

Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit diesen Befunden, da die Membran-Lokalisierung von MRP1 in NHBEZ, PLZ und A549 Tumorzelllinie in klassischen Untertauchkultursystemen gezeigt werden konnte. Weiterhin konnte MRP1 als ein basolaterales Membranprotein in NHBEZ in Insert-Kulturen charakterisiert werden. Mittels Confocal Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) wurde dies deutlich gezeigt. Diese Befunde weisen somit ebenfalls auf eine mögliche Rolle von MRP1 beim Schutz des Lungengewebes vor luftgetragenen Xenobiotika hin. Unter bestimmten Bedingungen und in bestimmten Zelltypen kann eine bedeutende Expression von MRP1 in normalen Geweben in nicht näher bekannten intrazellulären Membranen gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich hier um vom Golgi-Apparat abgeleitete sekretorische Vesikeln (Flens et al., 1996; Van Luyn et al., 1998).

Neueste Erkenntnisse zeigen, dass das "subzelluläre" MRP1 Protein aktiv ist, aber bislang seine physiologische Funktion an diesem subzellulären Standort nicht gut verstanden wird (Haimeur et al., 2004).

Neuere Studien zeigen ebenfalls, dass die Glykosylierung für MRP1-Transportfunktion nicht essentiell ist, da der Mangel dieser posttranslationalen Änderung keine bedeutende Verschiebung der Substratespezifität zu verursachen scheint (Hipfner et al. 1997, Bakos et al. 1996, Muller et al. 2002). Im Gegensatz zu einer Anzahl von anderen integralen Membranproteinen, scheint die Glykosylierung keine größere Rolle beim intrazellulären

Sortieren und/oder Orientieren von MRP1 zur Zelloberfläche zu spielen (Muller et al. 2002).

Neuere Studien zeigen, dass mehrere der vorhergesagten intra- und extrazellulären Proteinschleifen eng mit der Membran verbunden oder möglicherweise sogar in die Membran eingebettet sind (Muller et al. 2002, Bakos et al. 2000).

Trotz der großen Ähnlichkeit im Substratbereich, ist die Funktion von MRP2 im Körper in Bezug auf Expressionsmuster und subzellulärer Polarität gegenüber MRP1 deutlich verschieden. Im Gegensatz zu MRP1, weist MRP2 eine apikale Lokalisierung in polarisierten Zellen auf und wird hauptsächlich in den Lebergängen exprimiert. Darüber hinaus wird MRP2 in niedrigeren Mengen im proximalen Tubulus der Nieren, in den Enterozyten, der Plazenta und möglicherweise in den Kapillaren des Gehirns exprimiert (Kartenbeck et al., 1996; Schaub et al., 1997; Miller et al., 2000; Mottino et al., 2000; St-Pierre et al., 2000).

Viele der Struktur funktionsstudien für MRP2 führen zu bestimmten Faktoren, die ein apikales Sortieren vermitteln. Die Analyse von chimärischen MRP1/MRP2 Proteinen zeigte dass, ein 480-Aminosäures NH₂-Terminalsegment des MRP1 entscheidend für die Lokalisierung des Proteins in lateralen Membran von MDCK Zellen ist. Dies führte zur Annahme einer apikalen Ziel-Sequenz in der analogen Region von MRP2 (Konno et al., 2003).

Bei N-terminal-MRP2-Deletionsmutanten, welchen die MSD0 und L0 Domänen fehlen, wurde keine Lokalisierung in den apikalen Membranen von MDCK Zellen beobachtet und MRP2-Mutante lokalisierte stattdessen intrazellulär (Fernandes et al., 1990). Außerdem zeigte eine Untersuchung, dass ein MRP1/MRP2 chimärisches Protein mit einer Verbindung an Aminosäure 792, eine apikale Lokalisierung in transfizierten MDCK Zellen aufweist. Dieser Befund widerspricht der Studie von Konno et al. 2003, in welchem ein ähnliches MRP1/MRP2 Protein (Junction an Aminosäure 846) in lateralen Abschnitten transfizierter LLC PK1 Zellen gefunden wurde (Nies et al. 2002a).

Dieser Konflikt ergeben sich wahrscheinlich aus der Beteiligung von Faktoren, die zellspezifisch sein können, und nicht nur die Verknüpfung per se beherrschen, sondern auch die Stabilität eines membranlokalisierten Proteins bestimmen, und so abnormale Proteine befähigen, dem intrazellulären Kontrollsystem zu entkommen (Kruh and Belinsky, 2003).

Die intrazelluläre Lokalisation des MRP2 Proteins konnte in NHBEZ und PLZ, welche unter klassischen Untertauchkulturbedingungen kultiviert wurden, mittels Immuno-

fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu Membranlokalisierung in unter „dry-wet“-Bedingungen kultivierten NHBEZ, welche den in vivo Bedingungen in der Lunge näher kommen. Auch frühere Befunde würden die Hypothese stützen, dass die Kultur-Bedingungen wichtige und entscheidende Faktoren für die Differenzierung kultivierter Zellen beeinflussen.

Von allen MRP Familienmitgliedern steht MRP3 strukturell dem MRP1 am nächsten (58% Aminosäureidentität) (Kool et al., 1999). Humanes MRP3 wird in einer großen Vielzahl von Geweben exprimiert z.B. in der Bauchspeicheldrüse, der Niere, der Nebenniere und der Gallenblase, jedoch hauptsächlich in der Leber, im Dünndarm und im Dickdarm. MRP3-Expression wurde in Menschen, aber nicht in Ratten beobachtet. In HepG2 Zellen konnte die Expression von MRP3 durch Phenobarbital herbeigeführt werden. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, daß MRP3 als ein induzierbarer Transporter bei der biliären und Darm-Ausscheidung von organischen Anionen einen bedeutenden Anteil hat (Kiuchi et al., 1998; Uchiumi et al., 1998; Scheffer et al., 2002b).

Im Gegensatz zu MRP2, aber in Übereinstimmung mit MRP1 befindet sich das humane MRP3 in den basolateralen Membranen von polarisierten Zellen wie Cholangiozyten (Gallengangszellen) und Hepatozyten, aber nur in jenen, welche die Portaltrakte umgeben. Es konnte aber kein MRP3 in den Membranen der Lebergänge nachgewiesen werden (Kool et al., 1999). In der menschlichen Niere ist MRP3 in basolateralen Membranen des distalen Tubulus exprimiert. Es wird auch vermutet, dass MRP3 in Mensch und Ratte in die enterohepatischen Zirkulation von Gallensäuren involviert sein könnte, wobei das Protein auf den basolateralen Oberflächen von Enterozyten lokalisiert gefunden wurde (Scheffer et al., 2002a,b; Rost et al., 2002).

Unsere Charakterisierung von MRP3 in NHBEZ und PLZ von morphologisch normaler menschlicher Lunge sowie in der A549 Tumorklungenzelllinie als Membranprotein, unterstützt die Einschätzung, dass MRP3 nicht nur als Barriere, sondern auch als zellulärer Eliminator von Toxinen aus endogenen und exogenen Quellen fungiert. *Haimour et al., 2004* schlug vor, dass die basolaterale Lokalisierung des MRP3-Membranproteins in Blutgefäßendothel-Zellen der Plazenta (St. Pierre et al., 2000) die Aufnahme von organischen Anionen in die fötale Zirkulation verhindert oder eingrenzt. Gleichzeitig bleibt die Ausscheidung von bestimmten Abfallprodukten in die maternale Zirkulation möglich.

