

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).

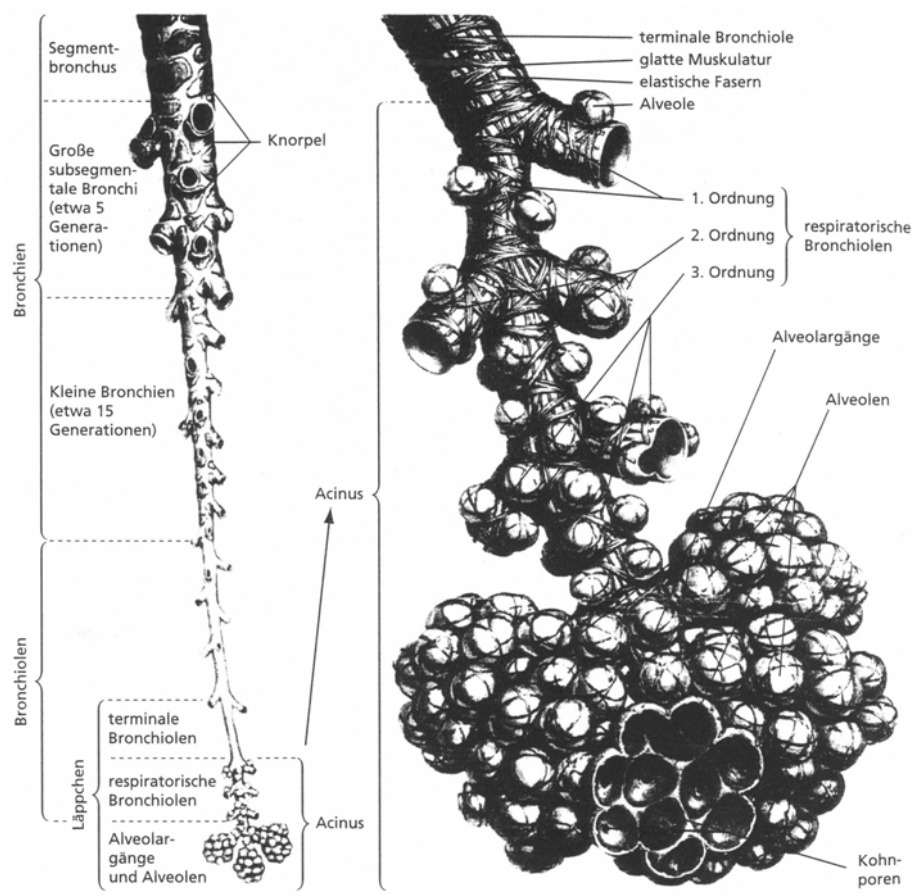


Abb.1. : Bronchien, Bronchiolen, Alveolargänge und Alveolen der Lunge des Menschen (nach Netter 1980). Die Bronchien verzweigen sich etwa 20-mal bis zu den Alveolargängen. Mit Acinus wird eine Einheit aus respiratorischen Bronchiolen und den Alveolargängen bezeichnet.

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.

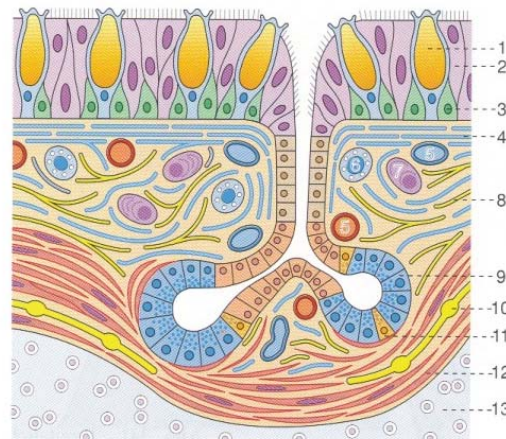


Abb.2. Schematische Darstellung funktionell wesentlicher Anteile der Wand eines Bronchus. Oberflächenepithel mit **1** Becherzellen, **2** Flimmerzellen und **3** Basalzellen; **4** Kollagenfibrillen, **5** Blutgefäße, **6** Mastzelle, **7** Plasmazelle, **8** elastische Fasern, **9** seromuköse Drüse, 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, zilientragende Bronchialepithelzellen und nichtzilientragende Bronchialepithelzellen. Einige dieser Zelltypen reagieren stärker auf initiiierende Einflüsse, und bilden somit eine Zielpopulation für die Induktion malignen 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.

