

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