MRP4 mRNA wird am stärksten in der menschlichen Prostata exprimiert, wo es im Drüsenepithel lokalisiert ist (Lee et al., 2000). Moderate Expression wurde in anderen Geweben einschließlich der Lunge, der Nebennieren, dem Ovar, den Testis, dem Pankreas

und dem Dünndarm gefunden (Lee et al., 1998). Interessanterweise ist berichtet worden, dass im menschlichen Prostatagewebe MRP4 in der basolateralen Membran von Tubuloacinarzellen gefunden wurde (Lee et al., 2000). In Menschen- und Ratten-Nierenzellen (speziell: Tubuluszellen) wurde MRP4 hingegen in der apikalen Membran gefunden. Aufgrund dieser apikalen Lokalisierung ist MRP4 ein guter Kandidat für die Ausscheidung von cAMP in den Urin (Van Aubele et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit, konnte mittels dem indirekten Immunfluoreszenz-Verfahren MRP4 als intrazelluläres Protein beschrieben werden, welche eine dritte Variante in der zellulären Verteilung von MRP4 darstellt. Dies wirft die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Lokalisation und Funktion auf. Um die potentiellen physiologischen Funktionen dieser Membran-Pumpen zu verstehen, sind weitere Informationen über ihre gewebespezifischen Expressionsmuster erforderlich. Die Frage ob MRP4 wirklich verschieden in den Zellmembranen in verschiedenen epithelialen Geweben lokalisiert ist und unter welchen Bedingungen dies stattfindet bedarf der Aufklärung, besonders wegen der physiologischen und molekularen Implikationen eines solchen Befundes.

Die Analyse des menschlichen Gewebes auf mRNA Ebene zeigt, dass MRP5 wie MRP1 ubiquitär exprimiert sind, wobei die höchsten MRP5 mRNA-Expressionen in Skelettmuskeln, Herzen und verschiedenen Segmenten des Gehirns gefunden wurden (Belinsky et al., 1998; Kool et al., 1997; McAleer et al., 1999; Suzuki et al., 2000; Hirrlinger et al., 2002). Dem gegenüber zeigt MRP4 mRNA, eine deutlich limitiertere Gewebeverteilung. MRP5 ist darüber hinaus in glatten Muskelzellen des menschlichen Urogenitalsystems sowie in Coronar- und Lungenarterien des Schweins gefunden worden (Nies et al., 2002b; Mitani et al., 2003). In polarisierter Madin-Darby Hundeniere II-Zellen (MDCKII), welche mit MRP5 cDNA transfiziert wurden, fand man MRP5 in basolateralen Membranbereichen (Wijnholds et al., 2000b).

In NHBEZ fanden wir MRP5 in der Membran lokalisiert. In PLZ dagegen konnte die Lokalisierung noch nicht eindeutig bestimmt werden. Wir fanden es intrazellulär als auch membranständig in Lungenzellen exprimiert.

Letztendlich zeigt die gefundene Zellmembranlokalisation aller untersuchten MRP Isoformen in A549 Tumorzellen, die als Testsystem verwendet wurden, entweder die Unfähigkeit differenziert auf verschiedene Umweltfaktoren zu reagieren oder andererseits die Fähigkeit auf potentiell schädliche Faktoren durch schnelle Ausscheidung dieser Substanzen (z.B. Chemotherapeutika) mit Hilfe membranlokalisierter Protein-Pumpen, standzuhalten.

Die Variabilität der Expressionsmuster der verschiedenen MRP Isoformen in menschlichen Lungenzellen, die Mitglieder derselben Familie sind, weist auf die hoch spezifische koordinierte Rolle dieser Proteine hin. Dies ist nötig, um eine optimale physiologische Leistung zu erreichen, aber auch um eine wirksame Komponente des Xenobiotika-Detoxifikationssystems zu bilden. Dabei erlangen die Zellen die Flexibilität, sich verschiedenen umliegenden Bedingungen anzupassen und somit den wechselnden Umweltfaktoren standzuhalten.

4.3. MRP1-vermittelte Transportaktivität

Lipophile Xenobiotika sowie endogene Verbindungen müssen häufig metabolisiert werden, bevor sie aus der Zelle entfernt werden können. Der Metabolismus dieser Verbindungen ist in zwei Phasen (Phase I und Phase II) geteilt. Der Prozess des Efflux der gebildeten Phase II Metaboliten kann als Phase III definiert werden (Bai et al., 2004).

Manche Xenobiotika (z.B. Metalle) haben nach ihrer Aufnahme in verschiedene Gewebe eine lange Halbwertszeit. Wenn, wie im Fall von Metallen, die Biodegradation nicht nennenswert stattfindet, wird die intrazelluläre Präsenz dieser Xenobiotika durch ihre Elimination bestimmt.

Viele Transportproteine werden in epithelialen Geweben zwischen apikaler und basolateraler Seite polarisiert exprimiert wodurch sich hochdifferenzierte physiologische Funktionen der verschiedenen Gewebe ergeben. Aus neuen Befunden ist zu folgern, dass die Resistenz von Lungeneithelien gegenüber toxischen Fremdstoffen auch von der zügigen Ausschleusung dieser Stoffe abhängt. Der MRP-vermittelte Transport ist eine der letzten Schritte im Prozess der zellulären Detoxifikation von Xenobiotika. Das klassische Modell der Detoxifikation umfaßt zwei Phasen: Aktivierung und Konjugation. Der Prozeß der Detoxifikation führt in der Regel von hydrophoben Verbindungen, welche leicht in die zelluläre Membran eindringen, zu mehr hydrophilen Verbindungen, welche ausgeschieden werden. Dies wird durch die Konjugation von hydrophilen Gruppen wie Glucuronat oder Glutathion erreicht. Die Akkumulation (intrazelluläre Anreicherung) von Produkten der Xenobiotika-Konjugation wird durch die dritte Stufe der Detoxifikation, den Export von Xenobiotika-Konjugaten aus dem Zytoplasma, verhindert. Dieser Schritt ist der wichtigste im Metabolismus von Xenobiotika, da einige Verbindungen während der ersten Phasen des Prozesses nicht detoxifiziert, aber aktiviert werden wie z.B. Aflatoxin B (Ishikawa, 1992; Rychlik et al., 2000).

Verschiedene Substrate von MRP1 sind durch die Verwendung mehrerer Prüfungssysteme identifiziert worden. Zum Beispiel können Akkumulation und Elimination von radioaktiv-markierten oder fluoreszierenden Xenobiotika in intakten Zellen gemessen werden. Die gemessenen Unterschiede in Akkumulation und Elimination werden als ein Maß der relativen MRP1-Transportaktivität bestimmt (Haimeur et al., 2004).

Die Membranpumpe MRP1 vermittelt den ATP-abhängigen Auswärtstransport von lipophilen, negativ geladenen Verbindungen, wie beispielsweise von Glutathionkonjugaten und Glucuronsäurekonjugaten körpereigener und körperfremder Verbindungen. Leukotrien C₄, ein körpereigenes Glutathionkonjugat, welches an der Entstehung von Bronchialasthma und Entzündungsreaktionen beteiligt ist, wird mit hoher Affinität von MRP1 transportiert (Leier et al., 1994). Auch Konjugate oder Komplexe verschiedener Zytostatika mit Glutathion oder Glucuronsäure sind Substrate des MRP1 in menschlichen Tumorzellen, wie z.B. die alkylierenden Zytostatika Melphalan und Chlorambucil und das Zytostatikum Vincristin. MRP1 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Tumorprävention, da es krebserzeugende Substanzen aus Zellen heraustransportiert, noch bevor eine Tumorzelle aus einer normalen Körperzelle entstehen kann. Dieses wurde beispielsweise für das Mycotoxin Aflatoxin B₁ gezeigt, welches von MRP1 als Konjugat oder Komplex mit Glutathion aus der Zelle transportiert wird. Auch einige anti-Tumor Agenzien werden durch MRP1 als Glutathion-Komplexe transportiert (Haimeur et al., 2004). MRP1 ist in der Lage, Resistenz gegen Schwermetalloxidationen wie Arsenit und Antimon zu verleihen (Cole et al., 1994; Rappa et al., 1997). Ein Bericht zeigte, dass MRP1 in GLC4/Sb30 Zellen (eine gegen Antimon resistente Zelllinie) als Resistenzfaktor induziert werden kann (Vernhet et al., 1999).