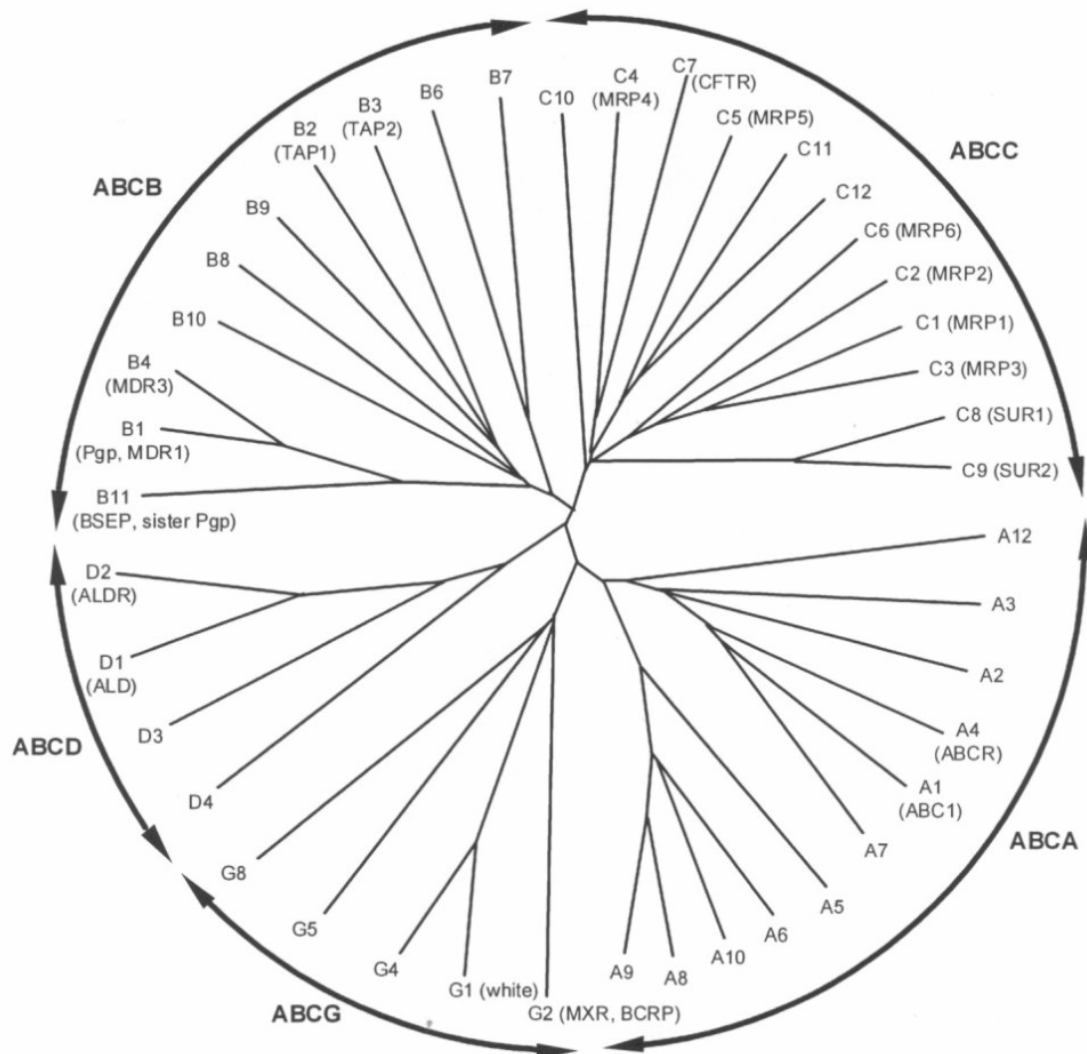


Abb.3. Phylogenetischer Baum der humanen ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Proteine. Nach Sequenz-Homologie werden ABC Proteine in sieben Subfamilien klassifiziert (ABCA bis ABCG).

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).

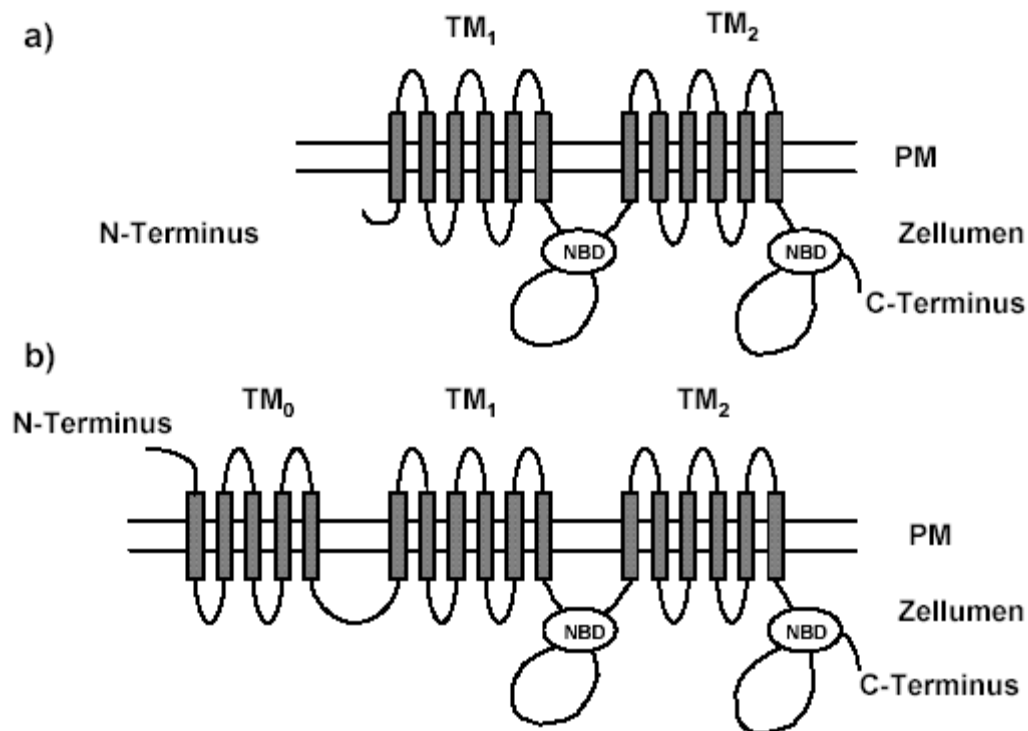


Abb. Dargestellt sind verschiedene Typen von MRP-Transportern in der Plasmamembran (PM). a) mit zwei Transmembrandomänen (TM₁ und TM₂) und zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD), z.B. MRP4, MRP5, ABCC11 und ABCC12 **b)** mit drei Transmembrandomänen (TM₀, TM₁ und TM₂) und zwei NBD, z.B. MRP1, MRP2, MRP3,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