

University of Groningen

Role of multidrug resistance-associated protein 1 in airway epithelium

van der Deen, Margaretha

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2007

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

van der Deen, M. (2007). *Role of multidrug resistance-associated protein 1 in airway epithelium*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Dutch summary



Nederlandse samenvatting (Dutch summary)

In dit proefschrift werd onderzocht of de expressie van multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in de bronchi en parenchym van de long is gerelateerd aan de ontwikkeling van chronic obstructive pulmonary disease (COPD). MRP1 beschermt tegen giftige stoffen en oxidatieve stress waarbij glutathion (GSH) een belangrijke rol speelt [1, 2]. MRP1 komt hoog tot expressie in luchtwegepitheel en zou belangrijk kunnen zijn bij de bescherming tegen giftige stoffen die worden ingeademd. Ontwikkeling van COPD is zeer sterk gerelateerd aan roken en wordt onder andere gekarakteriseerd door een disbalans tussen oxidanten en anti-oxidanten [3]. Een verlaagde functie van MRP1 zou daarom rokers gevoeliger kunnen maken voor de ontwikkeling van COPD [4].

Na de algemene introductie van dit proefschrift werd er in **hoofdstuk twee** een samenvatting van de literatuur geschreven over ATP-binding cassette (ABC) transporters in de long. Er werd niet alleen gespeculeerd over de normale rol van deze transporters in de long maar ook over hun rol bij ziekteprocessen. Tot nu toe werd de rol van ABC transporters bij het optreden van veel voorkomende longziekten zoals astma en COPD nauwelijks onderzocht. Er zijn tot nu toe in de literatuur drie longziekten beschreven die veroorzaakt worden door mutaties in genen van ABC transporters. Dit zijn cystic fibrosis, Tangier disease en surfactant tekort na vroeggeboorte. Veel medicijnen die worden voorgeschreven bij longaandoeningen worden getransporteerd door ABC transporters. Daarom is het heel waarschijnlijk dat de activiteit van deze transporters van invloed kunnen zijn op de behandeling van longziekten. Er is beschreven dat de long en de trachea een hoge expressie hebben voor veel ABC transporters [5]. Volgens dit literatuuronderzoek komen van alle ABC transporters MRP1, P-glycoproteïne (P-gp), breast cancer resistance proteïne (BCRP) en cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) het hoogst tot expressie in de longen en zijn dus waarschijnlijk functioneel het belangrijkste. De resultaten van MRP2, 3, 4 and 5 expressie blijken tegenstrijdig te zijn in dit literatuuroverzicht. De expressie van MRP1 blijkt ook hoog te zijn in ontstekingscellen afkomstig van longwassingen (met name in de macrofagen, slijmbekercellen en mogelijk ook in alveolaire type II cellen). Het is niet bekend of MRP2, 3, 4, 5, P-gp and CFTR ook aanwezig zijn in alveolaire type I cellen. De meest belangrijke ABC transporters in alveolaire type II cellen zijn ABCA1 en ABCA3 en deze eiwitten blijken een belangrijke rol te

spelen bij de productie van “surfactant”. Deze vloeistof is aanwezig over de gehele binnenwand van de longblaasjes en is met name belangrijk om de oppervlaktespanning intact te houden. De endotheelcellen in de long, die de binnenbekleding van de vaten vormen, zijn positief voor BCRP maar het is niet zeker of P-gp ook in deze cellen aanwezig is. Concluderend kunnen we zeggen dat mutaties en variaties in genen van ABC transporters belangrijke klinische consequenties zouden kunnen hebben voor de ontwikkeling van longaandoeningen. Een beter inzicht in de functie van ABC transporters in de long zou belangrijk kunnen zijn voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen van longziekten.