Diese Fähigkeit kann von klinischer Signifikanz sein wie das Beispiel Arsen Trioxid zeigt, welches ein Agens mit großer Wirksamkeit bei der Behandlung der akuten progranulozytischen Leukämie ist. Es wurde berichtet, dass die MRP1-überexprimierenden Zelllinien GLC4/Sb30 und GLC4/Adr eine 8-10 fach höhere Kreuzresistenz gegen Arsen-trioxid zeigen (Vernhet et al., 2001). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass MRP1 für die Resistenz gegen diese Verbindungen mitverantwortlich ist. Es wird angenommen, dass diese MRP1 vermittelte Resistenz gegenüber Arsen Trioxide oder anderen Oxidationen durch ihren Transport als Glutathion-Komplexe verursacht wird (Li et al., 1997; Legare et al., 2001).

Eine klinische Bedeutung der Induzierbarkeit von MRP1 vermittelter Toleranz oder Resistenz gegen Xenobiotika lässt sich erst mit der vollständigen Aufklärung der

physiologischen Funktion der MRP1-Aktivität abschätzen. Der beschriebene Transportmechanismus des organischen Anions Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) (Courtois et al., 1000; Haimeur et al., 2004) und die Hemmbarkeit von MRP1 durch MK-571 (Gekeler et al., 1995; Hirrlinger et al., 2002), einem Leukotrien LTC₄ Rezeptor Antagonist wurden ausgenutzt, um mittels Einzelzellfluorometrie die MRP1 Transportfunktion zu demonstrieren.

Diese Methode wurde als spezifisch für MRP1 angesehen, da die Beteiligung anderer MDR-Phänotyp vermittelnder Proteine wie MDR1 durch den MDR1-Inhibitor Verapamil, ausgeschlossen werden konnte. Dieser MRP1 Funktionsassay wurde zur Etablierung der inversen Einzelzellfluoreszenz-Mikroskopie genutzt. Ein speziell für CDF abgestimmter Umlenk- und Sperrfilter gestattet die Anregung der Fluoreszenz mit monochromatischem Licht und Messung des intrazellulären CDF Gehaltes. Die Lungentumorzellen A549 (AII-Zell ähnlich.), H358 (AII-Zell ähnlich) und H322 (Clara-Zell ähnlich) wurden auf Borosilikate-Kammerdeckgläschen im DMEM kultiviert und mit CDF versetzt. Um die höchsten noch nicht-toxischen CDF Konzentration zu finden, andererseits die Effekte so sichtbar wie möglich zu machen, wurde der MTT Test für die drei Tumorzelllinien durchgeführt. Im Ergebnis dieser Tests wurden CDF Konzentrationen von 4 mM in den nachfolgenden Experimenten verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von CDF in die Zellen nach den ersten zwei Stunden maximal ist, und die intrazelluläre Konzentration von CDF in den folgenden 2 Stunden schwächer ansteigt, bis schließlich nach 4 Stunden ein Plateau erreicht wird. MK-571 20µg/ml (Haimeur et al., 2004) verursachte eine deutliche Erhöhung des intrazellulären CDF-Gehalt. Damit konnte es gezeigt werden, dass MRP1 als ein Hindernis in der Therapie von neoplastischen Erkrankungen überwindbar ist, und dass das Problem der Resistenz von Tumorzellen gegen eine Vielzahl von Chemotherapeutika lösbar zu sein scheint. Dieses Prinzip könnte durch die kombinierte Verwendung von Chemotherapeutika und selektiv in Tumorzellen wirkenden MRP1-hemmenden oder -senkenden Modulatoren klinische Bedeutung finden.

4.4. Modulation der MRP1 Transportaktivität durch Glutathion-Pool-Regulatoren

Unter Phase I-Metabolismus versteht man die Einführung einer funktionellen Gruppe wie eine Hydroxyl-, Carboxyl- oder Amino-Gruppe. In Phase II unterliegen die Phase-I-Metaboliten einer Konjugationsreaktion. Eine wichtige Phase II Reaktion wird durch Glutathion-S-Transferase katalysiert. Glutathion-Konjugate liegen unter physiologischen

Bedingungen als Anionen vor und werden durch einen ATP abhängigen Prozess aus den Zellen heraus transportiert. (Bai et al., 2004).

Das Glutathion ist seit einigen Jahren Gegenstand umfangreicher Forschungen. Im Normalzustand besteht im Körper ein Gleichgewicht zwischen reduziertem und oxidiertem Glutathion. Enzyme des Glutathion-Systems spielen eine wichtige Rolle in diesem Gleichgewicht und haben unterschiedliche Aufgaben: die Glutathion-Peroxidase beispielsweise eliminiert aggressive Peroxide, die Glutathion-Reduktase hat einen Einfluß auf Elektronen-Transferreaktionen.

MRP1 wird als ATP-abhängige Glutathion-S-Konjugat-Exportpumpe (GS-X-Pumpe) für mehrwertige organische Anionen wie Cysteinyl-Leukotriene, GSH Disulfid und verschiedene GSH-Konjugate beschrieben (Versantvoort et al., 1995, Jedlitschky et al., 1994 Bradshaw et al., 1998; and Gottesman et al., 2002). Die MRP1-Funktion erfordert physiologische Mengen an GSH, MRP1 ist darüber hinaus an einem GSH-Xenobiotikum Gegentransport beteiligt, welcher Resistenz gegen Substanzen liefern kann, die nicht direkt an GSH gebunden sind (Borst et al., 2000; Mao et al., 2000).

Die Beteiligung von GSH an der Erkennung, der Bindung und dem Transport von bestimmten MRP1 Substraten und Hemmstoffen ist eine faszinierende Eigenschaft dieses Transporters (Haimeur et al., 2004). In Tumorzellen wird häufig eine simultan erhöhte Expression von MRP1 und γ -Glutamylcystein-Synthetase gefunden, die die Synthese von GSH katalysiert (Kuo et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Zytotoxizität von NAC und BSO, in den menschlichen Tumorzelllinien A549, H322 und H358 mittels Vitalitätstests (MTT) durchgeführt.

Um zu klären, ob MRP1 GSH für den aktiven Transport von verschiedenen Substraten braucht, verwendeten wir 5-(6)-carboxy-2',7'-dichloro-fluorescein (CDF), einen fluoreszierenden Farbstoff, der spezifisch von MRP1 transportiert wird. Für diesen Zweck verwendeten wir unseren etablierten nicht-invasiven in situ Fluoreszenz-Assay für adhärenzte Zellen.

Alle Reagenzien einschließlich des MRP1 Inhibitors MK571 wurden auf eine mögliche Toxizität für die Tumorzellen in den für die beschriebenen Versuche gewählten Konzentrationen getestet. NAC präinkubierte Zellen in Kultur zeigten eine signifikante Verminderung der CDF Fluoreszenzsignale im Vergleich zur Kontrolle. Offensichtlich ist der Efflux von CDF nach Behandlung der Zellenkultur mit NAC erhöht. Andererseits

zeigten BSO präinkubierte Zellen eine Zunahme der CDF Fluoreszenzsignale. BSO hemmt also den Efflux von CDF. Um diese Wirkungen für MRP1 zu spezifizieren, wurden die menschlichen Tumorzelllinien A549, H322 und H358 bis zu Subkonfluenz kultiviert und dann mit NAC und BSO zusätzlich zu dem MRP1 Hemmstoff MK571 inkubiert.

Der Unterschied in der Intensität der Fluoreszenzsignale zwischen den NAC präinkubierten Zellenkulturen und der Kontrolle war etwa 40% in allen Kulturen. Diese starke Erhöhung des Efflux von CDF zeigt eine deutlich erhöhte Transportaktivität von MRP1. Andererseits, zeigten die BSO präinkubierten Zellen, verglichen mit der Kontrolle, eine signifikante Zunahme der gemessenen intrazellulären Fluoreszenzsignale. Die Fluoreszenz war etwa um 25% erhöht. Das ist ein deutlicher Beweis dafür, dass BSO die Transportaktivität von MRP1 hemmt. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, daß die Transportaktivität von MRP1 GSH-abhängig ist, deutlich.

