

Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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

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