In **hoofdstuk drie** werd de aanwezigheid van de transporters MRP1, Pgp en LRP (lung resistance-related protein) bepaald in longcoupes van COPD patiënten en gezonde controles met behulp van immunohistologie. We vonden dat MRP1 in geringere hoeveelheden aanwezig was in bronchusepitheel van COPD patiënten (n=11) vergeleken met gezonde controles (n=8). Bovendien was MRP1 expressie minder sterk in bronchusepitheel van COPD patiënten met (zeer) ernstig emfyseem (n=10) vergeleken met COPD patiënten met mild tot matig emfyseem (n=9). De aanwezigheid van P-gp en LRP was niet verschillend tussen deze groepen. De expressie correleerde niet met longfunctieparameters of de hoeveelheid sigaretten die gerookt werd uitgedrukt in “packyears”. Een packyear roken betekent dat er gemiddeld 1 jaar lang elke dag 1 pakje (=20) sigaretten werd gerookt. Deze resultaten tonen dat een verminderde MRP1 expressie gerelateerd is aan de ernst van COPD. Als vervolgstudie zou het interessant zijn om een grotere groep patiënten te onderzoeken, met longfunctieafwijkingen variërend van mild tot zeer ernstig COPD om onze resultaten te verifiëren. Vervolgonderzoek naar een potentiële relatie tussen hoeveelheid MRP1 en ontsteking- of herstelparameters van de longstructuur die betrokken zijn bij de ontwikkeling van COPD lijkt daarom interessant.

In **hoofdstuk vier** bestudeerden we of de hoeveelheid mRNA en de activiteit van MRP1 verschilt tussen longcellen afkomstig van gezond weefsel en afkomstig van ernstig COPD. MRP1 expressie was hoger in bronchusepitheelcellen van zes gezonde donorlongen vergeleken met de eigen long van dezelfde patiënt met ernstig COPD die een longtransplantatie onderging. Een soortgelijke trend werd gevonden voor de MRP1 activiteit in vier patiënten. Bovendien was er een sterke correlatie van zowel de MRP1 activiteit als de MRP1 expressie tussen het donor en ontvanger deel van de luchtwegen. Deze studie is in overeenstemming met hoofdstuk twee,

waarin we een hogere MRP1 expressie vonden in biopten van gezonde individuen vergeleken met die van COPD patiënten. Deze benadering geeft de unieke mogelijkheid om de verschillen in MRP1 activiteit te analyseren in luchtwegen van gezonde personen en COPD patiënten, onafhankelijk van externe invloeden zoals blootstelling aan roken en medicatiegebruik. Aldus zijn er aanwijzingen dat een lagere MRP1 activiteit gerelateerd is aan de ontwikkeling van COPD.

Het doel in **hoofdstuk vijf** was om te bepalen of de afwezigheid van MRP1 en P-gp een rol speelt bij de ontwikkeling van emfyseem en ontstekingsreacties in de longen. We vonden dat de ontstekingsreactie in de longen is verlaagd in muizen die geen MRP1 en P-gp hebben, *Mrp1/Mdr1a/Mdr1b* triple knockout (TKO) muizen genoemd, na zes maanden blootstelling aan sigarettenrook vergeleken met gezonde “wildtype” muizen. Dit kwam tot uiting in een zowel een verlaging van het aantal ontstekingscellen als verlaagde hoeveelheid van het cytokine IL-8 in de longen van de TKO muizen en een trend voor een verlaagde hoeveelheid GM-CSF. Er moet nog verder onderzoek gedaan worden om te bepalen of dit een positief of een negatief effect is voor de long aangezien ontstekingen bijdragen aan de ontwikkeling van COPD, maar ontstekingen ook nodig zijn voor herstel van de longstructuur. Zes maanden roken leidde niet tot inductie van longemfyseem in zowel wildtype muizen als muizen zonder MRP1 en P-gp. Mogelijk is deze muizenstam (FVB) ongevoeliger voor het ontwikkelen van longemfyseem dan andere muizenstammen waarbij na 6 maanden wel emfyseem is aangetoond. In vervolgonderzoek is het aan te bevelen om de FVB muizen langer dan 6 maanden te laten roken om emfyseem te kunnen induceren. Een andere mogelijkheid is om deze muizen te kruisen met een muizenstam die gevoeliger is voor inductie van emfyseem. Bovendien zouden tevens muizen getest moeten worden die alleen *Mrp1* of P-gp missen om te kunnen onderzoeken of de effecten die we vonden toe te schrijven zijn aan de afwezigheid van *Mrp1* dan wel P-gp.

Aangezien onze resultaten suggereren dat een lagere MRP1 expressie geassocieerd is met COPD, hebben we getest of sigarettenrookextract de MRP1 activiteit beïnvloed (**hoofdstuk zes**). Hiervoor is een model gebruikt waarbij geïmmortaliseerde bronchiale epitheelcellen (de cellijn 16HBE14o-) werden blootgesteld aan sigarettenrook die opgelost werd in het kweekmedium. Het belangrijkste resultaat was dat sigarettenrookextract de activiteit van MRP1 remt en dat de overleving van de cellen slechter was wanneer de MRP1 activiteit werd geblokkeerd met een specifieke remmer.