Um zu beweisen, dass der Transport von CDF durch MRP1 vermittelt wird, wurde der Inhibitor MK571 zur Hemmung des MRP1-vermittelten Transports verwendet. Bei den MK571 behandelten Proben war die Fluoreszenz verglichen mit der Kontrolle um etwa 45% erhöht. Deshalb konnten wir CDF als MRP1 Substrat charakterisieren, da durch Hemmung dieses Transportproteins der Efflux von CDF unterbrochen wird. In diesem Fall spielt der GSH-Gehalt der Zellen keine Rolle für die Transportaktivität, und die Modulation von GSH hat somit nur geringfügige Auswirkungen.

Der intrazelluläre GSH-Gehalt ist eng mit der MRP vermittelten Multidrug-Resistenz verbunden, da GSH direkt mit der MRPs interagiert. Diese Interaktion bewirkt eine Änderung der MRP Struktur, was die Bindung und/oder den Transport von Zytostatika ermöglicht. Alternativ können GSH und Zytostatika spontan einen Komplex bilden, der sich wie ein MRP Substrat verhält (Loe et al., 1998; Salerno et al., 2003).

Interessanterweise wurde gezeigt, dass MRP auch Verbindungen transportiert, die keine Konjugate mit Glutathion (z.B. Vincristin) oder anderen organischen Anionen bilden. Jedoch war deren Transport von der Anwesenheit von GSH abhängig. Dies öffnete das Feld zu Vorschlägen, dass MRP1 Xenobiotika auch im co-Transport mit GSH extrudieren vermag (Loe et al., 1996).

Die Rolle von GSH im MRP1 vermittelten Transport scheint komplex zu sein, und die genauen mechanistischen Details sind noch nicht geklärt. Um mehr über die Rolle von Glutathion bei diesen Transportaktivitäten herauszufinden, wurde im Rahmen dieser Arbeit

der Glutathion-Pool mit einem Inhibitor (BSO) und einem Promotor (NAC) der Glutathion -Synthese gesenkt beziehungsweise gesteigert.

Da die toxische Wirkung einiger Xenobiotika eng mit der Verfügbarkeit des Glutathionpools verbunden ist, war daher zu prüfen, ob der Glutathionpool und die Aktivität von MRP über Glutathionpool Modulatoren (BSO und NAC) reguliert werden kann. Buthionine sulfoximine (BSO) ist ein starker Hemmstoff der Glutamylcystein-synthetase, dem limitierenden Enzym der GSH Biosynthese, welches die Synthese von γ -Glutamylcystein, die erste Stufe in der intrazellulären Glutathion-Synthese, katalysiert.

Behandlung von entweder durch Behandlung mit Medikamenten selektierten, oder transfizierten resistenten Zellen mit BSO erschöpft deren GSH-Pool nachhaltig und lässt sie unter anderen äußerst sensitiv gegenüber Zytostatika werden, die von MRP1 transportiert werden können (Cole et al., 1998; Benderra et al., 2000; Lewandowicz et al., 2002 and Rappa et al., 2003).

Deshalb kann Buthionine-Sulfoximine als indirekter Sensibilisierer für MRP1-überexprimierende Zellen gegenüber bestimmten zytotoxischen Mitteln betrachtet werden.

Würde über selektiver GSH Modulatoren eine Senkung des zellulären GSH Gehalts erreicht, könnten Tumorzellen für die Zytotoxizität von Chemotherapeutika sensibilisiert werden (Chen et al., 1998). Allerdings ist durch eine GSH-Depletion die wichtigste zelluläre Abwehrfunktion gegenüber reaktiven Intermediaten unterschiedlichster Herkunft mitbetroffen. Es ist daher sehr fraglich, ob ein solcher Ansatz therapeutisch nutzbar wäre.

Der intrazelluläre Glutathion-Gehalt kann durch pharmakologische Manipulation verändert werden. Von N-Acetylcystein, als Sulphydryl-Quelle (SH), wird angenommen, daß es ein Vorstufe (Präkursor) von Glutathion ist, und das Niveau des Glutathion-Pools in der Zelle durch Cystein-Zufuhr erhöht (Jurima-Romet et al., 1991; Cotgreave, 1997).

Die Aufklärung des Expressionsmusters, der Substratspezifität sowie der Transportaktivität der verschiedenen MRP-Isoformen ermöglichen die Entwicklung von Modulatoren, mit denen eine MRP-vermittelte Zytostatika-Resistenz überwunden werden kann.

In der vorliegenden Arbeit gelang es nicht nur die Expression von MRP1-5 in der menschlichen Lunge nachzuweisen, sondern auch Informationen über ihre Lokalisation in der Zelle zu erlangen. Die jeweilig nachgewiesene membranständige oder intrazelluläre Expression der MRP-Isoformen sollte einen ersten Schritt bei der Aufklärung ihrer eigentlichen physiologische Funktion in der Lunge darstellen. Die Experimente zur Transportaktivität mittels Einzelzellfluorimetrie zeigen, dass MRP1 eine bedeutende Rolle bei der Xenobiotika-Detoxifikation spielt. Dass die Aktivität dieses Transporters durch

Modulatoren des Glutathion-Pools beeinflussbar ist, beweist die Abhängigkeit der MRP1-Funktion vom Glutathion-Level in der Zelle. Diese Modulation sowie die Bestimmung des Substratspektrums der einzelnen MRP-Isoformen sollte klinische Bedeutung bei der Erstellung einer kombinierten Chemotherapie erlangen.

Zusammenfassung

Die Inhalation stellt den wesentliche Aufnahmeweg des Körpers für gasförmige oder partikelgebundene Substanzen einschließlich Staub dar. Die Lunge ist somit hoch exponiert gegenüber Schadstoffen und benötigt so ein wirksames Abwehr-System. MRP-Transportproteine stellen einen Teil dieser Abwehr dar, in dem sie zum Efflux von Schadstoffen aus der Zelle beiträgt. Die Befunde über die Rolle von MRP-Transportern in zahlreichen medizinisch relevanten Prozessen, wie der Auslösung von Krankheiten oder der Ausbreitung von Antibioikaresistenzen, hat zur Erkenntnis geführt, dass mögliche therapeutische Maßnahmen ein Verständnis des Wirkmechanismus dieser Systeme voraussetzen. Über die Rolle und Expression dieser Transportproteine in der humanen Lunge ist die Datenlage gering. Um zum Verständnis über die Wirkung dieser wichtigen Transportproteine in der Lunge beizutragen, wurden die Untersuchungen, welche in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, durchgeführt.

Die serumfreie Kultur von primären humanen Lungezellen aus Resektionsmaterial von Lob- oder Pneumektomien ist möglich. Die immun-histochemische Charakterisierung der Monolayer, welche aus Bronchialgewebe sowie aus peripherem Lungengewebe entwickelt wurden, zeigten eine fast 100%ig reine Epithelzellkulturen. Der Nachweis als Epithelzellkultur wurde mittels Markern für Zytokeratine geführt. Der Reinheitsgrad der Zellkultur konnte durch Marker gegen glatte Muskelzellen und Bindegewebszellen bestimmt werden.

In immunohistochemischen Analysen konnte die Expression von MRP1-5 in NHBEZ, PLZ und der Tumorzelllinie A549 nachgewiesen werden. Alle untersuchten MRP-Isomere (MRP1 – 5) wurden in der Tumorzelllinie A549 ausschließlich in der Zellmembran exprimiert gefunden. In den normalen humanen Bronchialzellen zeigte sich die Lokalisierung der untersuchten MRP- Isoformen deutlich differenzierter. So wurden MRP2, 4 und 5 intrazellulär, mit höherer Dichte in intrazellulären Membran von Vesikeln gefunden, während MRP1 und 3 ausschließlich in der Zellmembran exprimiert erschienen. In den untersuchten Lungenzellen wurden MRP1, 3 und 5 in der Zellmembran und MRP2 und 4 intrazellulär exprimiert gefunden.

Es gelang humane Lungenzellen mittels Membraninserts unter *in vivo* nahen Bedingungen zu kultivieren. Im Vergleich zu unter klassischen, Untertauchbedingungen kultivierten Zellen, zeigten die membrangewachsenen Zellen eine deutlich andere Morphologie. Darüber hinaus wiesen sie einen höheren epithelialen Charakter auf.

