

#### **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 NH<sub>2</sub>-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 C<sub>4</sub>, 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 B<sub>1</sub> 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 LTC<sub>4</sub> 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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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.