Echter, wanneer P-gp en BCRP functie werden geblokkeerd, had dit geen effect op de overleving van deze longcellen. De resultaten suggereren dat de MRP1 functie beïnvloed wordt door roken en dat MRP1 belangrijk is voor de overleving van longcellen die worden blootgesteld aan sigarettenrook.

Wanneer MRP1 inderdaad beschermend is voor het goed functioneren van de longen, is het klinisch gezien ook van belang om te onderzoeken of medicijnen die COPD patiënten krijgen voorgeschreven effect hebben op de functie van MRP1. In **hoofdstuk zeven** wordt het effect beschreven van verschillende COPD geneesmiddelen op MRP1 functie in de long cellijn 16HBE14o-. Het medicijn budesonide had een remmend effect op de MRP1 functie, terwijl formoterol geen significant effect had. Een interessante bevinding was dat wanneer budesonide en formoterol samen werden toegevoegd, MRP1 minder geblokkeerd werd dan wanneer budesonide alleen werd toegevoegd. In klinische studies werd aangetoond dat behandeling van COPD patiënten met een combinatie van corticosteroïden (zoals budesonide) en langwerkende beta-mimetica (zoals formoterol) het aantal exacerbaties verlaagt. Verder onderzoek is nodig om te onderzoeken of MRP1 inderdaad een rol speelt bij deze positieve klinische effecten. Met N-acetylcysteïne vonden we een dosisafhankelijke stimulatie van de MRP1 activiteit en voor ipratropium bromide werd een soortgelijke trend gevonden. Deze resultaten geven aan dat een combinatie van budesonide en formoterol vergeleken met budesonide alleen positief zou zijn voor behandeling van COPD wanneer naar het effect op MRP1 gekeken wordt. Bovendien zou het stimulerend effect van N-acetylcysteïne en ipratropium bromide op MRP1 ook positief kunnen zijn voor de behandeling van COPD. Van ieder medicijn dat hier onderzocht werd, is er een positief effect op behandeling van COPD aangetoond; de resultaten van onze studie over het effect van medicijnen die gebruikt worden bij COPD patiënten op MRP1 geven additionele informatie over de mogelijke (bij)werkingen waar rekening mee gehouden zou moeten worden.

In **hoofdstuk acht** werd er onderzocht of indomethacine, een ontstekingsremmer, resistentie voor geneesmiddelen kan omzeilen in een kleincellig longkankercellijn die een hoge expressie heeft van MRP1. Kleincellig longkanker reageert in eerste instantie goed op behandeling met chemotherapie maar wordt vaak bij terugkomst van de tumor ongevoelig voor deze behandeling. Indomethacine is een remmer van MRP1 functie. Verrassend was dat cellen met een lage MRP1 expressie ongevoeliger waren voor indomethacine dan cellen met een hoge MRP1 expressie. Dit werd gevonden met zowel een experiment dat celoverleving als met een experiment

dat geprogrammeerde celdood (apoptose genoemd) meet. We vonden dat indomethacine de hoeveelheid glutathion (een anti-oxidant) verlaagt in cellen die een hoge MRP1 expressie hebben. Dit ging gepaard met een verlaging van de spanning over de membranen van mitochondriën (belangrijke zuurstofvoorzieners in de cel) en dit alles maakte deze cellen gevoeliger voor inductie van cellulaire stress. Dit mechanisme zou van belang kunnen zijn bij de behandeling van longkankerpatiënten waarvan de tumor ongevoelig geworden is voor chemotherapie door een verhoogde aanwezigheid van MRP1 (geïnduceerd of natuurlijk aanwezig).

Toekomstperspectieven

Dit is de eerste studie waarbij er onderzoek werd gedaan naar de rol van multidrug resistentie eiwitten in relatie tot ontwikkeling van COPD. De resultaten van onze patiëntenstudies, *in vitro* experimenten en proefdieronderzoek, laten een potentiële rol zien voor MRP1 (en misschien ook P-gp) in de ontwikkeling van COPD en in het ontgiften van sigarettenrook. Verder onderzoek is nodig om de onderliggende mechanismen te bestuderen.