Mittels Confokal-LASER-Scanning Mikroskopie konnte eine in den klassischen Untertauchkulturen nicht vorhandene polarisierte Verteilung der MRP1 und 2-Proteine in den Membran-gewachsenen Kulturen nachgewiesen werden. MRP1 war deutlich im basolateralen, dem Medium zugewandten Bereich, jedoch nicht im apikalen Bereich der Zelle exprimiert. MRP2 wurde als Membranprotein lokalisiert.

Bislang ist die MRP1 -Regulierung in Lungenzellen, sowie eine mögliche Modulation durch chronische inhalative Schadstoffexpositionen unbekannt. Das Multidrug-Resistance-associated protein MRP-1 ist in der Lage durch einen aktiven Transport unter Hydrolyse von ATP zahlreiche Xenobiotika und intrazellulär gebildete Metabolite durch die Zellmembran in den Extrazellulärraum zu transportieren. Durch die Etablierung einer Methode zur Bestimmung der MRP-1 Transportaktivität mittels Zell-Fluorometrie für adhärent wachsende Zellen konnte gezeigt werden, dass MRP1 funktionell aktiv ist. Unter Nutzung der Einzelzellfluorimetrie wurde mittels Carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein (CDF) die Funktion des MRP-1 nachgewiesen. Der etablierte Inhibitor der MRP-1 Funktion MK571 führte zu einer spezifischen Hemmung des MRP-1 und damit des MRP1 abhängigen CDF Effluxes. Dabei konnte eine Beteiligung von MDR-1 am Transport von CDF mittels Co-Inkubation mit dem MDR1-spezifischen Inhibitor Verapamil ausgeschlossen werden. Die Einstellung des Gleichgewichtes in Verapamil-co-inkubierten Zellkulturen vollzog sich im gleichen Zeitraum wie in inhibitorfreien Kontroll-Kulturen und ist somit völlig unabhängig von Verapamil. Man kann somit davon ausgehen, dass ein Pgp –unabhängiger Transport von CDF durch MRP-1 vorliegt.

Regulatoren des Glutathion-Pools – Buthionin Sulfoximin (BSO) und N-Acetylcystein (NAC) – beeinflussen die Aktivität des MRP-1 vermittelten Transportes deutlich. Durch Regulierung des Glutathionpegels kann diese Transportaktivität gesteuert werden und eröffnet somit die Möglichkeit der Überwindung der Resistenz in der Zelle.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten nicht nur die Expression verschiedener MRP-Isoformen in humanen Lungenzellen, sondern geben auch deutliche Hinweise, dass MRPs in der Zelle funktionell aktiv sind. Diese Befunde weisen auf eine mögliche klinische Bedeutung des MRP-vermittelten zellulären Efflux für Chemotherapie-Resistenzen und Xenobiotika-Toleranz hin.

Literaturverzeichnis

- Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M (1996).** Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet.* 5(10):1649-55.
- Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG (1995).** Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. *Cancer Res.* 55(1):102-10
- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. (1999).** Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:361-398.
- Bai J, Lai L, Yeo HC, Goh BC, Tan TM (2004).** Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates efflux of bimanone-glutathione. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* Volume 36, Issue 2 , 247-257
- Bakos E, Hegedus T, Hollo Z, Welker E, Tusnady GE, Zaman GJ, Flens MJ, Varadi A, Sarkadi B (1996).** Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem.* 271(21):12322-12326.
- Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Varadi A, Sarkadi B (1998).** Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem.* 273(48):32167-75
- Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady GE, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B (2000).** Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci.* 113 Pt 24:4451-4461.
- Ballatori, N, Rebbeor, JF (1998).** Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin. Liver Dis.* 18, 377-387, Review
- Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR , Kruh GD (1998).** Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1735-1741.
- Belinsky MG, Chen ZS, Shchavaleva I, Zeng H, Kruh GD (2002).** Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res.* 62(21):6172-7.

- Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, Pastan I (2002).** MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(10):6997-7002.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (1999).** The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1461:347-357.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000).** A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1295-1302, Review.
- Brechot 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.* 46(4):513-517.
- Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D (1996).** cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 271: 15091-15098.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987).** Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47(4):936-42.
- Childs S and Ling V (1994).** The MDR superfamily of genes and its biological implications. *Important Adv Oncol.* 21-36.
- Clark JM(1988).** Pulmonary limits of oxygen tolerance in man. *Exp Lung Res.*;14 Suppl:897-910.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. (1992).** Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 258, 1650–1654.
- Cole SP, Deeley RG(1998).** Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays.* 20(11):931-40
- Cornwell MM, Pastan I, Gottesman MM (1987).** Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem.* 262(5):2166-70.

- Courtois A, Payen L, Lagadic D, Guillouzo A, Fardel O (1999).** Evidence for a multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)-related transport system in cultured rat liver biliary epithelial cells. *Life Sci.* 64(9):763-74.
- Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER (1982).** Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis.* 126(2):332-7.
- Cui Y, Konig 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.* 55(5):929-37.
- Dahl AR, Bond JA, Petridou-Fischer J, Sabourin PJ, Whaley SJ (1988).** Effects of the respiratory tract on inhaled materials. *Toxicol Appl Pharmacol.* 93(3):484-92.
- Dano K (1973).** Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 25;323(3):466-83
- Dean M and Allikmets R (1995).** Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev.* 5:779-785.
- Dean M, Hamon Y, and Chimini G (2001).** The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 42:1007-1017 Review.
- Dobbs LG, Pian MS, Maglio M, Dumars S, Allen L (1997).** Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *Am J Physiol.* 273:L347-354.
- Efferth, T. (2001).** The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr. Mol. Med.* 1, 45-65.
- Ehrmann M, Ehrle R, Hofmann E, Boos W, Schlosser A (1998).** The ABC maltose transporter. *Mol Microbiol.* 29(3):685-94
- Evers R, Zaman GJ, van Deemter L, Jansen H, Calafat J, Oomen LC, Oude Elferink RP, Borst P, Schinkel AH (1996).** Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest.* 97(5):1211-1218.
- Fath MJ, Kolter R (1993).** ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev.* 57(4):995-1017. Review.

- Fernandes DJ, Danks MK, Beck WT. (1990).** Decreased nuclear matrix DNA topoisomerase II in human leukemia cells resistant to VM-26 and m-AMSA. *Biochemistry.* 29, 4235-4416.
- 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.* 148, 1237–1247.
- Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J (1995).** The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 208(1):345-52.
- George JAS, Harkema JR, Hyde DM, Plopper CG (1993).** Cell populations and structure/function relationship of cells in the airway. In: Gardner DE, Crapo JD, McClellan RO (Eds): *Toxicology of the lung.* Raven Press, New York, S. 81-110.
- Gerlier D, Thomasset N (1986).** Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 94(1-2):57-63.
- Gottesman M M and Pastan I (1993).** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 62:385-427. Review.
- Gottesman MM (2002).** Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 53:615-627.
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SPC (2004).** The MRP-Related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Current Drug Metabolism.* 5:21-53 Review.
- Higgins CF (1992).** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 8:67-113.
- Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Gerlach JH, Grant CE, Deeley RG, Cole SP (1997).** Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J Biol Chem.* 272(38):23623-23630.
- Hipfner DR, Deeley RG, Cole SPC (1999).** Structural, mechanistic a clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta.* 1461:276-359.

- Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y (1999).** Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem.* 274:15181-15185.
- Hirrlinger J, König J, Dringen R (2002).** Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *Neurochem.* 82:716-719.
- Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa J R , Kruh G D (2001).** Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.* 162:181-191.
- Ishikawa T (1992).** The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci.* 17:463–8.
- Jain L, Chen XJ, Ramosevac S, Brown LA, Eaton DC (2001).** Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280(4):L646-658.
- Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D (2000).** The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 275(39):30069-74.
- Jenner P and Marsden CD (1986).** The actions of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in animals as a model of Parkinson's disease. *J Neural Transm. Suppl,* 20, 11-39.
- Jiang X, Ingbar DH, O'Grady SM (2001).** Adrenergic regulation of ion transport across adult alveolar epithelial cells: effects on Cl⁻ channel activation and transport function in cultures with an apical air interface. *J Membr Biol.* 181(3):195-204.
- Johnson LG, Dickman KG, Moore KL, Mandel LJ, Boucher RC (1993).** Enhanced Na⁺ transport in an air-liquid interface culture system. *Am J Physiol.* 264:L560-565.
- Kanai Y, Endou H (2003).** Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J Toxicol Sci.* 28(1):1-17. Review.
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R and Keppler D (1996).** Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology,* 23, 1061-1066.

- Keppler D, König J (1997).** Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP / cMOAT) gene in liver *FASEB J.* 11, 509-516.
- Keppler D, König J (2000).** Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. *Semin. Liver Dis.* 20, 265-272.
- Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson CA and Sugiyama Y (1998).** cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett.*, 433, 149-152.
- Klein I, Sarkadi B, Varadi A (1999).** An inventory of the human ABC proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1461:237-262.
- Knox P, Uphill PF, Fry JR, Benford J, Balls M (1986).** The FRAME multicentre project on in vitro cytotoxicology. *Food Chem Toxicol.* 24(6-7):457-63.
- Kohsa K, Yamada H, Sugihara H (1996).** Influence of air exposure treatment on alveolar type II epithelial cells cultured on extracellular matrix. *ell Struct Funct.* 21(1):81-89.
- Konno T, Ebihara T, Hisaeda K, Uchiumi T, Nakamura T, Shirakusa T, Kuwano M, Wada M (2003).** Identification of domains participating in the substrate specificity and subcellular localization of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *J Biol Chem*, 278, 22908-22917.
- Kool M, de Haas M, Scheffer G L, Scheper R J, van Eijk M J T, Juijn J A, 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.* 57:3537-3547.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F and Borst P (1999a).** Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* 59:175-182.
- 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 and Borst P (1999b).** MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6914-6919.
- Krishnamachary N, Center MS (1993).** The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res.* 15;53(16):3658-61

- Kruh GD and Belinsky MG (2003).** The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* (2003) 22, 7537–7552.
- 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-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. *Biochem Pharmacol.* 55(5):605-15
- Lai L, Tan TM (2002).** Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem J.* 361(Pt 3):497-503.
- Lampidis TJ, Munck JN, Krishan A, Tapiero H (1985).** Reversal of resistance to rhodamine 123 in adriamycin-resistant Friend leukemia cells. *Cancer Res.* 45(6):2626-31.
- Lechner JF and La Veck MA(1985).** A serum free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J Tissue CULT Methods.* 9(2) 43-48.
- Lee k, Belinski M G, Bell D W, Testa J R, Kruh G D (1998).** Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res.* 58:2741-2747.
- Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD (2000).** Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J. Natl. Cancer Inst.,* 92, 1934-1940.
- Lehmann T, Kohler C, Weidauer E, Taeye C, Foth H (2001).** Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology.* 167(1):59-72.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D (1994).** The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem.* 269(45):27807-10
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2001).** Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology.* 167(1):3-23. Review
- Ling V, Thompson LH (1974).** Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol.* 83(1):103-16
- Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D., Bates, S. E. (2001).** From MDR to MXR: new understandings of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 931-959.

- Loe DW, Deeley, RG , Cole, SP (1998).** Characterization of vincristin transport by the (M)R 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* 58:5130-5136.
- Martin WJ (1993).** Mechanisms of drug-induced lung disease. *J Lab Clin Med.* 121(2):195-6.
- McAlear C, Breen M A, White N L, Matthews N (1999).** pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* 274:23541-23548.
- Miller DS, Nobmann SN, Gutmann H, Toeroek M, Drewe J, Fricker G (2000).** Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol.* 58(6):1357-67.
- Mitani A, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K (2003).** Expression of multidrug resistance protein 4 and 5 in the porcine coronary and pulmonary arteries. *Eur J Pharmacol.* 466:223-224.
- Moll R (1993).** Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors *Veröff Pathol.*;142:1-197.
- Moller JV and Sheikh MI (1983).** Renal organic anion transport system: pharmacological, physiological, and biochemical aspects. *Pharmacol Rev* 34:315-358
- Mossman BT (1983).** In vitro approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ Health Perspect.* 53:155-61. Review.
- Mottino AD, Hoffman T, Jennes L and Vore M. (2000).** Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 293(3):717-723.
- Muller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL (1994).** Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26):13033-7
- Muller M, Yong M, Peng XH, Petre B, Arora S, Ambudkar SV (2002).** Evidence for the role of glycosylation in accessibility of the extracellular domains of human MRP1 (ABCC1). *Biochemistry.* 41(31):10123-10132.

- Nare B, Prichard RK, Georges E (1994).** Characterization of rhodamine 123 binding to P-glycoprotein in human multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol.* 45(6):1145-52.
- Neyfakh AA (1988).** Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp Cell Res.* 174(1):168-76.
- Nies AT, König J, Cui Y, Brom M, Spring H, Keppler D (2002a).** Structural requirements for the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *Eur J Biochem.*, 269, 1866-1876.
- Nies AT, Spring H, Thon WF, Keppler D and Jedlitschky G (2002b).** Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system. *J. Urol.*, 167, 2271-2275.
- Paulusma C C, Bosma P J, Zaman G J R, Bakker C T M, Otter M, Scheffer G L, Scheper R J, Borst P and Oude Elferink R P J (1996).** Congenital Jaundice In rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Acience* 271:1126-1128.
- Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP (1997).** A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 25(6):1539-42.
- Pei QL, Kobayashi Y, Tanaka Y, Taguchi Y, Higuchi K, Kaito M, Ma N, Semba R, Kamisako T, Adachi Y (2002).** Increased expression of multidrug resistance-associated protein 1 (mrp1) in hepatocyte basolateral membrane and renal tubular epithelia after bile duct ligation in rats. *Hepatology Res.* 22(1):58-64.
- Plopper CG (1993).** Pulmonary bronchiolar epithelial cytotoxicity:microanatomical considerations. In: Gram TE (Ed): *Metabolic activation and toxicity of chemical agents to lung tissue and cells.* Pergamon Press, new York, Oxford, Seoul, Tokyo, S. 1-24.
- Prime-Chapman HM, Fearn RA, Cooper AE, Moore V, Hirst BH (2004).** Differential MRP1-6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* Published as DOI:10.1124/jpet. 104.068775.
- Pritchard JB and Miller DS (1993).** Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev* 73:765-796
- Qian YM, Song WC, Cui H, Cole SP, Deeley RG (2001).** Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem.* 276(9):6404-11.

- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P (2003).** Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol.*63(5):1094-103.
- Roelofsen H, Müller M, Jansen PLM (1997a).** Regulation of organic anion transport in the liver. *Yale J. Biol. Med.* 70:435-445.
- Roelofsen H, Vos TA, Schippers IJ, Kuipers F, Koning H, Moshage H, Jansen PL, Muller M (1997b).** Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroent.* 112:511-521.
- Rost D, Mahner S, Sugiyama Y and Stremmel W (2002).** Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 282, G720-6.
- Roum JH, Aledia AS, Carungcong LA, Kim KJ, Borok Z (2001).** Extracellular glutathione inhibits oxygen-induced permeability changes in alveolar epithelial monolayers. *Appl Physiol.* 91(2):748-54.
- Rychlik B, Pulaski L, Sokal A, Soszynski M, Bartosz G (2000).** Transport of organic anions by multidrug resistance-associated protein in the erythrocyte. *Acta Biochim Pol.* 47(3):763-72. Review.
- Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W and 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.* 8: 1213-1221.
- Scheffer GL, Kool M, Heijn M, de Haas M, Pijnenborg AC, Wijnholds J, van Helvoort A, de Jong MC, Hooijberg JH, Mol CA, van der Linden M, de Vree JM, van der Valk P, Elferink RP, Borst P, Scheper RJ (2000).** Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 60(18):5269-5277.
- Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Muller M, Postma DS, Timens W, van der Valk P, de Vries EG, Scheper RJ (2002).** Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol.* 55(5):332-339.
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JM, Pijnenborg AC, Bosman DK, Elferink RP, van der Valk P, Borst P, Scheper RJ (2002).** Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest.* 82, 193-201.

