

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, Nürmbrecht
	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.**).

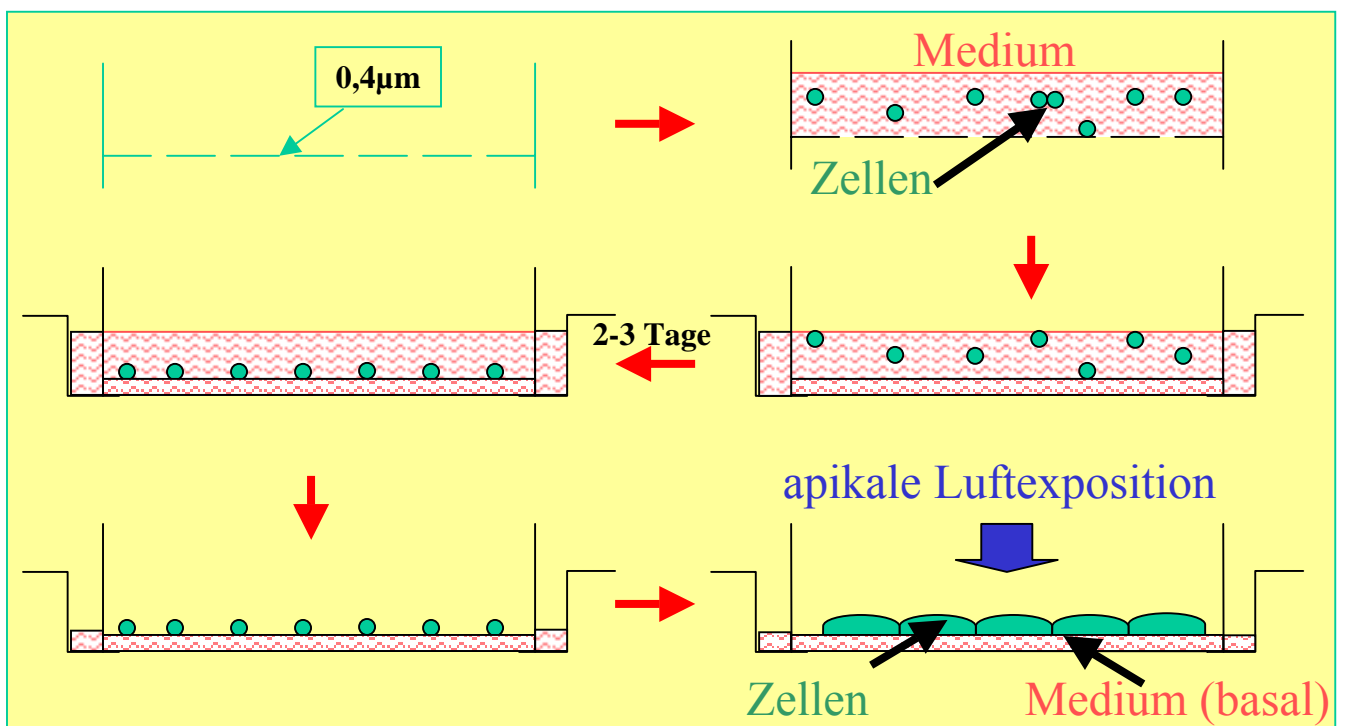


Abb. 5. Schema der Kultivierung von normalen humanen Bronchialepithelzellen auf Membran-Inserts.

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.

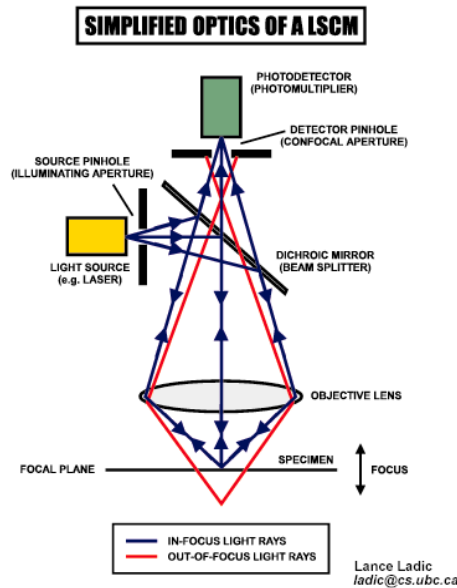


Abb. 6. Confocal-Laser Scanning Mikroskopie

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

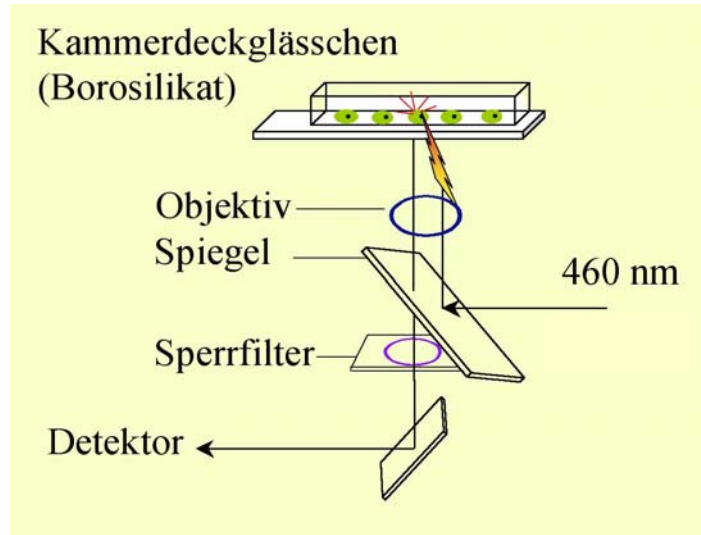


Abb. 7. Funktionsnachweis von MRP-1 mittels Einzelzellfluoreszenzmessung

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.