Er zijn polymorfismen in het *MRP1* gen locus geïdentificeerd die zouden kunnen leiden tot verschillen in MRP1 functie en zo ook tot individuele verschillen tussen personen in respons op medicatie [6]. Tot nu toe zijn de farmacologische implicaties en de gevolgen van interindividuele verschillen in fenotype van MRP1 nog speculatief [7, 8]. Recentelijk is er een associatie aangetoond tussen polymorfismen in het *MRP1* gen en een verhoogd risico op ovariumkanker [9]. De hypothese is nu dat functionele polymorfismen in MRP1 zijn gerelateerd aan ontwikkeling van COPD. Het zou daarom van groot belang zijn om de frequentie van polymorfismen in een grote groep COPD patiënten te vergelijken met individuen zonder longaandoeningen. Een ander aspect dat bestudeerd kan worden is de interactie met factoren die betrokken zijn bij (bescherming tegen) oxidatieve stress. Het is bijvoorbeeld bekend dat een verminderde fruit en/of vitamine inname is gerelateerd aan een verminderde longfunctie, een kenmerk van COPD. Daarom zou een interactie tussen gen en omgeving (in dit geval voeding) onderzocht kunnen worden in relatie tot ontwikkeling van COPD. Bovendien kan er onderzocht worden of de MRP1 activiteit gerelateerd is aan de gevoeligheid, maar ook aan de mate van ernst en ziekte progressie.

Dit is mogelijk door een relatie te onderzoeken tussen longfunctie afname, stadium van COPD progressie (aangedane luchtwegen versus parenchym) en ontsteking en structuurkenmerken in de long. Bovendien zou onderzoek naar polymorfismen in *MDR1* en *BCRP* genen ook interessant zijn aangezien deze transporters ook in hoge tot redelijke hoeveelheden in de humane long aanwezig zijn. Andere enzymen die belangrijk zijn bij ontgiftingsprocessen zijn leden van de glutathion S-transferase (GST) familie. De functie van GST eiwitten is de ontgiftiging van een groot scala aan stoffen door conjugatie (koppeling) aan GSH en veel van deze conjugaten worden de cel uit getransporteerd door MRP1 [1]. Polymorfismen in *GST* genen zijn geassocieerd met COPD en een snelle achteruitgang in longfunctie bij rokers [10, 11]. Omdat de functies van MRP1 en GST sterk aan elkaar gerelateerd zijn, zou het heel interessant zijn om te onderzoeken of de polymorfismen in *MRP1* geassocieerd zijn aan ontwikkeling van COPD en/of achteruitgang in longfunctie vergeleken met individuen zonder longaandoeningen. Bovendien is het van belang na te gaan of de functionele interactie tussen *GST* en *MRP1* (en mogelijk andere multidrug resistentie genen) het effect vergroot vergeleken met de polymorfismen in deze afzonderlijke genen.

Op het moment zijn technieken die gebruikt worden in genomics en proteomics nog steeds volop in ontwikkeling en kunnen van groot belang zijn voor verder onderzoek. Met een microarray kan de expressie van alle 48 ABC transporters bepaald worden op mRNA niveau in één assay. Bovendien kan de mRNA expressie van genen bepaald worden die betrokken zijn bij detoxificatie, bijvoorbeeld enzymen die een rol spelen bij oxidatieve stress (b.v. GSH metabolisme eiwitten) of enzymen van de cytochroom P450 familie. Patiëntmateriaal (biopten, primaire cellen) kunnen worden geanalyseerd met deze technieken om mRNA en eiwit expressie te kunnen vergelijken met materiaal afkomstig van gezonde individuen. Door gebruik te maken van *in vitro* modellen waarbij cellen met rookextract worden geïncubeerd, kunnen genen (of eiwitten) geïdentificeerd kunnen worden die differentieel tot expressie worden gebracht. De bronchusepitheelcellijn 16HBE14o⁻ is heel geschikt voor drugtransportstudies vergeleken met andere cellijnen, aangezien de permeabiliteitseigenschappen vergelijkbaar zijn met die van normale longepitheelcellen [12]. Bijvoorbeeld, 16HBE14o⁻ cellen vormen “tight junctions” en kunnen onder bepaalde kweekcondities cilia ontwikkelen. Het was al bekend dat deze cellen ook CFTR tot expressie brengen [13], en functionele expressie van P-gp en LRP is ook bestudeerd [14]. In dit proefschrift werd de cellijn 16HBE14o⁻ gekarakteriseerd voor de