- Scheutz J D, Connelly M C, Sun D, Paibir S G, Flynn P M, Srinivas R V, kumar A and Fridland A (1999).** MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med.* 5:1048-1051.
- Sekine T, Cha SH, Endou H (2000).** The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflugers Arch.* 440(3):337-50. Review.
- Sharma R, Awasthi YC, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S (2003).** Energy dependent transport of xenobiotics and its relevance to multidrug resistance. *Curr Cancer Drug Targets.* 3(2):89-107.
- Slovak ML, Ho JP, Bhardwaj G, Kurz EU, Deeley RG, Cole SP (1993).** Localization of a novel multidrug resistance-associated gene in the HT1080/DR4 and H69AR human tumor cell lines. *Cancer Res.* 53(14):3221-5.
- Stehfest E, Torky A W, Glahn F and Foth H (2002).** MRP expression and modulation of/by Glutathione in human Lung cells. *Toxicology Letters* Vol. 135. Suppl. 1, 273 p. 141
- Stehfest E, Torky A.W. Foth H (2003).** Expression of MRP in Human Lung Cells and Functional Activity after amodulation of Glutathione. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367. Suppl, 609 R156
- 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.* 279, R1495-503.
- Stride BD, Valdimarsson G, Gerlach JH, Wilson GM, Cole SP, Deeley RG (1996).** Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug resistance protein, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Pharmacol.* 49(6):962-71.
- Suzuki T, Nishio K, Sasaki H, Kurokawa H, Saito-Ohara F, Ikeuchi T, Tanabe S, Terada M and Saijo N (1997).** cDNA cloning of a short type of multidrug resistance protein homologue, SMRP, from a human cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 238:790-794.
- Suzuki T, Sasaki H, Kuh HJ, Agui M, Tatsumi Y, Tanabe S, Terada M, Saijo N, Nishio K (2000).** Detailed structural analysis on both human MRP5 and mouse mrp5 transcripts. *Gene.* 242:167-173.

- Takeda M, Tojo A, Sekine T, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H (1999).** Role of organic anion transporter 1 (OAT1) in cephaloridine (CER)-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 56, 2128-2136.
- Tammur J, Prades C, Arnould I, Rzhetsky A, Hutchinson A, Adachi M, Schuetz JD, Swoboda KJ, Ptacek LJ, Rosier M, Dean M, Allikmets R (2001).** Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene.* 273(1):89-96.
- Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M (1996).** A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* 56(18):4124-9.
- Toh, S., Wada, M., Uchiumi, T., Inokuchi, A., Makino, Y., Horie, Y., Adachi, Y., Sakisaka, S., Kuwano, M. (1999).** Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 739-746.
- Tsuji, H., König, J., Rost, D., Stöckel, B., Leuschner, U., Keppler, D. (1999).** Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin- Johnson syndrome. *Gastroenterol.* 117, 653-660.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y (1981).** Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 41(5):1967-72.
- Twentyman PR, Rhodes T, Rayner S (1994).** A comparison of rhodamine 123 accumulation and efflux in cells with P-glycoprotein-mediated and MRP-associated multidrug resistance phenotypes. *Eur J Cancer.*;30A(9):1360-9.
- Uchiumi T, Hinoshita E, Haga S, Nakamura T, Tanaka T, Toh S, Furukawa M, Kawabe T, Wada M, Kagotani K, Okumura K, Kohno K, Akiyama S, Kuwano M (1998).** Isolation of a novel human canalicular multispecific organic anion transporter, cMOAT2/MRP3, and its expression in cisplatin-resistant cancer cells with decreased ATP-dependent drug transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 252, 103-110.
- Ullrich KJ (1997).** Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J Membr Biol* 158:95-107
- Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG (2000).** Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279(2):F216-32. Review.

- Van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, Russel FG (2002).** The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J. Am Soc Nephrol.* 13, 595-603.
- Van Luyn MJ, Muller M, Renes J, Meijer C, Scheper RJ, Nienhuis EF, Mulder NH, Jansen PL, De Vries EG (1998).** Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1. *Int J Cancer.* 76(1):55-62.
- Vellonen KS, Honkakoski P, Urtti A (2004).** Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur J Pharm Sci.* 23(2):181-8.
- Versantvoort CH, Rhodes T, Twentyman PR (1996).** Acceleration of MRP-associated efflux of rhodamine 123 by genistein and related compounds. *Br J Cancer.* 74(12):1949-54
- Wielinga PR, van der Heijden I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J, Borst P (2003).** Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem.* 278(20):17664-71..
- Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van der Valk M, Schinkel AH, Scheper RJ, Breimer DD, Borst P (2000a).** Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest.* 105(3):279-285.
- Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P (2000b).** Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7476-7481.
- 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.* 4(9):2279-2289.
- Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi S, Ishikawa T (2001).** Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochem Biophys Res Commun.* 288(4):933-9.
- Young, J., Holland, I. B. (1999).** ABC transporters: bacterial exporters – revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 177-200.
- Zimniak P (1993).** Dubin-Johnson and Rotor syndromes: molecular basis and pathogenesis. *Semin. Liver. Dis.* 13, 248-260.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding-cassette
AECG	<u>A</u> irway <u>E</u> pithelial <u>C</u> ell <u>G</u> rowth Medium
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	Buthionin Sulfoximin
bzw.	Beziehungsweise
CDF	Carboxy-2,7-dichlorofluorescein
Cy3	Indocarbocyanin
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agl's <u>m</u> edium
FITC	<u>F</u> luorescein- <u>I</u> sothiocyanat
FKS	Fetales Kälbserum
GSH	Glutathion
KDa	kilo Dalton
MDR	Multidrug resistance
MK-571	(3-[3-[2-(7-chloro-2-chinolinyl) ethenyl]-phenyl] 3-(dimethylamino-3-Oxopropyl) thio-methyl-thio-propionsäure)
MRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug resistance-related protein
NAC	N-Acetylcystein
NHBEZ	Normale humane Bronchialepithelzellen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
P-gp	P-Glykoprotein
PLZ	Periphere Lungenzellen
Rho-123	Rhodamin 123
Tab	Tabelle
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent ml /100ml
z.B.	zum Beispiel

Thesen zur Dissertation

- Normale humane Bronchialepithelzellen und periphere Lungenzellen können aus Resektionsmaterial von histologisch normalem Lungengewebe angelegt werden. Die Explantkulturen zeigen über mehrmonatige Gesamtdauer ein stabiles morphologisches Bild.
- Die topographische Verteilung von Lungenzellen aus proximalen und distalen Lungenabschnitten kann partiell in vitro mit differenzierter Morphologie der Kulturen nachgebildet werden.
- Die Expression von MRP-Isoformen 1 bis 5 kann in Lungenzellkulturen in situ immunhistochemisch nachgewiesen werden. Mittels Laser-Scanning Mikroskopie kann die intrazelluläre Verteilung von MRP Proteinen an kultivierten Lungenzellen nachgewiesen werden.
- Die MRP1 Transportaktivität kann in vitro an adhärenenten Zellen in der Einzelzellfluorometrie quantitativ erfasst werden. Damit steht ein Instrument zur nicht-invasiven Messung an vitalen Zellkulturen zur Verfügung, und es kann zur Ermittlung von Zeitreihen im Konzentrationsverlauf von Indikatorsubstanzen genutzt werden.
- Normale bronchiale Epithelzellen lassen sich in vitro zur Ausbildung eines polarisierten Phänotyps anregen, wenn die Kulturen in einer dry-wet Kondition gehalten werden.
- Alle untersuchten MRP-Isoformen 1-5 werden in der Tumorzelllinie A549 ausschließlich in der Zellmembran gefunden.
- In normalen humanen Bronchialepithelzellen ist die Expression und intrazelluläre Verteilung zwischen den Isoformen unterschiedlich. MRP 2, 4 und 5 werden intrazellulär in der Membran von Vesikeln gefunden, während MRP 1 und 3 ausschließlich in der Zellmembran vorhanden ist.

