

Judith Sabine Eva Welker, geb. Prantl
Dr. med.

Einfluss von H₂O₂ auf die Expression von Multidrug-Resistance-Proteinen: Eine Untersuchung in Hepatom- und Gallenblasenkarzinomzellen

Geboren am 04.06.1980 in Regensburg
Staatsexamen am 13.12.2006 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. D. Rost

H₂O₂ spielt eine wichtige Rolle bei chronischen Entzündungen von Leber und Gallenwegen. Konjugatexportpumpen aus der Familie der Multidrug-Resistance-Proteine sind große Membranproteine, die den aktiven Transport einer Vielfalt von Substraten gegen einen Konzentrationsgradienten ermöglichen. Physiologischerweise kommen Mitglieder der MRPs in nahezu allen Zellen vor, wo sie für den aktiven Transport von beispielsweise Leukotrien C₄, Glutathion sowie einer Vielzahl von Konjugaten verantwortlich sind. Sie beeinflussen den Redoxhaushalt von Zellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Entgiftung und dem Schutz der Zellen vor oxidativem Stress. Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines Zellkulturmodells, um den Einfluss einer chronischen H₂O₂-Belastung auf die Expression von MRPs in Zellen des hepatobiliären Systems zu untersuchen.

Hepatomzellen (HepG2) und Gallenblasenkarzinomzellen (Mz-ChA-1) wurden über 1–5 Tage in Zellkultur mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glucoseoxidase (GOX) inkubiert. Kontrollen wurden mit 0,9 % NaCl behandelt. Das Enzym GOX bildet unter Verbrauch von Glucose und Sauerstoff kontinuierlich H₂O₂. Die Aktivität der GOX und die H₂O₂-Konzentrationen wurden durch ein Chemolumineszenzverfahren bestimmt. Das Zellwachstum und die Zellintegrität wurden durch Trypanblaufärbung und LDH-Messungen im Zellkulturüberstand kontrolliert. Expression und Lokalisation von MRP1, MRP2 und MRP3 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Immunoblot- und Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

Das Enzym GOX bleibt im Zellkulturmedium aktiv und bildet bei den eingesetzten Aktivitäten der GOX von $k_{GOX} = 3,5 \cdot 10^{-9}$ M/s und $k_{GOX} = 3,5 \cdot 10^{-8}$ M/s pathophysiologische Mengen von H₂O₂ um 1 μM und 10 μM. Die GOX wird nicht in die Zellen aufgenommen. HepG2-Zellen und Mz-ChA-1-Zellen sind in der Lage pathophysiologische Konzentrationen von H₂O₂ über einen längeren Zeitraum hinweg zu tolerieren, ohne dabei in ihrem Wachstum wesentlich beeinträchtigt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass erst nach 5 Tagen pathophysiologischer H₂O₂-Belastung mit einer GOX-Aktivität von $k_{GOX} = 3,5 \cdot 10^{-8}$ M/s das Zellwachstum beeinträchtigt wird. Die LDH-Freisetzung unterscheidet sich nicht in den Versuchsgruppen, was eine ausgeprägte Lyse der Zellen somit ausschließt. Sowohl die Mz-ChA-1-Zellen, als auch die HepG2-Zellen verfügen über ausgeprägte antioxidative Gegenregulationsmechanismen, die es ihnen ermöglichen die extrazelluläre H₂O₂-Konzentration signifikant zu senken.

Unter chronischer H₂O₂-Belastung kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Proteinexpression von MRP1, MRP2 und MRP3 auf maximal 160 %. Die Immunfluoreszenz weist darauf hin, dass sich auch unter oxidativem Stress die typische Membranlokalisation der Transporter nicht ändert.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine chronische H_2O_2 -Belastung von Zellen des hepatobiliären Systems gut toleriert wird. Im Rahmen des oxidativen Stresses kommt es zu einer adaptiven Zunahme der Expression von Multidrug-Resistance-Proteinen, welche für den Redoxhaushalt dieser Zellen als Glutathion-X-Konjugat-exportierende Membrantransporter eine wichtige Rolle spielen.

Mit Hilfe des vorgestellten Zellkulturmodells kann sehr genau der Einfluss von H_2O_2 -abhängigem oxidativen Stress auf Zellen des hepatobiliären Systems untersucht werden. Erstmals können Veränderungen über viele Tage hinweg bei konstanter H_2O_2 -Belastung untersucht werden.