MRP's en BCRP. We vonden dat MRP1 expressie hoog was in deze cellen, zoals ook in primaire bronchusepitheelcellen. Het zou interessant zijn om de expressie van alle ABC transporters die bekend zijn te analyseren in deze geïmmortaliseerde cellen en te onderzoeken welke eiwitten beïnvloed worden door sigarettenrook door deze cellen bloot te stellen aan sigarettenrook extract. Ter vergelijking kunnen tumorcellijnen en primaire longepitheelcellen gebruikt worden om het model te valideren. Het incuberen van deze cellen met sigarettenrook, isolatie van eiwit en RNA en uitvoeren van microarrays en kwantitatieve PCR zal inzicht geven in welke (MDR) eiwitten, naast MRP1, een rol spelen bij de detoxificatie van sigarettenrook. Veel stoffen in sigarettenrook zijn carcinogeen of mutageen. Daarom is het van belang om onderzoek te doen naar een potentieel beschermende rol van MRP1 in de ontwikkeling van longkanker naast de rol in COPD. Incubatie met rookextract kan worden uitgevoerd met sigarettenrook extract (vloeibare rook) zoals toegepast in onze studie, of door blootstelling aan sigarettenrook in een lucht-vloeistof experimentele opstelling. Gebruik van 16HBE14o⁻ cellen zou in dit model een goede keuze zijn aangezien het bekend is dat deze cellen cilia ontwikkelen wanneer ze worden gekweekt in een lucht-vloeistof transwell systeem dat daarom beter vergelijkbaar is met de natuurlijke *in vivo* situatie [12].

In dit proefschrift werd gebruik gemaakt van RNA interferentie om de MRP1 expressie down te reguleren in 16HBE14o⁻ cellen. Dit bood de mogelijkheid het effect daarvan op de modulatie van toxiciteit van sigarettenrook te bestuderen. Een andere benadering om de rol van MRP1 en/of P-gp in detoxificatiemechanismen van sigarettenrook te bestuderen zou kunnen zijn het isoleren van primaire bronchusepitheelcellen van Mrp1/Mdr1a/1b (en de afzonderlijke knockouts) deficiënte muizen en deze te incuberen met sigarettenrookextract voor functionele analyse met de flowcytometer. Het voordeel van dit experiment is dat MRP1 in deze muizencellen totaal afwezig is in plaats van gedeeltelijke en tijdelijke downregulatie van MRP1 met RNA interferentie. Op deze manier kan de bijdrage van MRP1 bestudeerd worden door bijvoorbeeld MRP1 expressie weer te induceren met behulp van MRP1 expressie constructen. Een belangrijk nadeel is dat het moeilijk is om deze primaire cellen meer dan drie tot vijf passages te kweken. Ook moet er rekening gehouden worden met de mogelijkheid dat totale afwezigheid van MRP1 (in plaats van een verminderde functie) een niet-fysiologische situatie zou kunnen creëren door veranderingen in cellulaire detoxificatiemechanismen en

compensatiemechanismen. Om de directe en indirecte effecten van sigarettenrook op MRP1 expressie te onderzoeken zijn luciferase constructen voor de MRP1 promotor van grote waarde. Dit systeem kan dan gebruikt worden om effecten op transcriptiefactoren te bepalen die de MRP1 expressie reguleren zoals nuclear factor-E2 p45-related factor (NRF2).

Proefdieronderzoek is nodig om de *in vivo* effecten van roken te onderzoeken op cellulair niveau op een gecontroleerde manier. Voor dit doel zijn er proefdiermodellen voor COPD ontwikkeld. Wij hebben gebruik gemaakt van een rookmodel via directe inademing van rook via de neus voor 6 maanden, dat met succes was ontwikkeld voor toepassing in andere studies voor het bestuderen van emfyseemontwikkeling [15]. Er werden significante veranderingen gevonden in inflammatie in de longen maar we konden geen emfyseem ontwikkeling aantonen met de “lineaire gemiddelde intercept” methode (Lm). Dit zou kunnen komen doordat deze muizenstam (FVB) resistent is voor het ontwikkelen van emfyseem, aangezien het bekend is dat er grote verschillen bestaan tussen muizenstammen wat betreft de ontwikkeling van COPD. Voor verder onderzoek is het aan te bevelen om MRP1 knockout muizen terug te kruisen met een muizenstam die gevoeliger is om emfyseem te ontwikkelen zoals C57Bl6/J of A/J muizen, dit om te bepalen of deze muizen emfyseem ontwikkelen. Met dit model is het vervolgens mogelijk om te behandelen met medicijnen die invloed hebben op bijvoorbeeld oxidatieve stress of die MRP1 expressie stimuleren.