- In Bronchialepithelzellen, welche in der dry-wet Bedingung kultiviert wurden, zeigte sich eine deutliche Polarisierung in der Verteilung von MRP 1 Protein, das in der basolateralen Zellmembran nicht aber in der apikalen Membran zu finden ist.
- Das MRP1 Protein ist funktionell aktiv und kann durch den Leukotrien-Inhibitor MK571 gehemmt werden.
- Regulatoren des Glutathion-Pools – Buthionin-Sulfoximin und N-Acetylcystein – beeinflussen die Transportaktivität deutlich. Durch Regulierung des Glutathiongehaltes der Zellen wird die MRP Aktivität kurzfristig gesteuert.
- MRP-Transporter können Schlüsselprozesse für verschiedene toxische Mechanismen sein, da sie durch externe Faktoren moduliert werden können und auf zellulärem Niveau in die Wirkungskette toxischer Wirkungen eingreifen, ohne mit dem Target der Wirkung interagieren zu müssen. Die wesentliche Konsequenz einer Aktivitätssteigerung ist ein schnellerer Export potentiell toxischer Substanzen – daher ist vorwiegend eine Schutzfunktion zu erwarten.

Publikationen der Ergebnisse (Stand Oktober 2004)

Originalarbeiten

Torky A.W., Stehfest E., Raemisch A., Viehweger K., Täge C. and Foth H. (2004). Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture. *Toxicology*, im Druck

Lehmann T., **Torky A.W.**, Stehfest E., Hofmann S. and Foth H. (2004). Expression of MRP1 and LRP in human lung cells in culture. *Toxicology Letters*, eingereicht.

Publizierte Abstracts zu Kongressbeiträgen

Torky A.W., Köhler C., Olausson B. and Foth H. (2002) A non-invasive Fluorescence assay for uptake and efflux of MDR and MRP substrates. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365. Suppl, 589 R151

Torky A.W., Stehfest E., Glahn F., Lehmann T., Foth H. (2003) Functional Activity of MDR1 und MRP1 in Human Lung Cells in Vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367. Suppl, 608 R155

Torky A.W., Stehfest E., Foth H. (2003) Localization and function of MRP1-5 in human lung cell cultures in vitro. *Toxicology Letters Vol.* 144, Suppl. 1, 518.

Torky A.W., Stehfest E., and Foth H. (2004) Distribution of MRP1-5 in normal human bronchial cells and A540 tumor cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369, Suppl, R535.

Torky A.W., Stehfest E., Raemisch A., Hofmann S. and Foth H. (2004) Cyclooxygenase-Prostaglandin system is a modifying factor for MRP function. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, Suppl. 345, EUROTOX-Congress 2004 Tampere.

Stehfest E., **Torky A. W.**, Glahn F. and Foth H. (2002) MRP expression and modulation of/by Glutathione in human Lung cells. *Toxicology Letters Vol.* 135. Suppl. 1, 273 p. 141

Glahn F., **Torky A.W.**, Stehfest E., Foth H. (2003) Effect of Metals on Glutathione and Expression of MRP and UMAT in Human Lung Cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367. Suppl, 610 R156

Stehfest E., **Torky A.W.**, Foth H. (2003) Expression of MRP in Human Lung Cells and Functional Activity after amodulation of Glutathione. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367. Suppl, 609 R156

Glahn F., **Torky A.W.**, Foth H. (2003) The effect of heavy metal ions on the expression of MRPs and UMAT in relation to the intracellular glutathione level. *Toxicology Letters Vol.* 144, Suppl. 1, 516.

Stehfest E., **Torky A.W.**, Foth H. (2003) Expression of MRP1-5 in human lung cells culture with an apical air surface and its correlation to cadmium and zinc in respect to the glutathione pool. *Toxicology Letters Vol. 144, Suppl. 1*, 517.

Stehfest E., **Torky A.W.**, Täge C., Hofmann S. and Foth H. (2004) Localization and Expression of MRP1-5 in polarized human cells from peripheral lung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369, Suppl, R536.

Glahn F., **Torky A.W.**, Simm C., Foth H. (2004). Localization of MRP-Transporters in human lung cells and A549 cells Transformation of S. Pombe with the human ABC-halftransporter UMAT. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, Suppl. 304.

Stehfest E., **Torky A.W.**, Täge C. and Foth H. (2004). Expression of MRP in peripheral human lung cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, Suppl. 307.

Raemisch A., **Torky A. W.**, Hofmann S. and Foth H. (2004). The influence of Prostaglandins F2 α and E2 on different MRP- transporters and Cadmium toxicity in normal human bronchial epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, Suppl. 344.

Lebenslauf

Name : Abdel Rahman Wageeh Torky

Geburtstag : 18.09.1971

Geburtsort : Kairo / Ägypten

Familienstand: Verheiratet

Kinder: Ahmed Abdel Rahman Wageeh Torky, geb. 12.01.2000
Omar Abdel Rahman Wageeh Torky, geb. 15.07.2001
Yousef Abdel Rahman Wageeh Torky, geb. 02. 10.2003

Nationalität : Ägyptisch

Ausbildung

09/1988-12/1994 Medizinstudium an der Ain-Shams Universität in Kairo.
Gesamtnote (very good with honour)

03/1995-02/1996 Ausbildung in Universitätskliniken an der Ain-Shams
Universität in Kairo

07/1996-08/1997 Militärdienst

Berufsweg

09/1997-06/ 2000 Demonstrator an der medizinischen Fakultät – Sohag Uni.-Ägypten
(Master of forensic medicine and toxicology)

07/2000-06/ 2001 Ass. Lecturer an der medizinischen Fakultät – Sohag Uni.-Ägypten

07/2001-06/ 2004 Promotionsstudent (DFG- Stipendiat) am Institut für
Umwelttoxikologie-Medizinische Fakultät/Martin-Luther-
Universität, Halle-Wittenberg, Mitglied im Graduiertenkolleg
“Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch
relevante Wirkstoffe“

07/2004- Wissenschaftler Mitarbeiter am Institut für
Umwelttoxikologie-Medizinische Fakultät/Martin-Luther-
Universität

Erklärung über Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe.

Abdel Rahman Wageeh Torky

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Daten die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen wurden, sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Abdel Rahman Wageeh Torky

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt für Frau Prof. Dr. Heidi Foth für die Bereitstellung des Themas und für die Gewährung der Möglichkeit am Institut für Umwelttoxikologie der Universität im Rahmen des Deutschen Forschungsgesellschaft-Projekts "Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe" zu arbeiten. Sie war stets bereit, mit Ratschlägen und Hinweisen die Arbeit zu begleiten und war beim Anfertigen der Doktorarbeit eine große Hilfe.

Herrn Dr. Stehfest gilt mein besonderer Dank für die sehr gute Zusammenarbeit, den regen Gedankenaustausch und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Glahn und Frau Rämisch für ihre stets aufmunternde Art und die fachliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Grygier, Frau Henzel, Frau Funk und Frau Röder danke ich die freundliche Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor.

Insbesondere danke ich Frau Regner, Frau Martin und Herrn Auffahrt für ihre Hilfsbereitschaft, viele nette Worte, das freundliche Arbeitsklima, fruchtbare Arbeitsstunden und die netten Pausen zwischendrin.

Ich danke Frau Dr. Hirsch-Ernst für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Immunfluoreszenz-Experimente.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Viehweger und Frau Dr. Taege für die Zusammenarbeit bei der Laser-Scanning- und immunhistochemischen Auswertung der Kultur.

Herrn Olausson gilt mein herzlicher Dank für die Rettung meines Computers

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer in allen Belangen voll unterstützen und mir somit ein lohnendes und erfolgreiches Studium ermöglichten.

Nicht zuletzt möchte ich meine Frau Ebtsam Elsayed danken, die mich mit der richtigen Mischung aus Geduld und Liebe unterstützt hat.