Er is niet veel bekend over effecten van andere longmedicamenten op expressie van MRP1 of andere ABC transporters [16, 17]. De ontstekingsremmer montelukast (een leukotriëne receptorantagonist) blokkeert het effect van leukotriënen en verlicht daarmee de symptomen van astma. Montelukast lijkt functioneel en structureel op de leukotriëne antagonist MK571, een zeer potente MRP1 remmer. In recente studies werd montelukast toegepast voor behandeling van COPD patiënten in klinische trials. Deze behandeling had een anti-inflammatoir effect en een positief effect op de hypertonisch zout geïnduceerde luchtwegreactie in COPD patiënten [18, 19]. Aangezien montelukast een MRP1 remmer is, zou chronische behandeling met dit medicijn in een experimenteel proefdiermodel verder inzicht kunnen geven in de functie van MRP1 op de ontwikkeling van COPD (en mogelijk astma [20]).

Concluderend kan gesteld worden dat een lagere MRP1 expressie in luchtwegepitheel is gerelateerd aan door roken veroorzaakte ontsteking in de long en aan de longaandoening COPD. Sigarettenrook en verschillende longgeneesmiddelen hebben effect op de activiteit van MRP1. Verder onderzoek is noodzakelijk hetgeen zou kunnen leiden tot een therapie die gebaseerd is op een individueel genetisch profiel om behandeling te kunnen optimaliseren en de negatieve (lange termijn) bijwerkingen te reduceren. Echter, stoppen met roken is tot nu toe nog steeds de beste therapie die door longartsen voorgeschreven kan worden om het verdere verloop van COPD te veranderen.

References

- 1 Muller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 13033-13037.
- 2 Cole SP, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 438-446.
- 3 MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 50-60.
- 4 van der deen M, Marks H, Willemse BW, Postma DS, Muller M, Smit EF, Scheffer GL, Scheper RJ, de Vries EG, Timens W. Diminished expression of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in bronchial epithelium of COPD patients. *Virchows Arch* 2006; 449: 682-688.
- 5 Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W, Schmitz G. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 2003; 49: 230-238.
- 6 Wang Z, Wang B, Tang K, Lee EJ, Chong SS, Lee CG. A functional polymorphism within the MRP1 gene locus identified through its genomic signature of positive selection. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2075-2087.
- 7 Ferguson LR, De Flora S. Multiple drug resistance, antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat Res* 2005; 591: 24-33.
- 8 Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* 2006; 25: 231-259.
- 9 Obata H, Yahata T, Quan J, Sekine M, Tanaka K. Association between single nucleotide polymorphisms of drug resistance-associated genes and response to chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 2227-2232.
- 10 He JQ, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, Sandford AJ. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 323-328.
- 11 Cheng SL, Yu CJ, Chen CJ, Yang PC. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J* 2004; 23: 818-824.
- 12 Forbes B, Ehrhardt C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 60: 193-205.
- 13 Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 38-47.
- 14 Ehrhardt C, Kneuer C, Laue M, Schaefer UF, Kim KJ, Lehr CM. 16HBE14o- human bronchial epithelial cell layers express P-glycoprotein, lung resistance-related protein, and caveolin-1. *Pharm Res* 2003; 20: 545-551.
- 15 van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, Hylkema MN, van den Berg A, Timens W, Kerstjens HA. Cigarette Smoke-induced Emphysema: A Role for the B Cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 751-758.

- 16 van der Deen M, de Vries EG, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res* 2005; 6: 59.
- 17 Hamilton KO, Yazdanian MA, Audus KL. Contribution of efflux pump activity to the delivery of pulmonary therapeutics. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 1-12.
- 18 Celik P, Sakar A, Havlucu Y, Yuksel H, Turkdogan P, Yorgancioglu A. Short-term effects of montelukast in stable patients with moderate to severe COPD. *Respir Med* 2005; 99: 444-450.
- 19 Zuhlke IE, Kannies F, Richter K, Nielsen-Gode D, Bohme S, Jorres RA, Magnussen H. Montelukast attenuates the airway response to hypertonic saline in moderate-to-severe COPD. *Eur Respir J* 2003; 22: 926-930.
- 20 Lima JJ, Zhang S, Grant A, Shao L, Tantisira KG, Allayee H, Wang J, Sylvester J, Holbrook J, Wise R, Weiss ST, Barnes K. Influence of leukotriene pathway polymorphisms on response to montelukast in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 379-385.

